UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MODIFICAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA, BIODISTRIBUIÇÃO E CARDIOTOXICIDADE DE UMA NOVA TIAZOLIDINODIONA, LYSO-7, PELO USO DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS COM DERIVADOS DO ÁCIDO POLILÁCTICO

GIANI MARTINS GARCIA

OURO PRETO – MG

2015

GIANI MARTINS GARCIA

MODIFICAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA, BIODISTRIBUIÇÃO E CARDIOTOXICIDADE DE UMA NOVA TIAZOLIDINODIONA, LYSO-7, PELO USO DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS COM DERIVADOS DO ÁCIDO POLILÁCTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Profª Drª Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Co-orientador: Dr Sylvain Richard (Université de Montpellier/France)

Co-orientador: Profª Drª Dulcinéia Saes Parra Abdalla (USP/SP)

OURO PRETO – MG

2015

G216m Garcia, Giani Martins.
Modificação da farmacocinética, biodistribuição e cardiotoxicidade de uma nova tiazolidinodiona, Lyso-7, pelo uso de nanocápsulas preparadas com derivados do ácido poliláctico [manuscrito] / Giani Martins Garcia. - 2015.
124f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.
Coorientadora: Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas. Departamento de Farmácia. Pós-graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Nanotecnologia. 2. Farmacocinetica. 3. Biofarmacia. 4. Medicamentos - Biodisponibilidade. I. Mosqueira, Vanessa Carla Furtado. II. Abdalla, Dulcineia Saes Parra. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Titulo.

CDU: 615.014

Catalogação: www.sisbin.ufop.br

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

"Modificação da farmacocinética, biodistribuição e cardiotoxicidade de uma nova tiazolidinodiona, Lyso-7, pelo uso de nanocápsulas preparadas com derivados do ácido poliláctico"

Aos dezesseis dias do mês de junho de 2015, às 14h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Giani Martins Garcia**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Sandra Helena Poliseli Farsky
Examinadora (USP)

Prof.ª Dr.ª Neila Márcia Silva Barcellos
Examinadora (UFOP)

Prof. Dr. Mauro César Isoldi
Examinador (UFOP)

Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz
Examinador (UFMG)

Prof.ª Dr.ª Vanessa Carla Furtado Mosqueira
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 16/06/2015

NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559-1636
E-mail: pbio@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/pbio

Colaboradores

Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta (UFPE)

Profª Drª Andrea Grabe-Guimarães (UFOP)

Dr. José Mário Carneiro Vilela (FIEMG - Campus CETEC-SENAI)

Drª Margareth Spangler Andrade (FIEMG - Campus CETEC-SENAI)

Dedico este trabalho aos meus amados pais, por serem o alicerce da minha vida e por fazerem dos meus sonhos os deles, e ao meu irmão pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão de tudo, meu refúgio e meu guia;

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para tornarem possíveis todos os meus sonhos. Sem vocês nada disso seria possível;

Ao meu irmão e melhor amigo Geovani, pelos conselhos e incentivo sempre; à Gleiciane pela amizade, carinho e orações; João Pedro meu anjinho amado;

A minha família, vó, tios e primos, pela torcida;

A Vanessa, pelos muitos anos de orientação, cuidado, parceria e ensinamentos, pela oportunidade, disponibilidade e ótima convivência durante todo este tempo;

Ao Dr. Sylvain Richard, pela orientação tão agradável e competente durante minha estadia na França; a prof. Dulcinéia pela oportunidade e disponibilidade;

Aos amigos do LDGNano, Pollyanna, Carina, Alessandra, Isabel, Douglas, Ana Lia, Mônica, Kelly, Gwenaelle, Carlos, Luan, Caroline Faria, Carolina Torres, Jéssica e Lorena, por dividirem comigo os problemas e as conquistas, e pelos bons momentos no laboratório. À Larissa, pela amizade, ajuda nos experimentos e companhia tão agradável. Em especial a minha grande amiga Líliam, que esteve ao meu lado em todos os momentos, dentro e fora do laboratório, por todo o carinho, companheirismo e por não medir esforços para que tudo saísse da melhor forma possível;

Aos professores do Programa pelos ensinamentos compartilhados;

As minhas queridas irmãs da República Hangar, pela amizade, apoio e torcida, e por sempre entenderem meus momentos de reclusão;

Aos demais amigos pelo incentivo, em especial Rodrigo Saar e Raquel Castanheira pela amizade incondicional;

A Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela formação acadêmica;

A todas as outras pessoas que com críticas, sugestões e elogios contribuíram de forma direta ou indireta para conclusão deste trabalho.

RESUMO

As tiazolidinodionas (TZD) são fármacos usados no tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 como agentes que aumentam a sensibilidade à insulina. A Lyso-7 é uma nova TZD sintética que possui atividade anti-inflamatória, além de ser (pan) agonista dos receptores PPAR α, β/δ e γ. Nanocápsulas (NC) poliméricas contendo Lyso-7 obtidas a partir do ácido poliláctico (PLA) e seus derivados dibloco ligados covalentemente ao polietilenoglicol (PLA-PEG), foram preparadas pelo método de nanoprecipitação. Foram também utilizados copolímeros em bloco funcionalizados ao longo da cadeia de PLA pela inserção randômica de monômeros contendo grupos hidroxilas (OH-PLA-PEG) ou benzila (BZO-PLA-PEG). As NC PLA (273 nm) tiveram tamanho médio superior às NC PLA-PEG com e sem funcionalização (164-227 nm), indicando que a presença do PEG reduziu o tamanho médio das NC. Todas as formulações apresentaram-se monodispersas e encapsularam eficientemente a Lyso-7 (0,5 mg/mL), com um rendimento de aproximadamente 85% e porcentagem de encapsulação próximos a 100%. As análises morfológicas realizadas por microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura indicaram a presença de estruturas esféricas e deformáveis. A farmacocinética da Lyso-7 livre e associada às diferentes formulações de NC na dose de 1,6 mg/Kg foi estudada. A área sob a curva da concentração *versus* tempo da Lyso-7 associada às NC aumentou significativamente em relação à Lyso-7 livre, 14 vezes para NC de PLA e 35 vezes para NC de PLA-PEG. Para avaliar o destino destas NC após a administração intravenosa, foi desenvolvida e validada uma nova metodologia bioanalítica para o doseamento da Lyso-7 por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV no plasma e em diferentes órgãos. A Lyso-7 livre e encapsulada nas NC de PLA e PLA-PEG foi quantificada no fígado, baço, coração, pulmão e rim. A nanoencapsulação aumentou a exposição da Lyso-7 em todos os órgãos avaliados. Devido às restrições clínicas do uso de TZD, particularmente referentes à indução indesejada de insuficiência cardíaca (rosiglitazona), os eventuais efeitos cardiotóxicos da Lyso-7 livre e nanoencapsulada foram avaliados por medidas de alteração da fisiologia e funcionamento de cardiomiócitos murinos recém-isolados. Os testes *in vitro* indicaram que a Lyso-7 livre reduziu os níveis de Ca^{2+} diastólico em todas as concentrações testadas (4,5, 45 e 450 µM) e sendo correlacionado com o aumento da velocidade de recaptura de Ca^{2+} na concentração de 450 µM. Além

disso, foram observadas ondas ectópicas localizadas de Ca^{2+} (*sparks*), na concentração de 450 µM, que podem eventualmente induzir arritmias. Com relação à segurança, a Lyso-7, quando administrada em NC de PLA na dose de 1,6 mg/Kg/dia durante 7 dias em camundongos, não induziu cardiotoxicidade nas condições experimentais empregadas, ao passo que sua administração em solução acelerou o decaimento do transiente de Ca^{2+} (TAU) e reduziu os níveis de Ca^{2+} diastólico. O teste de toxicidade aguda indicou um possível efeito tóxico da Lyso-7, uma vez que camundongos fêmeas tratados com a Lyso-7 em NC PLA e NC PLA-PEG tiveram alteração de alguns parâmetros hematológicos, e o grupo de machos tratados com Lyso-7 em NC PLA apresentaram alteração do índice uréia/creatinina, indicador de alteração renal. Dessa forma, a associação da Lyso-7 às NC poliméricas se mostrou promissora em relação ao aumento do tempo de meia vida plasmática, à exposição tecidual e à redução da cardiotoxicidade *in vitro* e *in vivo*. Esses dados poderão influenciar na eficácia terapêutica e na toxicidade em estudos posteriores e se mostram promissores para esta nova classe de moléculas sintéticas.

Palavras-chave: Lyso-7, tiazolidinodiona, nanocápsulas poliméricas, farmacocinética, biodistribuição, cardiotoxicidade

ABSTRACT

Thiazolidinediones (TZD) are drugs used to treat type 2 diabetes mellitus as agents that enhance the insulin sensitivity. The Lyso-7 is a new synthetic TZD, which have anti-inflammatory activity, besides being receptor (pan) agonist of PPAR α, β/δ, γ. Polymeric nanocapsules (NC) containing Lyso-7, obtained from the polylactic acid (PLA) and their derivatives diblock covalently linked to polyethylene glycol (PLA-PEG), were prepared by the nanoprecipitation method. Also, we used copolymers functionalized along the PLA block chain by the random inclusion of monomers containing hydroxyl groups (HO-PLA-PEG) or benzyl (BZO-PLA-PEG). The PLA NC (273 nm) has higher average size than PLA-PEG NC with and without functionalization (164-227 nm), indicating that the presence of PEG reduced the average size of the NC. All formulations were monodisperse and efficiently encapsulate the Lyso-7 (0.5 mg/ml), with a yield of 85% approximately, and percentage of encapsulation near 100%. The morphological analyzes by atomic force microscopy and scanning electron microscopy indicated the presence of spherical and deformable structures. The pharmacokinetics of Lyso-7 free and associated with different formulations of NC at the dose of 1.6 mg/kg was studied. The area under the curve of the concentration *versus* time of Lyso-7 nanoencapsulated increased significantly, compared to Lyso-7 free, 14-fold to PLA NC and 35-fold to PLA-PEG NC. To assess the fate of these NC after intravenous administration, a new bioanalytical methodology was developed and validated for the determination of Lyso-7 by high-performance liquid chromatography with UV detection in plasma and various organs. The Lyso-7 free and Lyso-7 loaded in PLA and PLA-PEG NC was quantified in the liver, spleen, heart, lung and kidney. The Lyso-7 exposition in all organs evaluated was increased after nanoencapsulation. Due to the clinical restriction of the TZD, particularly relating to undesirable heart failure induction (rosiglitazone), the cardiotoxic effects of Lyso-7 free and nanoencapsulated were evaluated by measures of physiology and functioning changing of isolated murine cardiomyocytes. *In vitro* tests showed that Lyso-7 free reduced diastolic Ca^{2+} levels in all concentrations tested (4.5, 45 and 450 µM) which is correlated with the increase in the reuptake velocity of Ca^{2+} at a concentration of 450 µM. Furthermore, ectopic Ca^{2+} waves (sparks) were observed at a concentration of 450 µM, which can eventually induce arrhythmias. Regarding security, the administration of 1.6

mg/kg/day of Lyso-7 during 7 days did not induce cardiotoxicity in the experimental conditions analyzed, while the Lyso-7 administration in solution accelerated the decay of Ca^{2+} transient (TAU) and reduced the levels of diastolic Ca^{2+}. The acute toxicity test indicated a possible toxic effect of Lyso-7, since female mice treated with Lyso-7 PLA NC and PLA-PEG NC had a change of some hematological parameters, and the male group treated with Lyso-7 in PLA NC showed alterations on the urea/creatinine index, indicating renal dysfunction. Thus, the association of Lyso-7 to polymeric NC has shown considerable promise in relation to the increase in plasma half-life time, exposure to tissue and reduced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*. These data may influence the therapeutic efficacy and toxicity in further studies and show promise for this new class of synthetic molecules.

Keywords: Lyso-7, thiazolidinedione, polymeric nanocapsules, pharmacokinetic, biodistribution, cardiotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de excitação/contração de miócitos ventriculares (adaptado de Bers, 2002).....26

Figura 2: Estrutura química da Lyso-7. 28

Figura 3: Arquitetura de copolímeros lineares (adaptado de Qui & Bae, 2006). 31

Figura 4: Representação esquemática de nanocápsulas (A e B) e nanoesferas (C e D) poliméricas: A) NC convencional; B) NC estericamente estabilizada por cadeias de PEG; C) NS convencional; D) NS estericamente estabilizada por cadeias de PEG.....32

Figura 5: Perfil de liberação *in vitro* de NC de Lyso-7 na concentração de 0,5 mg/mL em PBS, utilizando os polímeros PLA e PLA-PEG (Garcia, 2011).....33

Figura 6: Estrutura química dos copolímeros em bloco obtidos a partir da reação do monometoxi-polietilenoglicol com o dilactídeo em presença de epóxidos inseridos randomicamente na cadeia linear do PLA, contendo a inserção de grupos (em vermelho) na parte hidrofóbica do PLA, e os grupos substituintes (Mosqueira e cols., 2009). 34

Figura 7:Imagens por MFA da altura (A), fase (B) e o perfil topográfico (C) de PLA-NC, obtido pelo programa ‘‘section analysis’’ mostrando as medidas do diâmetro e altura das NC. Scan size: 2,5 × 2,5 µm. (D) Imagem tri-dimensional por MFA de PLA-NC contendo Lyso-7 (0,5 mg/mL) depositadas sobre mica. Scan size: 5 × 5 µm (apêndice 1). 54

Figura 8: Imagens por MFA do perfil topográfico de Lyso-7 NC PLA-PEG, mostrando as medidas do diâmetro (setas vermelhas) e altura (setas verdes) das NC. Scan size: 1,7 × 1,7 µm.....55

Figura 9: Imagens de MEV de NC PLA contendo (A) e (B). As imagens foram obtidas com um feixe de 20 kV após recobrimento com ouro (100 Å) (apêndice 1).....56

Figura 10: Porcentagem de hemólise após a incubação da Lyso-7 livre e associada nas diferentes formulações. 57

Figura 11: Cromatogramas obtidos da Lyso-7 NC PLA (A); amostra de plasma obtido 5 min após a administração i.v. da Lyso-7 NC PLA (B); amostra de coração (C) e fígado (D) de camundongos, obtidas 10 min após a administração i.v. da Lyso-7 NC PLA. 68

Figura 12: Perfis de concentração plasmática em função do tempo da Lyso-7 após administração intravenosa na dose de 1,6 mg/Kg na forma livre (em solução) e nas diferentes formulações de NC com variação dos polímeros (média ± erro padrão, n = 6). *diferente da Lyso-7 livre (two-way ANOVA).....73

Figura 13: Concentrações de Lyso-7 no fígado (A), coração (B), baço (C), pulmão (D) e rim (E) de camundongos 10, 30 e 60 min após administração i.v. da Lyso-7 livre (barras brancas), Lyso-7 NC PLA (barras pretas) e da Lyso-7 NC PLA-PEG (barras cinza) e da área sob a curva (ASC) no eixo direito do gráfico. Dose administrada: 1,6 mg/Kg de Lyso-7. *p<0,05 comparado com a Lyso-7 livre (n = 4). 79

Figura 14: Delineamento experimental do teste de toxicidade aguda *in vivo* segundo o guia do ICH, 2009. 89

Figura 15: Delineamento experimental para avaliação da cardiotoxicidade *in vivo* da Lyso-7 livre e associada a NC poliméricas. 93

Figura 16: Efeito da Lyso-7 no comprimento do sarcômero (A), na amplitude (B), no encurtamento (C) e na velocidade de relaxamento (D), avaliado como a porcentagem da linha de base. 98

Figura 17: Traços representativos do transiente de Ca^{2+}i de miócitos ventriculares após incubação com Lyso-7 em diferentes concentrações. 99

Figura 18: Efeito da Lyso-7 na amplitude do transiente de Ca^{2+} (A) e na cinética de recaptação (B) em cardiomiócitos ventriculares de camundongos. 100

Figura 19: Efeito da Lyso-7 no Ca^{2+} diastólico de cardiomiócitos ventriculares. 100

Figura 20: Indução de arritmias ventriculares em cardiomióticos após a incubação com Lyso-7. (A) basal, (B) após estimulação com ISO 10 nM). 100

Figura 21: Efeito da Lyso-7 na indução de sparks de Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares. 102

Figura 22: Efeito da Lyso-7 no comprimento do sarcômero (SR) (A), na amplitude (B), no encurtamento do SR (C) e na velocidade de relaxamento (D), avaliado como a porcentagem da linha de base após administração de 1,6 mg/Kg/dia durante 7 dias. 103

Figura 23: Efeito da Lyso-7 na amplitude do transiente de Ca^{2+} (A) e na cinética de recaptação (B) em cardiomiócitos ventriculares após administração de 1,6 mg/Kg/dia durante 7 dias. 104

Figura 24: Efeito crônico da Lyso-7 no Ca^{2+} diastólico de cardiomiócitos ventriculares (dose 1,6 mg/Kg/dia por 7 dias). 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Correlação entre a distribuição tecidual e as respectivas funções das diferentes isoformas dos receptores PPAR.....22

Tabela 2: Caracterização dos diferentes copolímeros funcionalizados.....42

Tabela 3: Diâmetro hidrodinâmico médio de NC contendo Lyso-7 (0,5 mg/mL) em relação às NC brancas obtidas a partir de polímeros com diferentes arquiteturas ...48

Tabela 4: Eficiência de encapsulação e rendimento de encapsulação de formulações de NC poliméricas contendo Lyso-7 preparadas com 0,5mg/mL.....51

Tabela 5: Preparo da curva de calibração.....64

Tabela 6: Recuperação absoluta da Lyso-7 e do padrão interno das matrizes biológicas 67

Tabela 7: Coeficiente de correlação linear e equação das curvas padrão de calibração da Lyso-7 nos tecidos de camundongos.....69

Tabela 8: Precisão e exatidão intra e inter-dia da Lyso-7 determinada pelo método bioanalítico 70

Tabela 9: Dados da estabilidade da Lyso-7 nos tecidos de camundongos (n = 6) ...71

Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos da Lyso-7 calculados a partir das concentrações plasmáticas após administração endovenosa em camundongos 74

Tabela 11: Efeito da perfusão dos órgãos com PBS na concentração tecidual da Lyso-7 10 min após administração.....80

Tabela 12: Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas obtidos 14 dias após o tratamento por via endovenosa de Lyso-7 na dose de 1,6 mg/Kg.....95

Tabela 13: Parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss machos e fêmeas 14 dias após administração intravenosa de Lyso-7 na dose de 1,6 mg/Kg.....97

LISTA DE ABREVIATURAS

$[Ca^{2+}]_i$	concentração de cálcio intracelular
ALT	aspartato transaminase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	área sobre a curva
ASMC	área sobre a curva no primeiro momento
AST	alanina transaminase
BZ	Benznidazol
Ca^{2+}_i	cálcio intracelular
Cl	“Clearance plasmático” ou depuração plasmática
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
CME	concentração mínima efetiva
Cp	última concentração quantificada
DC	doenças cardiovasculares
ECF	espectroscopia de correlação de fótons ou espalhamento dinâmico da luz
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
Hb	Hemoglobin
Hm	Hemácias
Ht	Hematócrito
I.P.	índice de polidispersão

i.v.	Intravenoso
IC	insuficiência cardíaca
ICH	International Conference on Harmonisation
ISO	Isoproterenol
K_e	constante de eliminação
I_{Ca}	canais de cálcio do tipo L
LD	limite de detecção
Leuc	Leucócitos
LQ	limite de quantificação
Lyso-7	(5Z)-5-[(5-bromo-1H-indol-3-il)metileno]-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona)
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MFA	microscopia de força atômica
MRT	tempo médio de residência
NC	Nanocápsulas
NCX	trocador de sódio e cálcio
NP	Nanopartículas
NS	Nanoesferas
P.I.	padrão interno
PEG	poli(etileno) glicol
PLA	ácido poliláctico
PLA-PEG	Polímero dibloco do ácido poliláctico ligado covalentemente ao poli(etileno)glicol (PEG 2kDa)

BZO-PLA-PEG	Polímero dibloco do ácido poliláctico ligado covalentemente ao poli(etileno) glicol (PEG 2kDa) com inserção de grupos benzila ao longo da cadeia do bloco hidrofóbico de ácido poliláctico
HO-PLA-PEG	Polímero dibloco do ácido poliláctico ligado covalentemente ao poli(etileno)glicol (PEG 2kDa) com inserção de grupos hidroxila ao longo da cadeia do bloco hidrofóbico do ácido poliláctico
PLN	Fosfolambana
PLQ	Plaquetas
PPAR	receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs)
RS	retículo sarcoplasmático
RyR2	canal de rianodina do tipo 2
SERCA2	Bomba de cálcio-ATPase do tipo 2
SFM	sistema fagocitário mononuclear
SR	Sarcômero
TCC	triglicerídeos de cadeia longa
TCM	triglicerídeos de cadeia média
TZD	Tiazolidinedionas
$t_{1/2}$	tempo de meia vida plasmática
V_d	Volume aparente de biodistribuição

SUMÁRIO

RESUMO 6

ABSTRACT 8

LISTA DE FIGURAS 10

LISTA DE TABELAS 12

LISTA DE ABREVIATURAS 13

1. INTRODUÇÃO 19

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21

2.1 O papel das tiazolidinedionas 21

2.2 Mecanismo de contração dos cardiomiócitos 25

2.3 Nanocápsulas poliméricas 29

2.4 Avaliação pré-clínica de novas substâncias ativas 35

3. OBJETIVO GERAL 38

3.1 Objetivos específicos 38

CAPÍTULO I: Caracterização físico-química de nanocápsulas poliméricas convencionais e funcionalizadas contendo Lyso-7 39

1. INTRODUÇÃO 40

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 40

3. MATERIAIS 41

4. METODOLOGIAS 42

4.1 Preparo das nanocápsulas 42

4.2 Distribuição de tamanho e potencial zeta 43

4.3 Doseamento da Lyso-7 por cromatografia líquida de alta eficiência 43

4.4 Porcentagem e eficiência de encapsulação 44

4.5 Avaliação morfológica das NC por microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) 45

4.6 Hemólise 46

4.7 Análise estatística dos dados 47

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 47

5.1 Preparo das NC, tamanho e índice de polidispersão 47

5.2 Potencial zeta (ζ) 49

5.3 Eficiência de encapsulação 50

5.4 Análise morfológica por MFA e MEV 52

5.5 Avaliação da hemólise 56

CAPÍTULO II: Desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica para quantificação da Lyso-7 em tecidos de camundongo: aplicação em estudos de farmacocinética e de biodistribuição 59

1. INTRODUÇÃO 60

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 60

3. MATERIAIS 60

4. MÉTODOS 61

4.1 Desenvolvimento e validação bioanalítica para quantificação da Lyso-7 em tecidos de camundongo 61

4.2 Padrões de calibração 61

4.3 Condições cromatográficas 62

4.4 Animais 62

4.5 Preparo das amostras de tecidos 62

4.6 Desenvolvimento de método de extração 63

4.7 Parâmetros de validação 64

4.8 Estudo farmacocinético e de biodistribuição 65

4.9 Análise estatística dos dados 66

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 67

5.1 Validação bioanalítica 67

5.2 Perfil farmacocinético da Lyso-7 72

5.3 Biodistribuição da Lyso-7 77

CAPÍTULO III: Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e cardíacos da toxicidade da Lyso-7 livre e nanoencapsulada 86

1. INTRODUÇÃO 87

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 87

3. MATERIAIS 88

4. MÉTODOS 88

4.1 Avaliação da toxicidade aguda *in vivo* 88

4.1.1 Animais 88

4.1.2 Protocolo experimental 88

4.1.3 Análises hematológicas, hepática e renal 89

4.2 Avaliação da cardiotoxicidade 90

4.2.1 Animais 90

4.2.2 Isolamento de cardiomiócitos de camundongos 91

4.2.3 Contratilidade do cálcio 91

4.2.4 “Sparks” de cálcio 92

4.2.5 Influência da Lyso-7 sobre os cardiomiócitos in vitro 92

4.2.6 Avaliação da administração de NC contendo Lyso-7 sobre os cardiomiócitos in vivo 93

4.3 Análise estatística 94

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 94

5.1 Toxicidade aguda 94

5.2 Avaliação dos efeitos agudos da Lyso-7 sobre os cardiomiócitos *in vitro* 97

5.3 Avaliação dos efeitos crônicos in vivo da administração de Lyso-7 livre e encapsulada em NC em cardiomiócitos isolados 102

4. DISCUSSÃO GERAL 107

5. CONCLUSÃO 110

6. REFERÊNCIAS 111

7. APÊNDICE 124

1. INTRODUÇÃO

As tiazolidinodionas (TZD) são uma classe de fármacos usados no tratamento do diabetes como agentes que aumentam a sensibilidade à insulina (Yki-Jarvinen, 2004; Collin & Thiemermann, 2003). São agonistas sintéticos dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR-γ), que são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos, inflamação e aterosclerose, sendo esses responsáveis por regular o metabolismo de glicose e lipogênese, além de demonstrarem ter efeito anti-inflamatório e antiaterogênico (Takano e cols., 2000; Tavares e cols, 2007). Apesar dos benefícios apresentados pelas TZD na terapia do diabetes e da síndrome metabólica, foram relatados sérios efeitos adversos como toxicidade hepática, hematológica e ganho de peso (Yumei e cols*.,* 2008). Pioglitazona, Rosiglitazona e Troglitazona são exemplos de TZD já comercializadas, contudo as duas últimas foram retiradas do mercado por apresentarem os efeitos adversos relatados (Rosenson e cols*.,* 2012; Consoli & Formoso, 2013). Neste sentido, a busca por novos análogos das TZD, menos tóxicos, pode ser uma alternativa interessante.

Novas TZD foram sintetizadas por substituições no anel tiazolidínico ou eliminação do radical sulfonil e investigadas quanto a ação farmacológica e tóxica (Murthy & Srinivasa, 2003; Góes e cols*.,* 2004; Santos e cols., 2005; Uchôa e cols*.,* 2009; Santin e cols*.,* 2013a). Uma destas substâncias, denominada Lyso-7 [(5Z)-5-[(5-bromo-1H-indol-3-il)metileno]-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona], inibiu *in vitro* a produção de proteínas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e NO, ativou os receptores PPAR-γ, inibiu a COX, protegeu a mucosa estomacal frente à lesões induzidas por etanol/HCl e atenuou a progressão da aterosclerose *in vivo* pela modulação da inflamação e do metabolismo lipídico em camundongos (Santin e cols*.,* 2013a; Santin e cols*.,* 2013b; César e cols*.,* 2015). A Lyso-7 se mostrou, então, uma molécula promissora que deve ser investigada no tratamento de doenças inflamatórias. Contudo, sua alta lipofilicidade (log *P* = 5,64 ACD/Lab©) e consequente baixa solubilidade em água tende a reduzir a absorção oral, pela baixa velocidade de dissolução. Portanto, segundo a regra de Lipinski (Lipinski e cols.,

2001) pode-se predizer uma baixa biodisponibilidade pela via oral desta substância. Assim, a associação da Lyso-7 com nanocarreadores é uma estratégia interessante para permitir a sua administração intravenosa ou mesmo oral. Os nanocarreadores são sistemas que aumentam a dispersão em água de substâncias hidrofóbicas, controlam a liberação e, frequentemente, alteram os parâmetros farmacocinéticos e de biodistribuição dos fármacos a eles associados (Mosqueira e cols., 2006). Essas vantagens biofarmacêuticas podem ser ainda melhoradas com o uso de polímeros modificados. Portanto, neste trabalho propomos a associação da Lyso-7 a nanocápsulas preparadas a partir de polímeros derivados do ácido poliláctico (PLA) com funcionalizações ao longo da cadeia hidrofóbica de PLA.

A Lyso-7 é uma substância inédita e recentemente sintetizada (Santin e cols, 2013a). Assim, o desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos para o seu doseamento é essencial para a realização de estudos pré-clínicos. De acordo com os guias de segurança e toxicidade internacionais e com a ANVISA, diversas análises pré-clínicas devem ser realizadas com novas moléculas ou novas formas farmacêuticas. Estas análises incluem, dentre outros, testes farmacológicos, farmacocinética/toxicocinética e toxicidade aguda, além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica frente ao sistema cardiovascular, sistema nervoso central e sistema respiratório (ICH, 2009; EMA, 2010; ANVISA, 2013). Dessa forma, uma vez que a Lyso-7 é uma molécula inédita e, ainda, diante dos efeitos adversos ocasionados pelo o uso das TZD, como exacerbação e/ou indução de insuficiência cardíaca em pacientes diabéticos (Delea e cols., 2003; Cheng & Fantus, 2004; Lincoff e cols., 2007; Nissen & Wolski, 2007), torna-se necessária a avalição da toxicidade da Lyso-7 *in vitro* e *in vivo*.

Portanto, o presente trabalho está dividido em 3 partes. O capítulo 1 descreve o preparo e a caracterização físico-química de diferentes formulações de nanocápsulas poliméricas contendo a Lyso-7. No capítulo 2 estão descritos o desenvolvimento e a validação bioanalítica para o doseamento da Lyso-7 em amostras biológicas e os estudos de farmacocinética e biodistribuição da Lyso-7 livre e nanoencapsulada. Por fim, o capítulo 3 apresenta os testes de toxicidade, *in vitro* e *in vivo,* realizados com a Lyso-7 livre e associada aos carreadores poliméricos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O papel das tiazolidinedionas

As tiazolidinedionas (TZD) são agonistas dos receptores PPAR-γ indicadas no tratamento do diabetes por terem ação no aumento da sensibilidade à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, resultando no controle dos níveis glicêmicos (Ghazzi e cols., 1997). O PPAR-γ é um membro da família dos receptores nucleares que ativam fatores de transcrição que possuem função reconhecida na regulação de processos metabólicos. As três isoformas de PPAR (α, δ/β e γ) diferem entre si na distribuição, função e especificidade de ligação (Dreyer e cols*.,* 1993) (tabela 1). O PPAR-γ possui maior expressão no tecido adiposo (Chawla e cols*.*, 1994), sendo capaz de regular o metabolismo lipídico em adipócitos (Lehrke & Lazar, 2005) e estimular a adipogênese (Rosen e cols*.*, 1999). A importância dos receptores PPAR-γ é evidenciada pelas consequências severas descritas em pessoas que possuem mutações neste receptor. As mutações totais foram identificadas em pacientes que apresentaram lipodistrofia e outras desordens metabólicas (Hegele e cols*.*, 2002; Savage e cols., 2003), e os pacientes somente portadores de mutações apresentam hipertensão precoce severa, resistência à insulina e diabetes do tipo 2 (Barroso e cols., 1999). Como ligantes naturais de PPAR-γ enquadram-se os ácidos graxos, eicosanoides e componentes de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas (Desvergne & Wahli, 1999) e como sintéticos, as TZD (Chinetti e cols*.,* 2000).

O PPAR-γ é expresso principalmente no tecido adiposo e menos expresso no coração (Lee e cols*.,* 2009). Sob certas condições patológicas, os cardiomiócitos podem expressar uma grande quantidade de PPAR-γ, que podem gerar efeitos significativos na homeostase metabólica do coração e na sua função, como revisado por Lee e colaboradores (2013a). Contudo, o mecanismo exato de como os PPAR-γ regulam o metabolismo cardíaco ainda não está esclarecido. Uma vez que o PPAR-γ é um fator de transcrição, a proteção vascular proporcionada pela sua ativação com um ligante resulta de uma alteração no perfil de expressão de genes nos músculos vascularizados. No diabetes tipo II, a administração de TZD provoca aumento da atividade do PPAR-γ, o que altera a expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos e na utilização de glicose, resultando assim no

aumento da sensibilidade à insulina (Lincoff e cols., 2007). Evidências sugerem que na parede vascular, a ativação de PPAR-γ altera o balanço do estado pró-inflamatório, pró-aterogênico e pró-vasoconstrição para o estado anti-inflamatório, antiaterogênico e vasodilatação (Takano e cols, 2000). Consequentemente, durante o distúrbio metabólico, ocorre um aumento de ligantes endógenos de PPAR-γ que ativam o PPAR-γ vascular na tentativa de contrabalancear os potenciais efeitos adversos. Assim, interferentes que alterem a função do PPAR-γ nos músculos vascularizados, como descrito por Halabi e colaboradores (2008), bloqueiam a ocorrência dos efeitos protetores das TZD, levando a uma função vascular prejudicada e hipertensão, evidenciando o papel do PPAR-γ na regulação do tônus vascular.

Tabela 1: Correlação entre a distribuição tecidual e as respectivas funções das diferentes isoformas dos receptores PPAR

	PPAR-α	**PPAR-δ/β**	**PPAR-γ**	**Referências**
Distribuição tecidual	Fígado, tecido adiposo, músculo esquelético, coração, monócitos, macrófagos e linfócitos[A]	Altamente distribuído[B]	Tecido adiposo, músculo esquelético, cólon, pulmões e macrófagos[C]	[A]Mandard *e cols.*, 2004; [B]Peters *e cols.*, 2000; [C]Lazar, 2005
Efeitos biológicos	Aumenta a oxidação de ácidos graxos[A]; aumenta a concentração sérica de HDL-colesterol e diminui a de triacilgliceróis[D]; Efeito hipoglicemiante[E]; Efeitos anti-inflamatórios[F] e antiaterogênicos[G]; Diminui a hipertrofia do tecido adiposo[H]	Efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênicos[I]; Diminui a adiposidade[J]; melhora o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina[K]; aumenta a oxidação de ácidos graxos[L]	Promove a adipogênese, efeitos anti-inflamatórios, antiaterogênicos e sensibilizadores de insulina[M] Aumenta a concentração sérica de HDL-colesterol[N]; diminui a de triacilgliceróis[O] e de ácidos graxos livres[P]	[D]Staels *e cols.*, 1998; [E]Jones *e cols.*, 1990; [F]Delerive *e cols.*, 1999; [G]Li *e cols.*, 2004; [H]Stienstra *e cols.*, 2007; [I]Graham *e cols.*, 2005; [J]Wang *e cols.*, 2003; [K]Lee *e cols.*, 2006; [L]Qin *e cols.*, 2008; [M]Tontonoz & Spiegelman, 2008; [N]Szapary *e cols.*, 2006; [O]Yki-Jarvinen, 2004; [P]Maggs *e cols.*, 1998

O tratamento com agentes sensibilizadores de insulina, como as TZD, foi proposto como um meio para reduzir os eventos cardiovasculares em pacientes de

alto risco, como no caso dos diabéticos (Lincoff e cols., 2007). A pioglitazona e a rosiglitazona, agonistas PPAR-γ, surgiram como agentes promissores que aumentam a sensibilização à insulina. Estes medicamentos, como já exposto, possuem efeitos favoráveis em muitos marcadores e fatores de risco cardiovasculares, como a dislipidemia, a hipertensão, a proteína C reativa e a espessura da camada íntima-média da carótida (Diamant & Heinhe, 2003). Todavia, dados de ensaios pré-clínicos revelaram que estes agentes também podem causar edema e ganho de peso, o que resulta na exacerbação da insuficiência cardíaca (IC) (Lincoff e cols., 2007; Nissen & Wolski, 2007). Os mecanismos que resultam em edema, ganho de peso e IC nos pacientes que receberam estas TZD são multifatoriais e ainda não foram completamente esclarecidos. Acredita-se que o surgimento de edema está correlacionado a uma diminuição na excreção de sódio e de um aumento da retenção de sódio e água (Diamant & Heinhe, 2003). O uso concomitante dessas TDZ e insulina tem demonstrado aumentar o volume de plasma, promovendo vasodilatação arterial (Diamant & Heinhe, 2003).

Dados publicados após a comercialização de TZD indicaram que os sintomas de IC estavam ocorrendo não apenas em pacientes com doença cardíaca preexistente, mas também em pacientes sem histórico (Delea e cols., 2003; Cheng & Fantus, 2004). Foram relatados casos de pacientes que desenvolveram edema pulmonar grave, resultando em choque cardiogênico (Cheng & Fantus, 2004). Um estudo publicado em 2010 comparou pacientes que utilizaram pioglitazona ou rosiglitazona e revelaram que a rosiglitazona não só aumenta o risco de IC, como aumenta o risco de acidente vascular cerebral (Graham e cols., 2010). Não existem dados suficientes e robustos que demonstrem que a terapia com TZD pode exacerbar a IC preexistente ou promover seu desenvolvimento, particularmente em populações de alto risco (Maxwell & Jenkins, 2011). Contudo, a rosiglitazona foi retirada do mercado devido ao aumento do risco cardiovascular (Nissen & Wolski, 2007). A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) concluiu que a relação risco-benefício da pioglitazona permanece positiva (EMA, 2011), mas ela é contra indicada em pacientes com histórico de câncer de bexiga (Lewis e cols., 2011; Azoulay e cols., 2012).

A IC pode existir como uma desordem crônica progressiva ou pode se manifestar como uma exacerbação aguda de uma doença cardiovascular (DC) necessitando de atenção médica de urgência. É uma síndrome que é caracterizada pela incapacidade do coração em bombear o sangue adequadamente para garantir a demanda metabólica do corpo. A IC representa a maior causa das DC, como resultado do progresso de outras alterações cardíacas como a hipertensão e a doença arterial coronária. Na IC, a contratilidade desordenada do miocárdio resulta em disfunção sistólica. As DC são a principal causa de morte no mundo, sendo estimadas 17,5 milhões de mortes em 2012, representando 31% de todas as causas de mortes (OMS, 2015). De acordo com a OMS, por volta de 2030 mais de 23 milhões de pessoas poderão morrer anualmente por DC. Cuidados especiais com pacientes com IC incluem não somente uma farmacoterapia apropriada, mas a adesão às medidas não farmacológicas adequadas. Uma estratégia essencial que deve ser seguida no manejo com estes pacientes é eliminar ou minimizar o uso de substâncias que podem exacerbar a IC. Fármacos que induzem IC são relativamente comuns, mas é difícil definir com precisão o seu mecanismo de ação, uma vez que os pacientes muitas vezes têm outros fatores de risco que podem contribuir para o surgimento ou aumento da disfunção cardíaca (Maxwell & Jenkins, 2011). Para tal, é necessário realizar um rastreamento da atividade cardiotóxica com diferentes fármacos que não são destinados às terapias de disfunções cardiovasculares, como por exemplo, as TZD.

A IC induz alterações nas funções do coração, com redução da fração de ejeção e do débito cardíaco, o que é associado com a diminuição da força de contração dos cardiomiócitos em humanos e roedores. O mecanismo de contração dos cardiomiócitos ocorre devido à ação de íons através da membrana plasmática, que irão gerar mudanças no potencial de repouso do cardiomiócito, favorecendo assim a ocorrência da contração celular em detrimento à geração de um potencial de ação. O fluxo de íons através de canais específicos permite que organelas especializadas dentro das células sejam ativadas e ocorra a liberação de cálcio a partir de estoques intracelulares. O cálcio liberado é o responsável pela ativação do mecanismo de contração da célula e este processo é finalizado quando o excesso de cálcio é sequestrado (Bers, 2002).

A indução do aumento dos níveis de cálcio intracelular (Ca^{2+}_i) durante o processo de sístole induzido por um potencial de ação é denominado Acoplamento Excitação/Contração (AEC). Este fenômeno é um dos principais mecanismos que regulam de maneira adequada a contração das células cardíacas. Desordens no AEC, bem como dos componentes celulares e intracelulares que o regulam, podem acarretar diversas doenças cardiovasculares, muitas delas letais (Bers, 2002).

Uma vez que a sinalização de Ca^{2+} é um componente fundamental da função celular, particularmente dentro do sistema cardiovascular, além dos dados publicados associando a rosiglitazona com resultados de indução de IC (Nisen & Wolski, 2007; Singh e cols., 2007), a investigação da relação entre as TZD e modulações na Ca^{2+}_i tem grande importância para a avaliação da segurança no uso de novas TZD.

2.2 Mecanismo de contração dos cardiomiócitos

A principal organela que estoca o Ca^{2+}_i é o retículo sarcoplasmático (RS). Nele são encontrados importantes receptores, canais e proteínas, que regulam a entrada e a saída de Ca^{2+} desta organela. As unidades sarcoméricas dos cardiomiócitos são compostas, na sua maioria, por filamentos de actina e miosina que constituem a maquinaria de contração celular, juntamente com a tropomiosina e o complexo troponina. Quando o Ca^{2+} se liga à troponina C, o complexo muda a sua conformação e a troponina I se move permitindo a ligação actina-miosina, enquanto a troponina T se liga ao complexo tropomiosina. A seguir, a extremidade da miosina se liga à actina e se dobra para que os filamentos deslizem em sentidos opostos causando o encurtamento da célula. Este processo é explicado pelo modelo de filamentos deslizantes (Bers, 2002; Bers, 2001). Após a liberação de Ca^{2+} da troponina C, a maquinaria retorna a sua conformação inicial e aguarda o próximo ciclo de contração.

O rápido aumento na concentração de Ca^{2+}_i ($[Ca^{2+}]_i$) provoca o encurtamento total do cardiomiócito, como já descrito. De maneira oposta, o decaimento de Ca^{2+}

causa o relaxamento da célula. Os detalhes dos eventos intracelulares que regulam e promovem a liberação de Ca^{2+} estão ilustrados na figura 1.

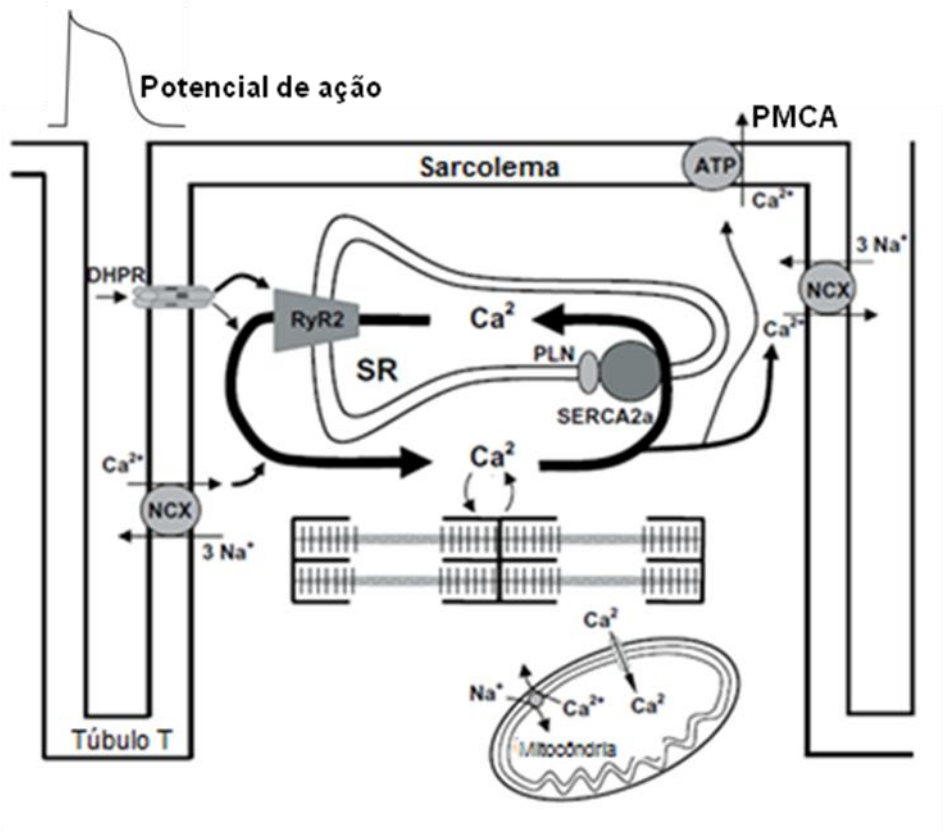

Figura 1: *Mecanismo de excitação/contração de miócitos ventriculares. O influxo de Ca^{2+}, ativado pelo potencial de ação, através dos canais DHPR (canal de Ca^{2+} do tipo L) e NCX (trocador de Na^{+}/Ca^{2+}) induz a liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RS) através do canal de rianodina (RyR2) e ativa os miofilamentos. Após a ocorrência da contração, o Ca^{2+} é recaptado pelo SERCA2a no RS, o qual tem sua atividade modulada pela fosfolambana (PLN). Adicionalmente, o Ca^{2+} pode ser transportado para o interior da mitocôndria via o transportador uniporte de Ca^{2+} e colocado no citoplasma pelo transportador NCX (adaptado de Bers, 2002).*

O trabalho mecânico desempenhado pelo coração é regulado pelo controle da $[Ca^{2+}]_i$ e esta concentração de Ca^{2+} varia de maneira organizada ao longo do processo de contração. Inicialmente, a ativação da contração celular ocorre pela ativação dos canais iônicos sensíveis a voltagem presentes na membrana. Os receptores de diidropiridina (DHPR) são canais de Ca^{2+} do tipo L ($I_{Ca,L}$) que permitem o aumento do influxo de Ca^{2+}, sendo assim, responsáveis pela inicialização da

contração celular (Bers, 2002). O aumento do $[Ca^{2+}]_i$ resultante estimula o receptor de rianodina do tipo 2 (RyR2) a liberar o Ca^{2+} do RS. A co-localização dos sistemas de transporte de Ca^{2+} ($I_{Ca,L}$ e o trocador de Na^+/Ca^{2+}, denominado NCX) nos túbulos transversos do cardiomiócito e o completo RyR2 no RS asseguram um mecanismo rápido e eficiente. Além disso, a liberação localizada de Ca^{2+} (*sparks* de Ca^{2+}) coordena e gerencia a $[Ca^{2+}]_i$, que também induz a contração celular (Gomez e cols*.,* 1997; Lindner e cols*.,* 2002; Loughrey e cols*.,* 2002).

Além do RyR2, na membrana do RS é encontrado um canal denominado Ca^{2+}-ATPase do RS (SERCA2A). Este canal é um dos principais responsáveis pela regulação de $Ca^{2+}{}_i$, promovendo o sequestro de Ca^{2+} para dentro do RS durante o processo de diástole, utilizando ATP. Assim, após a contração, uma grande quantidade de Ca^{2+} é sequestrado (decaimento de Ca^{2+}) pelo SERCA2a, que possui sua atividade regulada pela fosfolambana (PLN). Dessa forma, SARCA2a aumenta a concentração de Ca^{2+} no RS, ao passo que o trocador NCX e a bomba Ca^{2+}-ATPase do sarcolema (denominada PMCA) translocam o Ca^{2+} para o meio extracelular (Bers, 2002).

Um estudo realizado por Lee e colaboradores (2013b) demonstrou que o diabetes e a hipertensão modulam a regulação dos níveis de Ca^{2+} e, além disso, que a rosiglitazona (agonista PPAR-γ), quando usada em pacientes diabéticos e hipertensos, altera significativamente a homeostase do Ca^{2+} e suas características eletrofisiológicas, o que pode ter um potencial arritmogênico (Lee e cols*.,* 2013b). Neste contexto, torna-se necessário não somente avaliar os efeitos benéficos como também entender os mecanismos que controlam a função cardiovascular dos agonistas PPAR.

Várias TZD têm sido sintetizadas e muitas outras se encontram em estágios pré-clínicos e clínicos de desenvolvimento. Todas elas compartilham uma estrutura tiazolidina-2,4-diona substituída, onde são realizadas modificações químicas seletivas, na tentativa de melhorar a eficácia farmacológica e minimizar os efeitos colaterais desses agentes. Uma dessa substância é denominada Lyso-7, (5Z)-5-[(5-bromo-1H-indol-3-il)metileno]-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona), PM 447,73 g/mol (figura 2), que é o alvo de estudo do presente trabalho.

A Lyso-7 reduz a produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como a IL-1β e o NO em camundongos, confirmando seu efeito na resposta inflamatória (Santin e cols*.,* 2013a). Santin e colaboradores (2013a) demonstraram que a Lyso-7 reduz a migração de neutrófilos nos sítios de inflamação em doses menores (3 mg/Kg) que as doses necessárias para os mesmos efeitos com a indometacina (10 mg/Kg), o celecoxibe (10 mg/Kg) e a pioglitazona (50 mg/Kg), após a administração oral em camundongos (Santin e cols*.,* 2013a). A eficácia da Lyso-7 no estudo mencionado reflete duas ações combinadas: a ativação de PPAR-γ, que influencia o processo de migração celular para as regiões com inflamação, e a inibição das enzimas COX (Santin e cols*.,* 2013a). Os autores também demonstraram que a administração oral de 25 mg/Kg de Lyso-7 tem efeito protetor do dano tecidual gástrico induzido por Etanol/HCl, através da inibição da migração de neutrófilos e da alteração no equilíbrio eNOS/iNOS, também em camundongos (Santin e cols*.,* 2013b). Assim, a Lyso-7 é uma substância promissora que pode ter aplicação no tratamento de doenças inflamatórias e na aterosclerose. Além disso, a Lyso-7 possui ação parcial como agonista PPAR-α e β/δ, que corrobora com sua ação como pan agonista do PPAR (Santin e cols*.,* 2013a; Santin e cols*.,* 2013b). É relatado que os pan agonistas PPAR possuem efeitos benéficos na terapia de pacientes com síndrome metabólica (Collin & Thiemermann, 2003; Yumei e cols*.,* 2008; Rosenson e cols*.,* 2012; Consoli & Formoso, 2013).

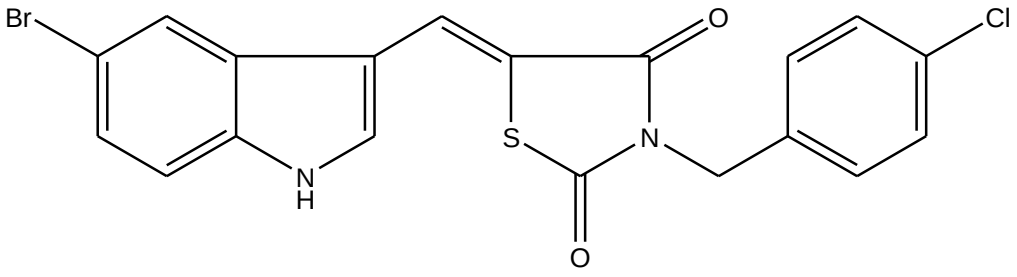

Figura 2*: Estrutura química da Lyso-7****.***

A Lyso-7 possui uma baixa solubilidade em água (log $P_{estimado}$ = 5,64, ACD/Lab©) o que pode ocasionar uma baixa biodisponibilidade oral (Stegemann e cols., 2007). Assim, a associação da Lyso-7 a sistemas nanodispersos pode ser adequada para a sua administração oral ou intravenosa, aumentando a dispersibilidade dessa molécula em água para administração parenteral (Mosqueira

e cols., 2001b). O desenvolvimento e a caracterização de formulações de nanocápsulas poliméricas contendo a Lyso-7 são propostos neste trabalho.

Neste sentido, vários trabalhos já demonstraram que as nanocápsulas (NC) poliméricas permitem alteração dos perfis de libertação dos fármacos encapsulados (Mora-Huertas e cols, 2011; Branquinho e cols, 2014; Vidal, 2014) e que podem também reduzir significativamente a toxicidade geral de fármacos cardiotóxicos (Leite e cols., 2007, Vidal, 2014). As NC poliméricas alteram o perfil farmacocinético do fármaco associado (Mosqueira e cols., 2004; Mohanraj & Chen, 2006, Attli-Qatri e cols, 2013).

Além disso, foi demonstrado que o encapsulamento da TZD, pioglitazona, em nanopartículas (NP) poliméricas aumentou a eficácia de revascularização em modelo de isquemia, melhorando o efeito terapêutico do fármaco em camundongos (Nagahama e cols., 2012). O uso de diferentes tipos de polímeros biodegradáveis no preparo de sistemas nanoparticulados é uma das estratégias utilizadas na tentativa de melhorar os parâmetros farmacinéticos/farmacodinâmicos de fármacos encapsulados (Mosqueira e cols, 2004; Attli-Qatri e cols, 2013; Branquinho, 2014).

2.3 Nanocápsulas poliméricas

Os avanços na química dos polímeros e na físico-química dos colóides resultaram na produção de novos compostos poliméricos que foram sintetizados sob medida para a liberação e o encapsulamento específico de diferentes substâncias ativas. Os nanocarreadores poliméricos destinados à administração intravenosa de fármacos necessitam ser biodegradáveis, biocompatíveis e, preferencialmente, com propriedades de liberação controlada (Moghimi e cols., 2012).

O método mais utilizado na produção de nanocápsulas é a nanoprecipitação, também chamado de deposição interfacial de um polímero pré-formado seguida de evaporação do solvente (Fessi e cols., 1989). Este método é baseado na precipitação espontânea do polímero que é dissolvido numa fase orgânica, miscível com uma fase aquosa (Fessi e cols., 1989; Mora-Huertas e cols., 2011). A

deposição do polímero na interface entre a água e o solvente orgânico, causado pela rápida difusão do solvente, leva a formação instantânea de uma suspensão coloidal. Adicionalmente, quando um pequeno volume de óleo é incorporado à fase orgânica, são obtidas as NC (Bilensoy e cols*.,* 2006; Rao & Geckeler, 2011). Assim, podem ser obtidos dois tipos diferentes de NP, nanoesferas (NS) e nanocápsulas (NC), com estrutura matricial e vesicular, respectivamente. O núcleo oleoso das NC age como um reservatório, onde o fármaco poderá estar dissolvido ou disperso, circundado por uma parede polimérica. Em alguns casos o fármaco poderá também se adsorver na superfície da NC (Rao & Geckeler, 2011). A nanoprecipitação é um processo cineticamente controlado, possui uma metodologia simples e rápida, não requer alta energia de agitação, sonicação ou temperaturas elevadas e, geralmente, produz NP de tamanho reduzido (100-250 nm), com baixo índice de polidispersão, altos rendimentos de encapsulação de fármacos lipofílicos em relação a outras metodologias para a produção de NC (Mora-Huertas e cols., 2011).

Os polímeros com aplicação biológica mais amplamente utilizados no preparo de NS e NC são os poliésteres biodegradáveis, como por exemplo, o ácido polilático (PLA), o ácido poliglicólico (PGA), o copolímero de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) e a poli-ε-caprolactona (PCL). Dentre as suas vantagens, estão a biocompatibilidade e degradação controlada em monômeros também biocompatíveis (Singh e cols*.*, 2008) e inócuos. A degradação acontece por hidrólise de suas ligações éster (Sinha e cols*.*, 2004) e formação de produtos facilmente eliminados pelo organismo pelo ciclo do ácido cítrico (Makino e cols*.*, 2002). Esses polímeros são sintetizados através de polimerização por abertura de anel de lactonas cíclicas (Makino e cols*.,* 2002). O PLA pertence ao grupo de poliésteres alifáticos lineares, geralmente sintetizados a partir do dilactídeo (Vert, 2015). Por ser biodegradável e pouco tóxico, seu uso foi aprovado pela Agência Regulatória Americana (FDA, Food and Drug Adminstration) para administração intravenosa e intramuscular (Makino e cols*.*, 2002) em humanos.

Os copolímeros em bloco de natureza anfifílica possuem propriedades de autoagregação e de hidrofilia/lipofilia ajustáveis de acordo com a natureza de cada bloco. Os copolímeros podem ser divididos em quatro tipos principais com base na sua arquitetura, ou seja, como os blocos são ligados entre si (figura 3), sendo elas:

1) copolímeros em bloco: copolímeros lineares onde o grupamento final de uma cadeia polimérica está covalentemente ligado à porção inicial da outra, gerando arquiteturas do tipo dibloco ou tribloco (Kakizawa & Kataoka, 2002); 2) copolímeros grafitados: copolímeros que possuem ramificações ligadas a uma cadeia principal, podendo ser grupamentos químicos, moléculas ou ligantes específicos; 3) copolímeros aleatórios: copolímeros lineares com blocos dispostos aleatoriamente (Qiu & Bae, 2006); 4) copolímeros alternados: copolímeros lineares com arranjo alternando dos blocos poliméricos.

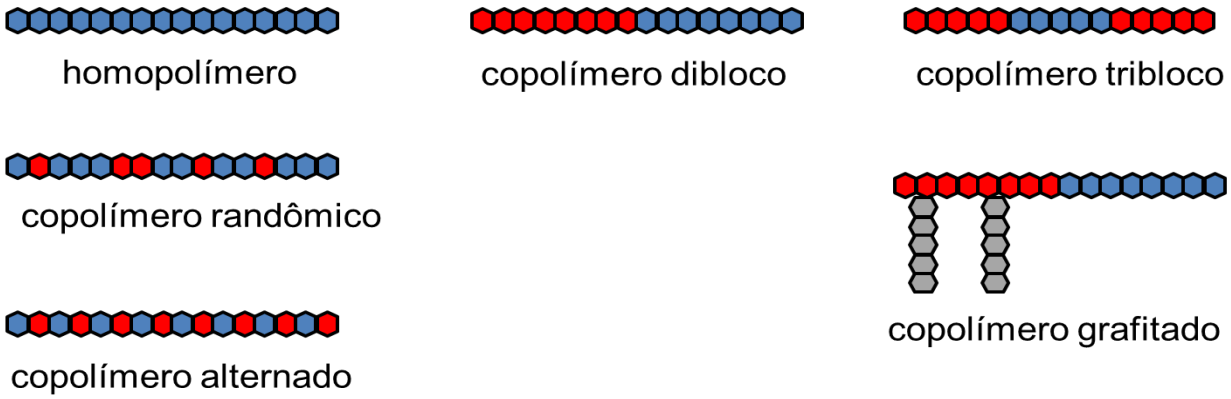

Figura 3: *Arquitetura de copolímeros lineares (adaptado de Qui & Bae, 2006).*

Vários trabalhos têm se dedicado à funcionalização dos poliésteres, objetivando a modificação química das extremidades das cadeias, visando a obtenção de copolímeros ramificados (Rabanel e cols, 2015) ou grafitados (Essa e cols., 2010). Nos poliésteres lineares, somente a funcionalização no fim da cadeia é possível. Assim eles não possuem número suficiente de grupos funcionais para ampliar o número reações com moléculas que permitam diferentes aplicações potenciais (Finne, 2004). Uma das técnicas mais utilizadas é o crescimento da cadeia de PLA a partir da hidroxila terminal do monometoxipolietilenoglicol (MeO-PEG). Esta reação gera polímeros dibloco do PLA com o PEG.

A presença do PEG como parte da cadeia do PLA no preparo das suspensões coloidais de NP permite a formação de micelas ou de NS ou de NC. As cadeias de PEG em bloco tendem a se organizar na superfície dos nanoagregados formados e podem revestir a superfície das partículas, criando uma barreira estérica

capaz de reduzir a adsorção de opsoninas em sua superfície (Gref e cols., 1995; Mosqueira e cols., 2001a) (figura 4). A modificação da superfície das NP poliméricas pela hidrofilização utilizando cadeias de polímeros altamente solvatados pela água, pode induzir ao efeito de circulação sanguínea prolongada pelo retardo do reconhecimento pelo sistema imune, o que muitas vezes e denominado furtividade. Essa propriedade e eficientemente conseguida com a ligação covalente de cadeias de PEG (Gref e cols, 1994). Consequentemente, este revestimento retarda o reconhecimento das NP pelas células do sistema mononuclear fagocítico (SMF), que passam a circular no sangue por um período maior de tempo (Peracchia e cols., 1997; Gref e cols., 2000), quando comparadas com as nanopartículas preparadas com polímeros sem a presença de PEG, denominadas não modificadas ou convencionais.

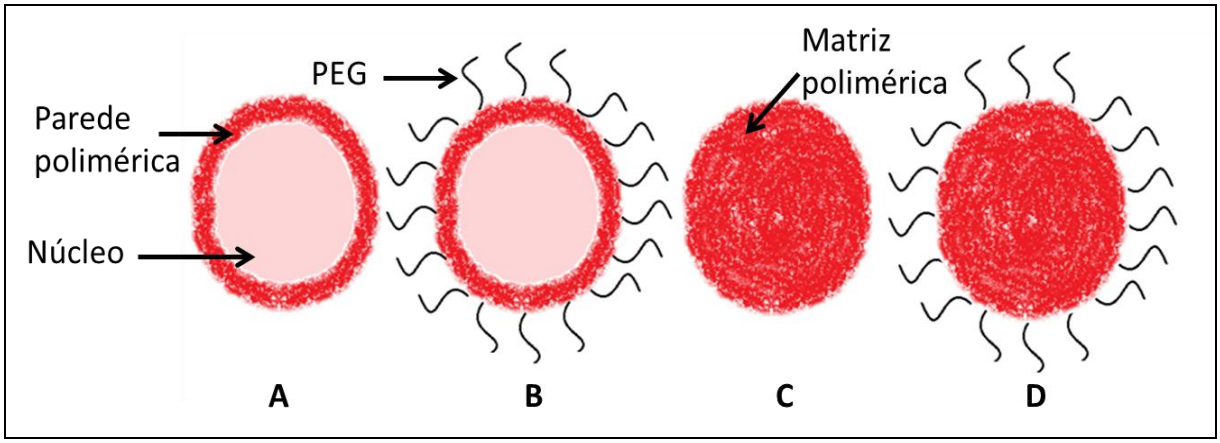

Figura 4: *Representação esquemática de nanocápsulas (A e B) e nanoesferas (C e D) poliméricas: A) NC convencional; B) NC estericamente estabilizada por cadeias de PEG; C) NS convencional; D) NS estericamente estabilizada por cadeias de PEG.*

A encapsulação da Lyso-7 em NC de PLA e NC de PLA-PEG foi avaliada pelo nosso grupo de pesquisa (Garcia, 2011), bem como o perfil de liberação *in vitro* (figura 5). Foi observado que a velocidade de liberação está diretamente relacionada à hidrofilia do polímero, ou seja, as NC PLA-PEG favorecem a captação de água (mais hidrofílico), facilitando a dissolução do fármaco e gerando uma liberação mais rápida quando comparada com as NC PLA.

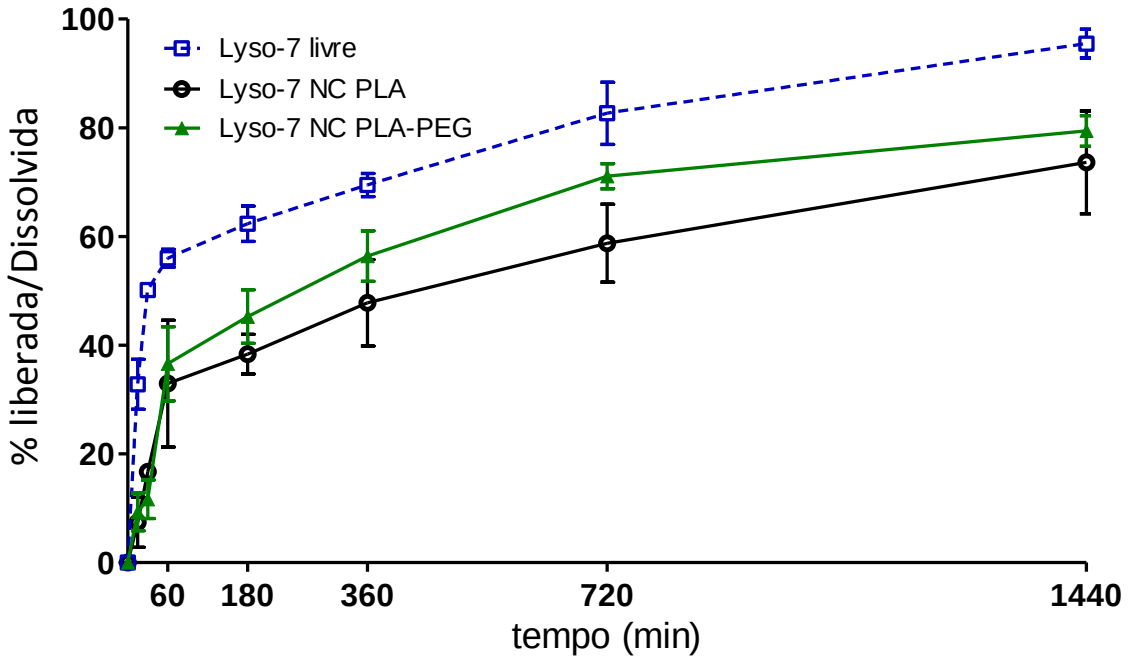

Figura 5: *Perfil de liberação in vitro de NC de Lyso-7 na concentração de 0,5 mg/mL em PBS, utilizando os polímeros PLA e PLA-PEG (Garcia, 2011).*

Além do PEG ligado a blocos de polímeros hidrofóbicos, outros grupos funcionais podem ser inseridos no bloco hidrofóbico do copolímero objetivando alterar ainda mais a natureza e a hidrofilia do bloco hidrofóbico adicionando funcionalidades adicionais a eles.

Neste sentido, utilizando o método de nanoprecipitação, Garcia (2011) preparou NS poliméricas a partir de copolímeros de PLA ligados covalentemente ao PEG (PLA 18000 g/mol, PEG 2000 g/mol) (figura 6), para a formação de NS e NC contendo diversas alterações na parte hidrofóbica do bloco de PLA. Foram utilizados novos copolímeros do tipo PLA-PEG, funcionalizados em sua porção hidrofóbica (PLA) pela inserção randômica de grupamentos químicos, originados da reação com epóxidos (alil glicidil éter e benzil glicidil éter), os quais após a reação geram monômeros aleatoriamente inseridos na cadeia de PLA com potencial de acoplamento com ligantes (Mosqueira e cols., 2009), como grupamentos hidroxil (HO-PLA-PEG) e benzil (BZO-PLA-PEG), respectivamente. As NS produzidas com o polímero PLA-PEG apresentaram um tamanho inferior (116 nm), quando comparado a NS de do homopolímero PLA (206 nm), o que indica a alteração das propriedades anfifílicas do polímero. Além disso, a introdução dos grupos hidroxil ou benzil na cadeia hidrofóbica induziu um aumento do tamanho das NS, em 50 e 80 nm,

respectivamente, o que sugere uma organização diferenciada desses polímeros provavelmente para acomodação desses grupamentos inseridos que podem alterar a organização tridimensional do polímero.

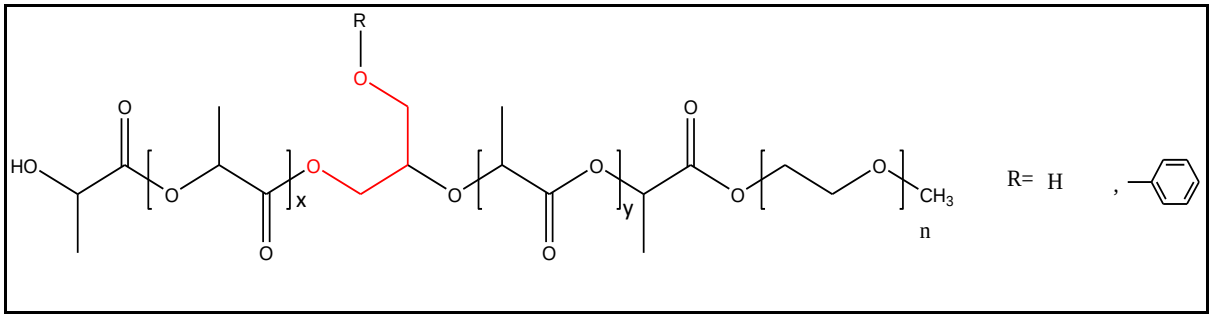

Figura 6: *Estrutura química dos copolímeros em bloco obtidos a partir da reação do monometoxi-polietilenoglicol com o dilactídeo em presença de epóxidos inseridos randomicamente na cadeia linear do PLA, contendo a inserção de grupos (em vermelho) na parte hidrofóbica do PLA, e os grupos substituintes (Mosqueira e cols., 2009).*

Os fármacos associados aos nanocarreadores apresentam, na sua grande maioria, perfis farmacocinéticos e de biodistribuição distintos quando comparados a substância não encapsulada, o que pode alterar o seu destino *in vivo*, a toxicidade e a eficácia. Além disso, modificações na superfície das NP, como a inserção de PEG, alteram drasticamente o perfil farmacocinético e de biodistribuição das substâncias quando comparadas com partículas sem PEG, como já observado por diversos autores (Mosqueira e cols., 2004*;* Pereira e cols*.,* 2009). Os mecanismos responsáveis pela depuração plasmática e tecidual destes coloides dependem de suas características como composição, tamanho, formato e modificações de superfície. A síntese de polímeros com propriedades diferenciadas permitem um maior controle dessas características, como já amplamente divulgado (Alexis e cols*.,* 2008). Além disso, outra característica importante dos vetores coloidais é a capacidade de reter e, assim, controlar a liberação de um agente terapêutico. Isso permite uma concentração mais sustentada da substância ativa no organismo, que pode reduzir a dose necessária e consequentemente, os efeitos tóxicos do fármaco associado (Moghimi e cols*.*, 2012). Nesse sentido, diante das vantagens descritas do uso de nanocarreadores poliméricos, a associação da Lyso-7, molécula lipossolúvel, as NC poliméricas podem ser uma estratégia interessante na modulação da sua farmacocinética e biodistribuição. Além disso, o uso das TZD na prática clínica é limitado em função dos efeitos adversos já abordados e sendo a

Lyso-7 uma substância inédita, torna-se necessário a avaliação da sua toxicidade e segurança, conforme preconizado pelos guias de segurança de novas substâncias candidatas ao uso terapêutico (ICH 2012, ANVISA 2013).

2.4 Avaliação pré-clínica de novas substâncias ativas

Os ensaios pré-clínicos ocorrem antes de se iniciar os ensaios clínicos humanos e são uma ferramenta útil na comprovação da eficácia e segurança antes dos ensaios clínicos em humanos. Nestes ensaios é fundamental o doseamento preciso da nova substância e de seus metabólitos nos fluidos corporais, para o desenvolvimento de uma formulação com dosagem apropriada garantindo as concentrações eficazes mínimas para garantir a ação farmacológica e ausência de toxicidade adequadas em animais com o objetivo de extrapolação para as doses a serem investigadas em humanos (Gad 2008).

Uma das etapas na avaliação não clínica de novas substâncias ativas ou novas formas farmacêuticas é a avaliação de sua segurança, que podem ser realizadas em dose única (toxicidade aguda), subaguda (superior a 90 dias) e toxicidade após a administração de doses repetidas (toxicidade crônica) por longos prazos, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade. Além disso, devem ser realizados estudos de segurança farmacológica e toxicocinética (farmacocinética e biodistribuição). As agências regulamentadoras preconizam, de modo geral, que os estudos de segurança devem ser conduzidos em duas espécies, roedores e não roedores, com intuito de auxiliar na extrapolação dos dados de toxicidade para os humanos (ICH 2012, ANVISA 2013).

Diversos fatores devem ser avaliados na escolha do modelo experimental adequado. Primeiramente, é necessário obter informações prévias das semelhanças e diferenças entre o perfil farmacocinético no animal de escolha e no homem. Além disso, deve-se considerar a facilidade da reprodução ou aquisição da espécie, o tempo de crescimento/desenvolvimento e a facilidade de manuseio em condições experimentais. De acordo com essas informações, ratos e cães têm sido comumente utilizados em investigações de segurança (OMS, 2004).

O estudo toxicológico de dose aguda é um dos testes que pode integrar uma bateria de análises a serem realizados dentro do estudo pré-clínico (Robinson e cols. 2009). Com base nas diferentes regulamentações preconizadas por diversos órgãos internacionais para estudo de toxicidade aguda (EMA 2010; ICH 2012), tais investigações devem ser conduzidas em animais saudáveis, de origem conhecida, com peso e idade adequados. Os guias preconizam ainda que o período de acompanhamento dos animais seja de no mínimo quatorze dias pós-tratamento e que, em todos os grupos experimentais sejam avaliados mortalidade, sinais clínicos incluindo parâmetros comportamentais, peso corporal, consumo de alimento e água, patologias clínicas (hematologia e bioquímica), latência, duração e reversibilidade da toxicidade, investigações anatomo/histopatológica e oftalmologia, se for o caso (EMA 2012).

As agências regulamentadoras também preconizam como parte do estudo não clínico avaliação da farmacocinética, toxicocinética e biodistribuição de novos compostos. Um conhecimento abrangente sobre absorção, distribuição, metabolização e eliminação de um novo composto é necessário para o planejamento e a interpretação dos estudos farmacológicos e toxicológicos. Os estudos de distribuição tecidual são essenciais para fornecer informações sobre a distribuição e o acúmulo do composto e seus metabólitos, especialmente em relação aos potenciais sítios de ação. Essas informações podem ser úteis para o desenho dos estudos futuros e para interpretação dos seus resultados (ICH, 1994).

Como mencionado anteriormente, o uso das TZD na prática clínica é limitado em função de seus efeitos adversos como edema, ganho de peso indução e exacerbação de insuficiência cardíaca. Neste contexto, a avaliação da bioquímica clínica da Lyso-7 em sua forma livre e associada a nanocarreadores é de suma importância, principalmente os parâmetros que avaliem a função cardíaca e renal. (Diamant & Heinhe, 2003; Lincoff e cols., 2007; Nissen & Wolski, 2007; Endo e cols., 2011).

Portanto, a associação da Lyso-7, uma nova TZD, a NC poliméricas destinadas à melhoria de sua biodisponibilidade e eficácia, associado aos relatos dos potenciais efeitos adversos desta classe, são importantes para auxiliar na avalição do seu perfil farmacológico e farmacodinâmico. Além disso, o estudo da

cardiotoxicidade *in vitro* e *in vivo* dessa molécula em fase investigacional representa uma contribuição importante para se esclarecer o seu efeito sobre o sistema cardiovascular e na obtenção de maiores informações sobre a sua segurança terapêutica.

3. OBJETIVO GERAL

Esta tese tem como objetivo investigar a modulação da farmacocinética e biodistribuição de NC poliméricas produzidas com derivados do ácido lático no encapsulamento da Lyso-7, uma nova TZD, bem como avaliar a segurança da sua administração mediante o estudo de toxicidade aguda e cardíaca.

3.1 Objetivos específicos

1. Avaliar do uso de diferentes polímeros derivados do PLA nas características físico-químicas de NC contendo Lyso-7;
2. Avaliar o efeito da administração dessas NC poliméricas na farmacocinética e biodistribuição em camundongos;
3. Avaliar das toxicidades aguda e cardíaca da Lyso-7 livre e nanoencapsulada.

CAPÍTULO I

Caracterização físico-química de nanocápsulas poliméricas convencionais e funcionalizadas contendo Lyso-7

1. INTRODUÇÃO

Como já mencionado, as TZD, apesar dos efeitos positivos no tratamento do diabetes, possuem indicação limitada devido aos graves efeitos adversos apresentados. Com o objetivo de reduzir essas complicações e manter a atividade farmacológica, novas TZD vêm sendo sintetizadas, sendo uma delas a Lyso-7. Assim, por ser uma molécula lipossolúvel (log *P* = 5,64 ACD/Lab© software), a sua associação a NC pode ser uma estratégia interessante para aumentar a dispersibilidade em água, permitindo sua administração por várias vias, inclusive a parenteral. O encapsulamento de ativos com solubilidade limitada tem como objetivo aumentar a biodisponibilidade, controlar a liberação permitindo a obtenção de doses eficazes mais sustentadas no local de ação e ainda reduzir picos de concentração muito elevados que aumentam o risco de toxicidade. Os mecanismos responsáveis por essas vantagens dos nanocarreadores dependem de suas características físico-químicas, como composição química, tamanho, formato e modificações de superfície. Neste sentido, foram preparadas NC poliméricas de PLA, PLA-PEG e PLA-PEG funcionalizado, através da inserção de hidroxil (HO-PLA-PEG) ou benzil (BZO-PLA-PEG) ao longo da cadeia do PLA, contendo Lyso-7 (figura 2 e figura 6). Estas NC foram caracterizadas a fim de se avaliar comparativamente os efeitos dos diferentes polímeros, e em especial suas modificações químicas, na capacidade de encapsulação da Lyso-7. Além disso, a caracterização físico-química visa auxiliar na compreensão do comportamento desses diferentes nanocarreadores produzidos após a administração *in vivo* e seus efeitos na farmacocinética e biodistribuição da Lyso-7.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar as NC poliméricas convencionais e funcionalizadas brancas (sem a Lyso-7) e contendo a Lyso-7 pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados seguida de evaporação do solvente;

2. Caracterizar físico-química das formulações quanto à distribuição de tamanhos pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons;
3. Avaliar do potencial zeta destas NC, antes e após a encapsulação da Lyso-7, pela técnica de anemometria do laser doppler associada a microeletroforese;
4. Quantificar a Lyso-7 por cromatografia de alta eficiência associada ao detector de ultravioleta nas diferentes formulações obtidas de NC e determinar as porcentagens e eficiências de encapsulação usando a técnica de separação de ultrafiltração/centrifugação;
5. Caracterizar morfologicamente as formulações de NC por microscopia de força atômica (MFA) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3. MATERIAIS

Para o preparo das NC poliméricas foram utilizados o ácido poliláctico (PLA) e seus derivados dibloco (PLA-PEG). Também foram utilizados os copolímeros PLA-PEG funcionalizados randomicamente ao longo da cadeia de PLA por inserção de monômeros contendo grupos hidroxil (HO-PLA-PEG) ou benzil (BZO-PLA-PEG). Estes polímeros foram sintetizados e caracterizados na Universidade de Montréal (Canadá) no Laboratório do Professor Patrice Hildgen pela Professora Vanessa Mosqueira, como já relatado (Mosqueira e cols., 2009). Os dados físico-químicos dos polímeros sintetizados estão resumidos na tabela abaixo (tabela 2).

Tabela 2: Caracterização dos diferentes copolímeros funcionalizados

Polímero	PEG* Mn médio	LA/OE** (^{3}H RMN)	Razão Inserção LA/OE** %	PM (g/mol) (GPC)***	Bloco PLA PM Estimado	IP polímero (PM/Mn)
PLA	-	-	-	75000-120000	-	-
PLA-PEG	2000	17,4	-	20097	18097	1,22
HO-PLA-PEG	2000	12,1	3,01%	10147	8147	1,21
BZO-PLA-PEG	2000	12,1	3,01%	10147	8147	1,21

**PEG: "molecular number" médio 2000 g/mol; **LA/OE: razão dada pela integração dos sinais do RMN do próton entre as unidades lactídeo (LA) e óxido de etileno (OE); ***determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC).*

Os solventes utilizados (acetona PA, metanol e acetonitrila grau CLAE) foram adquiridos da Tedia, EUA. Lyso-7 [(5Z)-5-[(5-bromo-1H-indol-3-il)metileno]-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona] PM 447,73 g/mol foi sintetizada, purificada e gentilmente cedida pelo professor Dr. Ivan da Rocha Pitta (UFPE), como recentemente descrito (Santin e cols*.,* 2013a). PLA 75-120 kDa (Sigma-Aldrich, Brasil), Epikuron 170® (fosfatidilcolina de soja, ≈70% fosfatidilcolina), Lucas Meyer (França); poloxamer 188 [Mn 8350 g/mol, EHL 29, Poli(propileno glicol) (Mw 1750): poliethileno glicol 1:4; pf 55ºC Synperonic PE/F68 (Sigma-Aldrich, Brasil); triglicerídeos de cadeia média (Miglyol 810N, Sasol, Alemanha). A água ultrapura (Milli-Q) foi purificada no sistema Simplicity, da Millipore®. Membranas de filtração foram adquiridas da Nalgene®.

4. METODOLOGIAS

4.1 Preparo das nanocápsulas

As NC de PLA (convencionais) foram preparadas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado seguido de evaporação do solvente, descrito por Fessi e cols (1989). As NC estericamente estabilizadas pelo PEG, foram obtidas

a partir dos polímeros anfifílicos contendo PEG e funcionalizados, conforme descrito na tabela 2. Estas NC foram preparadas pelo método descrito por Mosqueira e cols (2001a). O processo consiste da mistura de uma fase orgânica miscível em água em uma solução aquosa contendo ou não um surfactante hidrofílico. As NC foram preparadas com 0,6% p/v de polímero, 0,75% v/v de óleo (Miglyol) e 0,75% de Epikuron® 170, dissolvidos em 10 mL de acetona. Essa solução orgânica foi vertida com uma seringa em uma solução aquosa contendo 0,75% p/v de Poloxamer® e mantido por agitação por 10 minutos, seguido da evaporação do solvente a pressão reduzida. No preparo das NC peguiladas não foi adicionado o tensioativo Poloxamer® na fase aquosa. A influência da presença de diferentes grupamentos na cadeia de PLA, sobre a eficiência de encapsulação, no índice de polidispersão e no potencial zeta foi avaliada para as suspensões coloidais obtidas.

4.2 Distribuição de tamanho e potencial zeta

O tamanho médio e o índice de polidispersão das suspensões de NC foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (ECF), utilizando o equipamento Zetasizer PN3702 (Malvern Instruments, Malvern, UK). As medidas de tamanho foram realizadas a 25°C, com He-Ne laser 633 nm, usando "*Non-Invasive Backscatter optics*" (NIBS) equipado com 2 ângulos. Para essas análises de dispersão de tamanho as formulações foram dispersas em água ultrapura. O potencial zeta (ζ) foi determinado por anemometria de laser doppler associado à microeletroforese, utilizando também o equipamento Zetasizer PN3702. Todas as amostras foram diluídas (1:100) em solução de NaCl 1 mmolar. Os valores obtidos foram expressos como média ± desvio padrão (*n* = 10 medidas) de pelo menos três lotes diferentes de cada formulação.

4.3 Doseamento da Lyso-7 por cromatografia líquida de alta eficiência

O sistema cromatográfico utilizado para quantificação da Lyso-7 consistiu de uma bomba de módulo de separação Waters Alliance 2695, composto por um injetor automático, forno de coluna e detector de ultravioleta (UV) Waters 2695. A separação foi realizada em uma coluna C18-RP Phenomenex (150 mm x 4,6 mm, 4 µm), protegido por uma pré-coluna de segurança Phenomenex (AJO-7597 C18; 2 mm x 4,6 mm, 3 mm). A fase móvel foi composta da mistura dos solventes metanol e água (90:10 v/v). As condições de operação foram vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 25 µL, tempo de corrida de 7 min, temperatura do forno de coluna de 35ºC e detecção no UV no comprimento de onda de 385 nm. O desenvolvimento e a validação do método analítico para o doseamento da Lyso-7 nas formulações foi previamente descrito por Garcia (2011) (apêndice 1).

4.4 Porcentagem e eficiência de encapsulação

A porcentagem de encapsulação objetiva determinar o teor de Lyso-7 incorporado à NC em relação ao total de Lyso-7 encontrado na suspensão final. A porcentagem é calculada pela diferença entre a quantidade total de Lyso-7 na suspensão coloidal após a filtração em membrana de 0,8 µm e a quantidade de Lyso-7 livre solúvel na fase aquosa externa, dividida pela quantidade total de Lyso-7 na suspensão após a filtração x 100. A porcentagem de encapsulação foi calculada, portanto, pela seguinte equação:

$$\% \text{ encapsulação} = \frac{\text{(Lyso-7 total na suspensão (mg)} - \text{Lyso-7 no ultrafiltrado (mg)}}{\text{Lyso-7 total na suspensão (mg)}} \times 100$$

A Lyso-7 total foi determinada pela completa dissolução de 80 µL da suspensão de NC em acetonitrila. O fármaco livre solúvel na fase externa aquosa foi separado das nanoestruturas por ultrafiltração/centrifugação em unidades AMICON (membranas MICROCON de 100 kDa, Millipore®) usando-se 200 µL da suspensão de NC centrifugadas no dispositivo a 500 × *g* por 30 minutos. A quantidade de Lyso-7 adsorvida na membrana do dispositivo MICROCON foi também determinada após a ultrafiltração/centrifugação. Para tal, a membrana do AMICON foi lavada com água MilliQ, imersa em 500 µL de acetonitrila (1:1), levada ao vórtex por 15 minutos,

centrifugada e o fármaco dosado no sobrenadante. A eficiência de encapsulação (rendimento do processo) foi calculada pela quantidade de Lyso-7 encapsulada na suspensão de NC dividido pela quantidade de Lyso-7 pesada e adicionada para o preparo da suspensão de NC x 100. A eficiência de encapsulação foi calculada, portanto, pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de Encapsulação \%} = \frac{\text{Massa de Lyso-7 efetivamente encapsulada/mL}}{\text{Massa de Lyso-7 pesado para o preparo das NC/mL}} \times 100$$

A relação fármaco/polímero possibilita uma percepção da capacidade das NC em carrear um fármaco. Ela representa a razão entre a massa da Lyso-7 efetivamente encapsulada nas NC e a massa total de polímero usada na formulação, expressa em percentagem:

$$\text{Lyso-7/polímero \%} = \frac{\text{massa de Lyso-7 encapsulada na formulação final (mg)}}{\text{massa de polímero na formulação (mg)}} \times 100$$

4.5 Avaliação morfológica das NC por microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MFA foram obtidas nos equipamentos Multimode e Dimension 3000, ambos monitorados por controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, EUA), no Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC, MG). As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente (*tapping mode*) utilizando sondas de silício de 228 µm de comprimento, com uma frequência de ressonância de 75-98 kHz, força constante de 29-61 N/m e raio de curvatura de 5 nm a 10 nm. Para obtenção das imagens das NC, aproximadamente 5 µL das amostras foram depositados em superfícies atomicamente planas de mica, clivadas no momento do uso. As amostras foram secas e espalhadas com um jato de argônio unidirecional. A varredura foi efetuada em uma velocidade de 1Hz com resolução de 512 x 512 pixels. A análise das amostras foi realizada utilizando o programa do sistema (*Section Analysis*).

Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram também realizadas, para observar a morfologia, o tamanho, dispersão de tamanho das NC e as características de superfície. As NC foram depositadas em lamínulas de vidro, secas à temperatura ambiente sob vácuo e recobertas com um filme de ouro utilizando o equipamento Q150R ES (Quorum/UK). As amostras foram analisadas por MEV utilizando o microscópio MIRA-3 *field emission gain* (Tescan, USA) aplicando um potencial de 20 kV.

4.6 Hemólise

A toxicidade para as hemácias foi determinada para garantir a viabilidade da administração das formulações pela via endovenosa. O teste foi realizado utilizando a determinação colorimétrica da liberação de hemoglobina após a incubação com as amostras a 37ºC durante 3h. O sangue foi coletado de camundongos *Swiss* fêmeas sadios (n = 3), em tubos contendo heparina, foi então centrifugado sendo o plasma descartado. As hemácias foram diluídas em PBS (157 mM) e a absorbância a 540 nm ajustada para o valor de 0,4. Os testes foram realizados de acordo com metodologia descrita por Dobrovolskaia e colaboradores (2008), com algumas modificações (Dobrovolskaia *e cols.,* 2008). Foram utilizados 3 controles: T_0 células encubadas com PBS (sem hemólise ou controle negativo), T_{100} células encubadas com solução aquosa de Triton 2% (hemólise total ou controle positivo) e T_i amostras controle de NC brancas, diluídas na mesma proporção dos testes, na ausência da suspensão de hemácias (referência da turbidez das NC). A absorbância dos ensaios foi subtraída da absorbância do Ti em cada concentração testada. Foram adicionados 100 µL das diluições de Lyso-7 livre e nas NC em diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100 µg/mL) a 900 µL da suspensão de hemácias. Todas as amostras foram encubadas por 3 horas a 37ºC, a hemólise foi interrompida em banho de gelo e as hemácias não lisadas foram removidas por centrifugação (5 min, 500 × *g* e 4ºC). Em seguida, o sobrenadante foi coletado e analisado por espectrofotometria UV-VIS a 540 nm utilizando o espectrofotômetro Helios-α (Thermo Electron Corporation, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise utilizando a seguinte equação, onde T é a absorbância do sobrenadante das amostras:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{[(T - T_i) - T_0)]}{T_{100}} \times 100$$

4.7 Análise estatística dos dados

O diâmetro médio e o potencial zeta das NC vazias e contendo Lyso-7 foram comparadas por análise da variância (ANOVA) utilizando o programa Prisma® versão 5.0. Uma probabilidade de 5% foi considerada significante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Preparo das NC, tamanho e índice de polidispersão

Todas as NC poliméricas foram preparadas pelo método de conhecido como nanoprecipitação. Esta é uma técnica simples, rápida e requer um solvente orgânico miscível na fase aquosa, de baixo ponto de ebulição, que é evaporado durante o preparo. A Lyso-7 apresentou maior solubilidade no Mygliol 810 N e por isso ele foi usado como o óleo do núcleo das NC como estudado anteriormente (Garcia, 2009). Todos os polímeros utilizados produziram NC com baixo índice de polidispersão (<0,3), indicando que a metodologia utilizada na produção das NC e a proporção de seus constituintes foram adequadas para a obtenção de uma suspensão coloidal monodispersa. As NC produzidas com os copolímeros PLA-PEG, HO-PLA-PEG e BZO-PLA-PEG tiveram diâmetro hidrodinâmico médio de 164 nm, 227 nm e 225 nm, respectivamente. Quando comparadas com as NC preparadas a partir do homopolímero de PLA, houve uma redução significativa (p<0,05) no tamanho das partículas quando comparadas com as NC peguiladas (tabela 3). Esta redução no tamanho das partículas está associada à característica anfifílica do copolímero em bloco (PLA-PEG) em relação ao homopolímero (PLA), que conduz à redução da tensão interfacial do sistema durante a formação das NC. A introdução de grupos hidroxila ou benzila nos copolímeros de PLA-PEG aumentou significativamente o diâmetro médio das NC (225 e 227, respectivamente) comparado às NC preparadas

com o copolímero não funcionalizado (164 nm). Provavelmente este aumento foi devido à dificuldade de acomodação desses grupamentos ou eventualmente na modificação do caráter anfifílico desses polímeros, alterando suas propriedades tensioativas ou de autoagregação (concentração micelar crítica). Entretanto a CMC desses novos polímeros não foi investigada até o momento.

Tabela 3: Diâmetro hidrodinâmico médio de NC contendo Lyso-7 (0,5 mg/mL) em relação às NC brancas obtidas a partir de polímeros com diferentes arquiteturas

Formulação	Lyso-7 (mg/mL)	Diâmetro hidrodinâmico médio ± DP[a]	Índice de polidispersão[b] ± DP	Potencial ζ (mV) ± DP[c]
PLA	0	273,6 ± 1,2	0,17 ± 0,02	-39,7 ± 2,4
	0,5	295,5 ± 5,2**	0,14 ± 0,04	-43,1 ± 1,9
PLA-PEG	0	164,2 ± 3,1*	0,18 ± 0,04	-18,6 ± 2,2*
	0,5	218,7 ± 2,5**	0,15 ± 0,01	-25,8 ± 3,5**
HO-PLA-PEG	0	225,7 ± 2,9*	0,13 ± 0,02	-24,7 ± 1,6*
	0,5	243,6 ± 4,5**	0,18 ± 0,09	-38,2 ± 2,5**
BZO-PLA-PEG	0	227,8 ± 2,3*	0,19 ± 0,03	-27,8 ± 4,8*
	0,5	257,1 ± 3,8**	0,21 ± 0,09	-36,2 ± 4,7**

**diferença significativa (p<0,05) em relação a NC PLAbranca; **diferença significativa (p<0,05) entre o mesmo polímero após adição de Lyso-7; [a]desvio padrão (n = 3); [b]amostras monodispersas (<0,3);*

Foi observada uma diferença significativa (p<0,05) no aumento do tamanho de todas as NC após a incorporação de 0,5 mg/mL de Lyso-7, quando comparado com as formulações brancas (sem o fármaco). Para explicar o aumento do tamanho quando adicionamos o fármaco há algumas hipóteses: a presença de Lyso-7 no meio altera a viscosidade do meio e consequentemente o diâmetro das gotículas formadas durante a fase de mistura turbulenta dos solventes. E, a hipótese mais provável, de acomodação das moléculas de Lyso-7 no núcleo oleoso que aumenta, consequentemente, o volume interno das NC. Estes resultados indicam que o núcleo oleoso das NC pode manter a Lyso-7 em estado solubilizado ou disperso devido à natureza hidrofóbica desta molécula (Legrand e cols., 1999; De Paula e cols., 2013).

5.2 Potencial zeta (ζ)

Os resultados de potencial zeta das diferentes NC estão apresentados na tabela 3. Todas as NC apresentaram valores negativos de potencial zeta, que podem ser atribuídos à polarização dos grupamentos iônicos presentes na superfície das NC, principalmente devido ao ácido fosfatídico presente como impureza na lecitina usada na formulação (Epikuron170®), como já previamente discutido (Mosqueira e cols., 2000; Hassellöv e cols., 2008). Valores altos de potencial zeta, como os obtidos neste trabalho, aumentam a estabilidade coloidal da suspensão de NC devido à alta repulsão entre as nanopartículas, prevenindo sua agregação (Mosqueira e cols., 2000). Valores de potencial zeta significativamente mais negativos (-39 mV) foram obtidos para as NC de PLA quando comparada com as NC produzidas com os copolímeros PLA-PEG (-18 mV), HO-PLA-PEG (-24 mV) e BZO-PLA-PEG (-27 mV). No caso das NC preparadas a partir dos copolímeros peguilados, o PEG provavelmente mascara parte dos grupos ionizáveis, presentes no polímero e nos constituintes das NC, o que leva à redução da carga superficial das NC. Ainda, o efeito de estabilização estérica do PEG impede a agregação. O mesmo efeito de estabilização pelo PEG foi demonstrada com nanocápsulas e nanoesferas obtidas a partir do PLA-PEG (Mosqueira e cols., 2001b, Gref e cols, 1994). Não houve diferença significativa entre os valores de potencial zeta das NC produzidas com o copolímero PLA-PEG ou com o bloco de PLA funcionalizado. Embora haja uma tendência ao aumento do potencial de superfície em modulo para partículas contendo os grupos hidroxil e benzil em relação ao polímero não funcionalizado, esses valores não foram estatisticamente significativos, provavelmente pelo baixo número de grupamentos inseridos na cadeia de PLA (tabela 2).

Os fosfolipídeos (lecitinas), os poloxamers (copolímeros dos óxidos de etileno e de propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Especialmente os poliésteres, como o PLA, e as lecitinas conferem um potencial negativo à interface, pela presença de grupos polarizáveis, o que aumenta em módulo os valores de potencial zeta, como observado por (Mosqueira e cols., 2001b). Os poloxamers (tensoativos não iônicos) peguilados e os copolímeros

anfifílicos do tipo PLA-PEG tendem a reduzir o valor absoluto do potencial de superfície pela blindagem estérica dos grupamentos ionizáveis expostos na superfície e pela expansão da camada de solvatação (de Gennes, 1987; Jeon e cols, 1991). Porém, o tamanho da cadeia de PEG covalentemente ligado ao polímero hidrofóbico, bem como a densidade de cadeias de PEG e a proporção entre o tamanho da cadeia do polímero hidrofóbico/polímero hidrofílico, são fatores importantes que também interferem nos valores de potencial zeta (Mosqueira e cols*.,* 2001b; Beletsi e cols*.,* 2005). O potencial zeta tende a ser reduzido e apresentar valores mais próximos de zero quanto maior forem as cadeias de PEG e a carga interfacial tende a neutralidade com um equilíbrio adequado entre a proporção de PEG/PLA, que confere um aumento estável em termos de densidade de PEG, conferindo uma melhor cobertura da superfície das nanocápsulas (Mosqueira e cols, 2001a). Mosqueira e colaboradores demonstraram que a carga superficial das NC foi drasticamente reduzida com uma maior densidade de PEG no copolímero e com baixo conteúdo de lecitina de soja (0,3% p/v) (Mosqueira e cols*.,* 2001b). Provavelmente os valores de potencial zeta, aproximadamente -25 mV, encontrados para as formulações de NC PLA-PEG (puro ou funcionalizado) foram influenciados pela presença de lecitina (0,75% p/v) e pelo tamanho da cadeia de PEG (2 kDa).

A encapsulação da Lyso-7 nas NC de PLA não alterou significativamente os valores de potencial zeta o que sugere que em concentrações de até 0,5 mg/mL a Lyso-7 provavelmente fica solubilizada no núcleo oleoso. Contudo, nas NC produzidas com os polímeros de PLA-PEG, HO-PLA-PEG e BZO-PLA-PEG houve aumento significativo do valor de potencial zeta após o encapsulamento da Lyso-7, indicando o aumento da presença de grupos ionizáveis na superfície das NC, Provavelmente, a interação entre a Lyso-7 e os grupamentos hidroxil e benzil podem estar alterando a organização interfacial na presença da Lyso-7.

5.3 Eficiência de encapsulação

Devido ao elevado caráter lipofílico da Lyso-7 (log *P* = 5,64), as NC poliméricas com núcleo oleoso foram carreadores adequados para a incorporação desse novo

candidato a fármaco, pois todas as formulações apresentaram um teor de encapsulação próximo de 100%. Não foi encontrado Lyso-7 livre solúvel em concentrações detectáveis nem na fase aquosa externa da suspensão coloidal, ou aderida à membrana de ultrafiltração utilizada para a separação das NC do ultrafiltrado (tabela 4).

Tabela 4: Eficiência de encapsulação e rendimento de encapsulação de formulações de NC poliméricas contendo Lyso-7 preparadas com 0,5mg/mL

Formulação de NC[a]	Eficiência de encapsulação	% encapsulação	% Lyso-7/polímero	Concentração final de Lyso-7*
PLA	82,8	99	6,8% (p/p)	0,41
PLA-PEG	88,5	99	7,3% (p/p)	0,44
HO-PLA-PEG	84,3	95	7,0% (p/p)	0,42
BZO-PLA-PEG	83,6	94	7,0% (p/p)	0,42

[a]*Volume final de 2 mL; *mg/mL.*

Portanto, a Lyso-7 adicionada ao sistema foi praticamente toda associada ao nanocarreador. Foi avaliada a eficiência de encapsulação da Lyso-7 na concentração de 1 mg/mL em NC PLA. Contudo, concentrações maiores que 0,5 mg/ml desta substância parecem saturar a capacidade de encapsulação das NC, levando a precipitação do excesso de Lyso-7 após a estocagem por um curto período de tempo. Assim, em concentrações superiores a 0,5 mg/mL a eficiência de encapsulação foi reduzida de 82% para 37%. A relação Lyso-7/polímero variou entre 6-7%. Valores inferiores desta mesma relação foram relatados para NC PLA contendo genisteína (0,6-1,4%) e fitalocianina (1,3-3%) (Zampieri e cols*.,* 2013; De Paula e cols*.,* 2013), e uma relação similar de 4-6% foram obtidas em NC de PLGA contendo docetaxel (Attili-Qadri e cols, 2013).

Foram encontrados altos valores de eficiência de encapsulação em todas as preparações de NC (~84), usando um método que não requer etapas subsequentes de purificação, o que está de acordo com os valores de EE relatados em estudos

anteriores (40-100%) para NC de PLA produzidas pelo método de nanoprecipitação (Mora-Huertas e cols*.,* 2010).

Recentemente, estudos *in vivo* demonstraram que a Lyso-7 na dose de 3 mg/Kg, pela via oral, tem atividade anti-inflamatória superior à de outros fármacos desta classe, indometacina (10 mg/Kg) e a pioglitazona (50 mg/Kg). Portanto, por ser mais potente, mesmo baixas dosagens viabilizam o seu uso associado a NC, mesmo em preparações não apresentando uma alta relação Lyso-7/polímero.

A eficiência de encapsulação, que leva em conta as perdas no processo de preparo das NC, variou pouco com a mudança da natureza do polímero em cada formulação utilizada, sem diferença significativa entre as formulações. Valores próximos a 100% de encapsulação, relativos a quantidade de substância presente no meio externo após o preparo, possibilitam a utilização dessas formulações de NC *in vitro* e *in vivo*, sem necessidade de processos de purificação adicionais.

Os dados obtidos em estudos anteriores do nosso grupo corroboram os dados de % de encapsulação encontrados neste estudo, uma vez que as NC devido ao seu núcleo oleoso retêm a Lyso-7, sendo que o PLA devido a sua maior hidrofobicidade retém por maior tempo a Lyso-7, quando comparado ao polímero em blocos PLA-PEG, conforme apresentado na figura 5.

5.4 Análise morfológica por MFA e MEV

Diversas técnicas microscópicas podem ser utilizadas como ferramenta na caracterização de compostos dependendo do tipo de informação que se deseja obter. Para análises de superfícies com alta resolução, as técnicas mais comumente utilizadas são a microscopia de força atômica (MFA), a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Russel & Batchelor, 2010). Na MFA, diferentemente das microscopias eletrônicas, não há necessidade de utilização de vácuo ou recobrimento da amostra (Russel & Batchelor, 2010), as amostras são analisadas *in natura* desidratadas sobre um substrato ou mesmo em meio líquido. O preparo da amostra é um ponto muito delicado e importante nas análises feitas por TEM e MEV, pois pode ser fonte de má

interpretação dos dados devido a presença de artefatos. Além disso, a microscopia eletrônica é mais dispendiosa e laboriosa (Klang & Matsko, 2014).

A morfologia e o tamanho das NC PLA e NC PLA-PEG contendo Lyso-7 foram determinados por MFA em imagens contendo um número grande de partículas. As imagens mostraram a presença de estruturas esféricas bem definidas e homogêneas, como mostrado nas figuras 7 e 8. As análises do perfil topográfico evidenciam a presença de estruturas deformáveis tanto para NC PLA quanto para NC PLA-PEG, com uma relação diâmetro/altura de 1,3 e 8,0, respectivamente, o que indica a presença de um núcleo de natureza fluída com estrutura vesicular para esses nanocarreadores poliméricos (figura 7C e figura 8). As relações diâmetro alturas mais elevadas para as NC de PLA-PEG podem indicar paredes poliméricas mais finas e flexíveis, o que está de acordo com a maior velocidade de liberação da Lyso-7 observada em trabalhos anteriores (Garcia, 2011). Outros autores já relataram achados similares para NC contendo outros fármacos (De Paula e cols*.,* 2013; Leite e cols*.,* 2005). Além disso, a imagem de fase da MFA mostra diferenças de contraste entre o núcleo e a membrana polimérica da NC (figura 7B). O núcleo se apresenta com uma coloração mais clara, circundado por um aro mais escuro, o que indica que a dureza ou a textura do núcleo das NC é diferente da parede polimérica. Algumas micelas de tamanho reduzido (12-25 nm) também podem ser observadas nas imagens das NC PLA (figura 7B) e estão de acordo com os diâmetros das micelas de Poloxamer 188 (14 nm) já relatadas anteriormente (Moghimi e cols*.,* 2004). Essas micelas coerentemente aparecem somente nas imagens de NC de PLA, onde este surfactante está presente.

A redução dos valores de tamanho obtido pela técnica de MFA com relação a ECF se deve ao fato da MFA avaliar diretamente o tamanho das amostras em um estado parcialmente desidratado, enquanto as medidas realizadas por ECF se correlacionam com o raio hidrodinâmico, onde a partícula migra no meio líquido com sua camada de solvatação. A MFA tem sido uma ferramenta muito usada na caracterização de nanoestruturas, como lipossomas (Li & Palmer, 2004), NS (Essa e cols*.*, 2010) e NC (Leite e cols*.*, 2005; Mosqueira e cols*.*, 2005; De Paula e cols*.,* 2013).

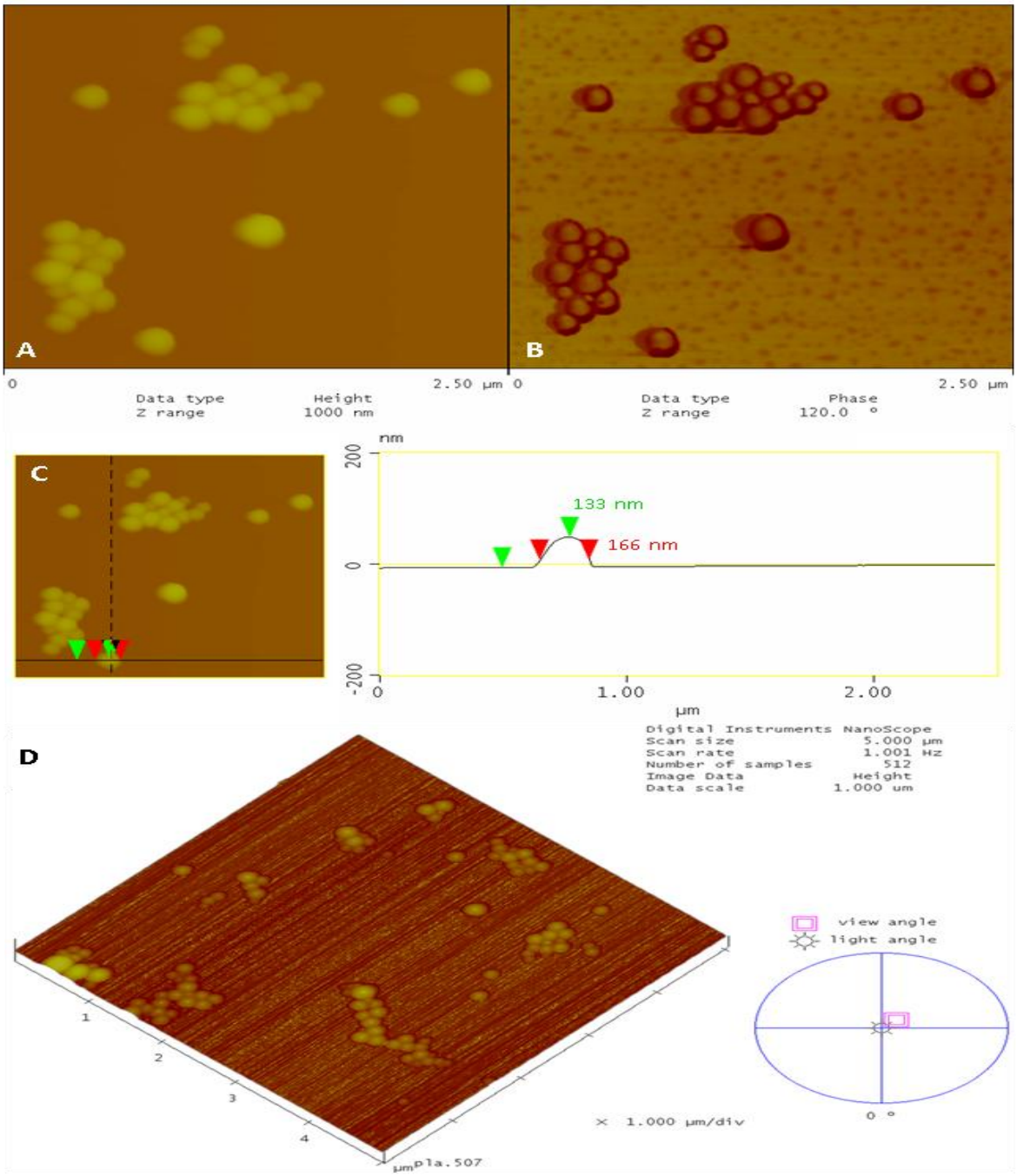

***Figura 7**:Imagens por MFA da altura (A), fase (B) e o perfil topográfico (C) de PLA-NC, obtido pelo programa "section analysis" mostrando as medidas do diâmetro e altura das NC. Scan size: 2,5 × 2,5 µm. (D) Imagem tri-dimensional por MFA de PLA-NC contendo Lyso-7 (0,5 mg/mL) depositadas sobre mica. Scan size: 5 × 5 µm (apêndice 1).*

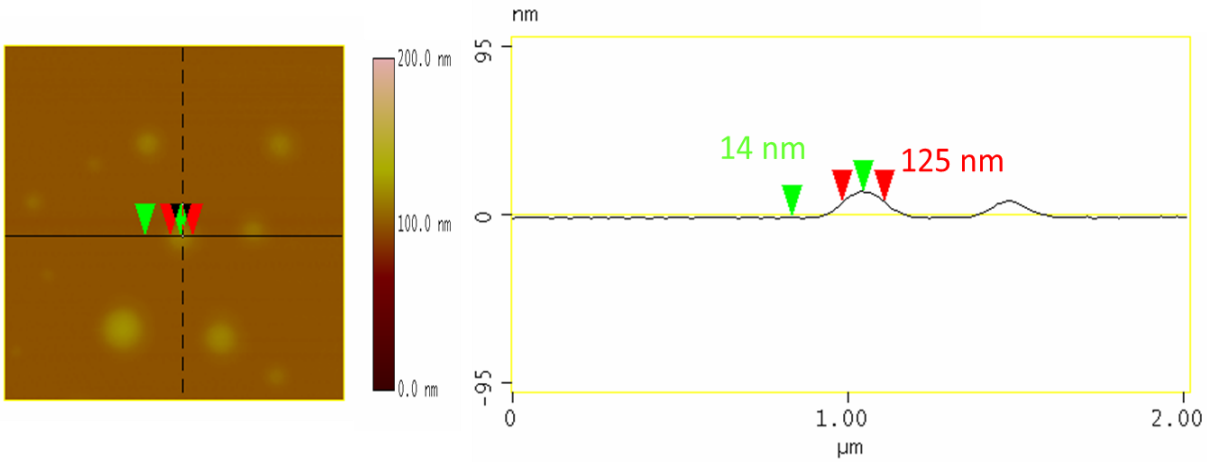

Figura 8: *Imagens por MFA do perfil topográfico de Lyso-7 NC PLA-PEG, mostrando as medidas do diâmetro (setas vermelhas) e altura (setas verdes) das NC. Scan size: 1,7 × 1,7 µm.*

Também foram realizadas imagens de MEV da Lyso-7 PLA NC (figura 9); onde foi possível observar que as NC são monodispersas com relação ao tamanho, o que se assemelha às análises realizadas por ECF e MFA. Além disso, mesmo as amostras sendo analisadas com um feixe de elétrons de baixa energia e recobertas por uma fina camada de ouro, observou-se uma rápida deformação das estruturas com o calor (figura 9), um encolhimento. Isto é devido à natureza líquida do núcleo e da fina membrana polimérica das NC. O PLA possui uma baixa temperatura de transição de fase (T_g 50-84ºC). Com isso, é difícil a obtenção de imagens de MEV das NC de Lyso-7, uma vez que há derretimento e fusão das NC mesmo durante à exposição breve ao calor do feixe de elétrons. O encolhimento da parede polimérica das NC pode ser observado nas figuras 9A e B. Attili-Qadri e colaboradores observaram os mesmos efeitos em NC de PLGA analisadas por MEV (Attili-Qadri e cols., 2013). Estes resultados indicam que a avaliação do diâmetro das NC necessita ser realizado por duas ou mais técnicas complementares, considerando as limitações de cada uma (Attili-Qadri e cols., 2013). Contudo, os resultados físico-químicos mostram que a Lyso-7 está preferencialmente associada ao núcleo oleoso e que a parede polimérica circunda e separa esta substância do meio externo conforme observado nas imagens de MFA.

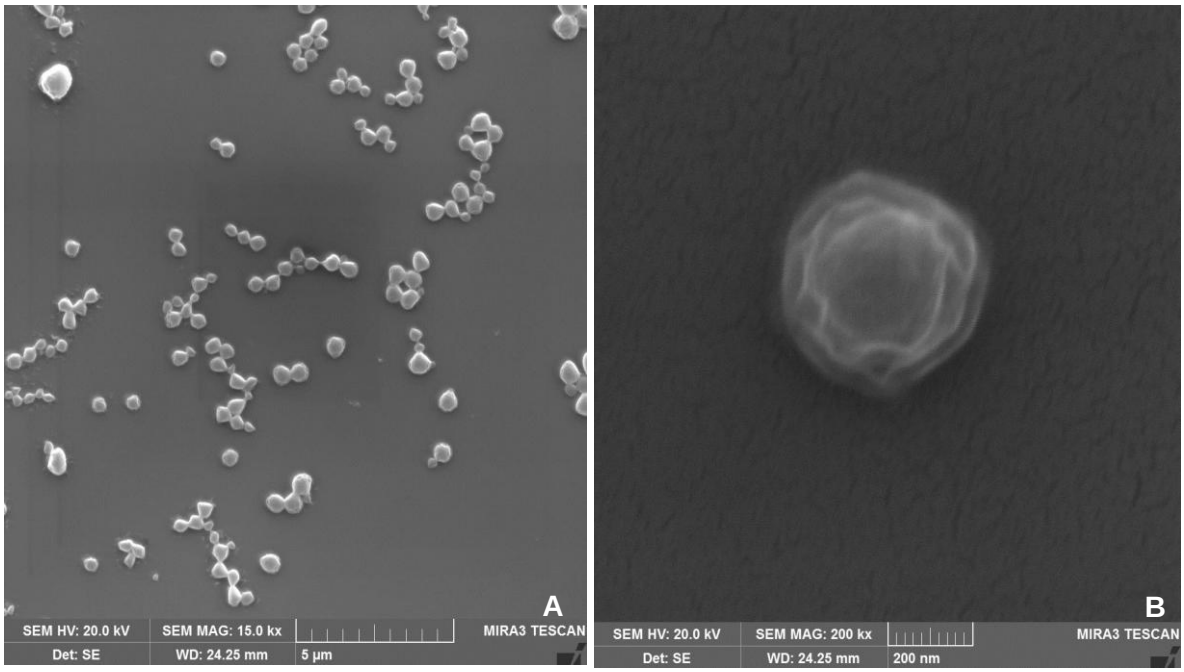

Figura 9: *Imagens de MEV de NC PLA contendo (A) e (B). As imagens foram obtidas com um feixe de 20 kV após recobrimento com ouro (100 Å) (apêndice 1).*

A MFA e a MEV são técnicas complementares que permitem uma representação mais completa da superfície da amostra. Estas técnicas se sobrepõem com relação à capacidade de apresentar informações sobre o tamanho e a polidispersão das partículas nas amostras em escala nanométrica, além de forneceram o diâmetro geométrico real das partículas. Contudo, diferentemente da MEV, a MFA pode fornecer medidas nas 3 dimensões incluindo, como exposto acima, informações de altura (Russel & Batchelor, 2010).

5.5 Avaliação da hemólise

A atividade hemolítica *in vitro* da Lyso-7 foi determinada para a Lyso-7 livre em solução e encapsulada; Lyso-7 NC PLA e Lyso-7 NC PLA-PEG, considerando a administração destas formulações em estudos posteriores *in vivo.* Os dados relativos à % de hemólise encontrada estão mostrados na figura 10. Em todas as concentrações testadas (25, 50, 75 e 100 µg/mL) a atividade hemolítica da Lyso-7 em solução foi significativamente maior (p<0,05) que a encontrada nas formulações

de NC contendo Lyso-7 ou NC branca. A porcentagem de hemólise observada para a Lyso-7 livre foi de 14%, 8% para Lyso-7 NC PLA, 8,1% para Lyso-7 NC PLA-PEG, 1,7% para NC PLA branca e 3% para NC PLA-PEG branca, na dose mais elevada (100 μg/mL).

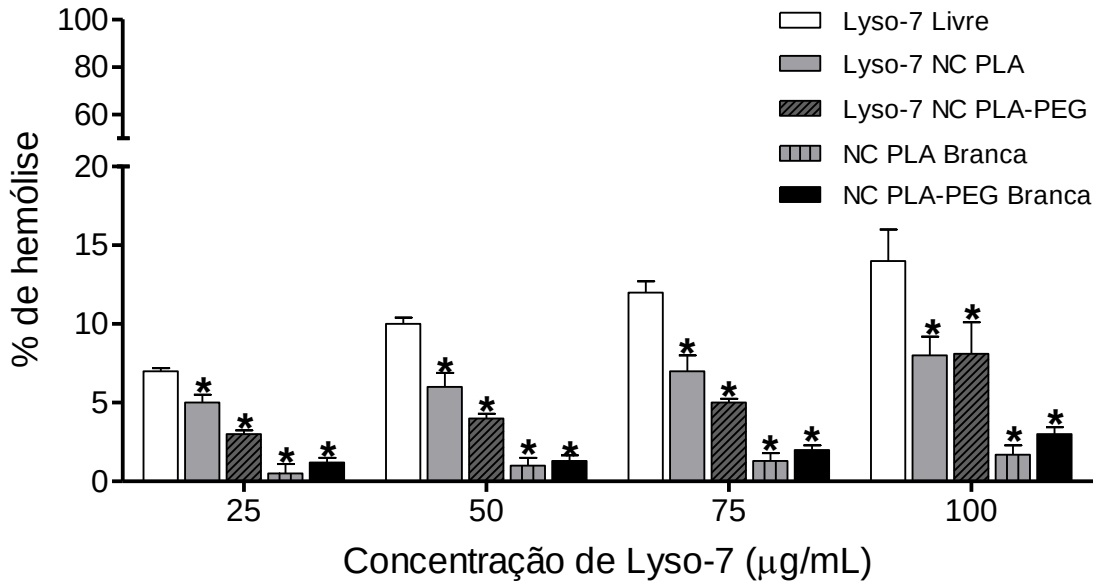

Figura 10: *Porcentagem de hemólise após a incubação da Lyso-7 livre e associada nas diferentes formulações.*

O perfil de dissolução da Lyso-7 livre e o perfil de liberação da Lyso-7 em NC PLA e NC PLA-PEG foi anteriormente descrito por Garcia (2011) (figura 5). Nas primeiras 6 horas a Lyso-7 foi rapidamente liberada (47%) no meio (PBS), sendo que o tempo necessário para liberar/dissolver 50% da Lyso-7 foi de 427 min, 320 min e de 32 min para Lyso-7 em NC PLA, NC PLA-PEG e Lyso-7 em solução. Estas observações descritas corroboram com a toxicidade reduzida *in vitro* da Lyso-7 nanoencapsulada quando comparada com a substância livre. Provavelmente a liberação tardia da Lyso-7 das NC e a fração reduzida da substância em contato com as hemácias foram as responsáveis pela hemólise reduzida. Não houve diferença estatística da atividade hemolítica da Lyso-7 utilizando os polímeros PLA ou PLA-PEG. As NC brancas ou contendo Lyso-7 apresentaram baixa hemotoxicidade nos testes realizados e, assim, podem ser consideradas não hemolíticas, conforme Brender e cols. (2012).

No estudo farmacocinético descrito no capítulo 2, a concentração plasmática calculada da Lyso-7 livre no tempo 0 foi de 35,5 µg/mL, ou seja, 3 vezes inferior que a concentração de 100 µg/mL que causou 14% de hemólise pela solução de Lyso-7 e aproximadamente 8% nas NC contendo Lyso-7, ambos valores aceitáveis. Com isso, concentrações plasmáticas de Lyso-7 inferiores a 100 µg/mL demonstram ser seguras para uma administração parenteral, correlacionadas com a toxicidade hemolítica, e que a nanoencapsulação aumenta a segurança da administração endovenosa de Lyso-7. Como já amplamente discutido, as NC podem aumentar a biodisponibilidade de moléculas hidrofóbicas após a administração e permitem muitas vezes que os perfis de liberação sejam mais sustentados. Todas estas vantagens estão associadas com as características físico-químicas das NC. Dessa forma, as NC acima caracterizadas foram administradas em camundongos sadios para análises da farmacocinética e biodistribuição.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica para quantificação da Lyso-7 em tecidos de camundongo: aplicação em estudos de farmacocinética e de biodistribuição

1. INTRODUÇÃO

Uma vez que a Lyso-7 é uma substância inédita, para o seu doseamento em amostras biológicas é necessário que o método de quantificação seja validado em cada tecido, conforme preconizado pelos guias internacionais e a ANVISA. O método bioanalítico validado e descrito neste capítulo foi aplicado no doseamento da Lyso-7 em tecidos de camundongo. O efeito das NC preparadas com os diferentes copolímeros peguilados derivados do PLA sobre os parâmetros farmacocinéticos e de biodistribuição da Lyso-7 foram avaliados comparativamente, após a administração endovenosa em camundongos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para extração e quantificação da Lyso-7 em plasma e tecidos de camundongo (fígado, baço, coração, pulmão e rins) por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV);

2. Avaliar o perfil farmacocinético da Lyso-7 na sua forma livre (em solução) e associada à NC poliméricas;

3. Avaliar o efeito da natureza do polímero usado na preparação das NC sobre a farmacocinética da Lyso-7 por via intravenosa.

4. Avaliar a biodistribuição tecidual da Lyso-7 na sua forma livre e associada a diferentes NC poliméricas.

3. MATERIAIS

Para o preparo das NC foram utilizados os mesmos copolímeros e demais componentes descritos no capítulo 1. Os solventes utilizados, acetona PA, metanol e

acetonitrila grau CLAE, acetato de etila, N,N-dimetilacetamida (DMA) e dimetilsulfóxido (DMSO), foram adquiridos da Tedia, EUA. Benznidazol (BZ) (N-benzil-2-nitroimidazolacetamida) foi adquirido da Sigma-Aldrich. A água ultra pura (Milli-Q) foi purificada no sistema Simplicity, da Millipore®. Membranas de filtração foram adquiridas da Nalgene®.

4. MÉTODOS

4.1 Desenvolvimento e validação bioanalítica para quantificação da Lyso-7 em tecidos de camundongo

Para a validação do método de quantificação da Lyso-7 no baço, coração, fígado, pulmão e rim de camundongos, foram determinados todos os parâmetros conforme recomendado pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (US Food and Drug Administration, 2001) e pelo Guia da Conferência Internacional de Harmonização (ICH Harmonised Tripartite guideline, 2005): especificidade, recuperação, linearidade, precisão (inter e intradia), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e a estabilidade.

4.2 Padrões de calibração

Foi preparada uma solução estoque de 1 mg/mL de Lyso-7 em acetato de etila/metanol (80:20 v/v). O fármaco Benznidazol® (500 µg/mL) foi utilizado como padrão interno (P.I.). A curva de calibração da Lyso-7 (curva padrão) foi construída utilizando soluções de trabalho nas concentrações de 0,1; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 µg/mL. Estas soluções de trabalho foram preparadas por diluição seriada à partir da solução estoque e todas as soluções foram armazenadas a -80ºC.

4.3 Condições cromatográficas

O sistema de cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE) utilizado para a quantificação da Lyso-7 consistiu-se de uma bomba de módulo de separação Waters Alliance 2695, composto de injetor automático, forno de coluna e detector no ultravioleta Waters 2695. A separação foi realizada em uma coluna C18-RP Phenomenex (150 mm x 4,6 mm, 4 µm), protegida por uma pré-coluna de segurança Phenomenex (AJO-7597 C18; 2 mm x 4,6 mm, 3 mm). A fase móvel foi composta pela mistura dos solventes metanol e água (90:10, v/v). As condições de operação foram fluxo de eluente de 1 mL/min, volume de injeção de 25 µL, tempo de corrida de 7 min, temperatura do forno de coluna de 35ºC e detecção no UV no comprimento de onda de 385 nm.

4.4 Animais

Camundongos *Swiss* fêmeas pesando 29-31 g foram fornecidos pelo Centro de Ciência em Animal da UFOP (CCA) e mantidos de acordo com o guia estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo nº 2013/26). Os animais foram mantidos no ciclo de 12 horas dia/noite, temperatura de 22 ± 2ºC, dieta padrão e água *ad libitum*.

4.5 Preparo das amostras de tecidos

Foram utilizados camundongos sadios para a validação do método no fígado, baço, coração, pulmão e rins. Os animais foram eutanasiados para retirada dos órgãos, secagem e pesagem. Para a validação das amostras de fígado foram retirados 0,2 g do órgão e para as amostras de baço, coração, pulmão e rim, o órgão

total foi utilizado. Aos tecidos devidamente limpos, secos e pesados foram adicionados 1 mL de PBS (pH = 6,5), seguido de completa trituração com auxílio de um sonicador (Vibra Cell™ VCX750), em banho de gelo por 1 min. Os tecidos triturados foram armazenados a -80ºC até a extração.

4.6 Desenvolvimento de método de extração

Para validar a eficiência do método de recuperação do analito (Lyso-7), os tecidos de camundongos sadios (sem fármaco) foram usados como branco, conforme o guia do FDA para a validação de métodos bioanalíticos (US Food and Drug Administration, 2001). A recuperação da Lyso-7 e do P.I. (BZ) nos tecidos foi obtida pela comparação da área do pico da Lyso-7 em 3 diferentes concentrações controle com a área do pico do P.I. na concentração de 50 µg/mL, em sextuplicada. Foram utilizadas as concentrações controle de 0,25 µg/mL (baixa), 2,5 µg/mL (média) e 7,5 µg/mL (alta). Para cada uma destas concentrações foram adicionados 10 µL das soluções de trabalho (2,5, 25 e 75 µg/mL), 80 µL do homogenato tecidual e 10 µL da solução padrão de BZ, totalizando 100 µL conforme apresentado na tabela 5. O método de extração líquido-líquido foi empregado. A influência do solvente extrator e do tempo de mistura do solvente com as amostras para a recuperação da Lyso-7 foram testadas. Para tal, foram avaliados os solventes acetato de etila, hexano e éter (1000 µL), misturando-os por 10 minutos em vórtex por 1, 2 ou 3 ciclos de extração, como relatado por Oliveira e colaboradores (2011). Por fim, os tubos contendo amostras controle foram centrifugados a 900 × *g,* sendo a fase orgânica resultante retirada e filtrada em filtros de 0.45 µm (Millipore, EUA). Esta então foi totalmente evaporada em concentrador com fluxo de nitrogênio (TE-019 Concentrador/Tecnal, Brasil). Cada amostra seca foi, então, ressuspensa em 100 µL de fase móvel e analisada por CLAE-UV.

4.7 Parâmetros de validação

As amostras de cada tecido para a construção da curva de calibração foram preparadas a cada dia de análise a partir de soluções-padrão de 1,0 a 100 µg/mL de Lyso-7 em acetato de etila/metanol (80:20 v/v), conforme descrito na tabela 5. Em todas as análises (*n* = 6 para cada concentração) adicionou-se 10 µL de solução-padrão de P.I. na concentração de 500 µg/mL, 10 µL das soluções de trabalho de Lyso-7 e 80 µL de tecido branco (sem fármaco).

Tabela 5: Preparo da curva de calibração

Concentração da solução de trabalho (µg/mL)	Volume de solução-padrão (µL)	Volume de homogenato tecidual (µL)	Concentração final presente na curva de calibração (µg/mL)*
1,0	10	80	0,1
2,5	10	80	0,25
5,0	10	80	0,5
10,0	10	80	1,0
25,0	10	80	2,5
50,0	10	80	5,0
75,0	10	80	7,5
100,0	10	80	10,0

**A todos os tubos foram adicionados mais 10 µl da solução estoque de PI.*

A especificidade foi avaliada através da comparação de seis amostras de tecido branco para garantir que não haja interferências nos picos de retenção do P.I. e da Lyso-7, respectivamente, a fim de se determinar o desempenho do método bioanalítico. Concentrações baixa (0,25 µg/mL), média (2,5 µg/mL) e alta (7,5 µg/mL) da Lyso-7 (*n* = 6) foram usadas na determinação da precisão e exatidão intra-dia em 3 diferentes dias. A estabilidade da Lyso-7 nos órgãos foi determinada nas mesmas concentrações controle segundo as seguintes condições: (1) quantificação da Lyso-7 nos tecidos após 3 ciclos de congelamento e

descongelamento; (2) quantificação a temperatura ambiente por 4 horas; (3) estabilidade da Lyso-7 no aparelho após 24 horas de armazenamento.

4.8 Estudo farmacocinético e de biodistribuição

A farmacocinética e a biodistribuição da Lyso-7, determinada em 5 órgãos (fígado, baço, coração, pulmão e rim), foi realizada em camundongos sadios utilizando para a quantificação o método bioanalítico descrito anteriormente. O estudo farmacocinético foi realizado com a Lyso-7 livre e encapsulada em NC produzidas a partir dos polímeros PLA, PLA-PEG, PLA-PEG-OH e PLA-PEG-OBZ nas doses de 1,6 mg/Kg. A solução da Lyso-7 livre para administração endovenosa foi preparada solubilizando 2 mg da Lyso-7 em 20 µL de DMSO, 20 µL de Tween® 80, 380 µL de DMA e 580 µL de PEG 300. Esta solução permaneceu sob agitação por 10 min em vórtex, em seguida, foi diluída em solução de glicose 5% até a concentração final de 0,5 mg/mL de Lyso-7. A solução de Lyso-7 (após a diluição) e a suspensão de NC foram filtradas em filtro estéril de 0,8 µm e injetadas por via intravenosa nos camundongos (n = 6) nas doses relatadas. Nos intervalos de tempos de 5, 20, 40, 60, 180 e 360 min após a injeção, o sangue (100-150 µL) foi coletado em tubos heparinizados e centrifugado por 15 min a 800 × g para separação do plasma. Às amostras de plasma (80 µL) foram adicionados 10 µL da solução de P.I. e as amostras foram extraídas e quantificadas conforme metodologia desenvolvida e validada por Garcia (2011) (apêndice 1). Por fim, o solvente foi evaporado e o resíduo ressuspenso com 100 µL de fase móvel. Os resultados foram expressos como média da porcentagem da dose administrada ± erro padrão.

A distribuição tecidual da Lyso-7 foi determinada após a administração endovenosa de 1,6 mg/Kg da Lyso-7 livre, em NC de PLA e em NC de PLA-PEG. Os camundongos (n = 4) foram eutanaziados nos tempos de 10, 30 e 60 min após a administração. Os órgãos foram coletados, lavados rapidamente com PBS gelado para remover o excesso de sangue, secos em papel de filtros e pesados, conforme metodologia descrita por Oliveira e colaboradores (2011). As análises das amostras biológicas foram avaliadas entre 12-24 h após a coleta das mesmas.

Foi realizado outro experimento no qual os órgãos foram perfundidos com salina, antes da sua remoção, para a máxima retirada do sangue dos vasos. Este procedimento permitiu que a Lyso-7 fosse quantificada sem a influência da concentração da Lyso-7 no sangue de acordo com o volume de fluxo sanguíneo interno de cada órgão. Assim, pode-se evidenciar a real quantidade de Lyso-7 presente no parênquima tecidual do órgão. Para tal, administrou-se aos camundongos pela via *i.v.* uma dose única de Lyso-7 (1,6 mg/Kg) livre e em NC de PLA (n = 4). Após 10 min, os animais foram eutanasiados e os órgãos foram perfundidos. O coração e o fígado foram removidos e processados conforme já descrito anteriormente.

4.9 Análise estatística dos dados

Os parâmetros farmacocinéticos foram tratados matematicamente usando o modelo não-compartimental, usando-se as concentrações plasmáticas da Lyso-7 em função do tempo para todas as formulações após a administração intravenosa em *bolus.* A área sobre a curva (ASC_{0-t}) e a área sobre a curva no primeiro momento ($ASMC_{0-t}$), onde t é o último tempo analisado, foram calculadas pelo método trapezoidal. A área sobre a curva extrapolada até o infinito ($ASC_{0-\infty}$) foi obtida pela equação $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + C_p/k_e$, onde C_p é a última concentração quantificada e k_e é a constante de eliminação. O valor k_e foi obtido como o declive da regressão linear dos valores de log da concentração em função do tempo na fase terminal. A $ASMC_{0-\infty}$ foi calculada pela equação $ASMC_{0-t} + (C_p \times t/k_e) + (C_p/k_e^2)$. A clearance (Cl) foi calculada como dose/ASC e o volume de distribuição (V_d) como MRT × Cl, onde o MRT foi obtido por $ASMC_{0-\infty}/ASC_{0-\infty}$. Todos os parâmetros foram obtidos por cálculo manual e utilizando-se o programa Excel e PKSolver® (Microsoft® Excel add-in) (Zhang e cols., 2010). Os valores de média ± erro padrão foram plotadas em curvas de concentração plasmática × tempo. O test-*t* de *Student* foi utilizado para calcular as diferenças entre os valores obtidos para os parâmetros farmacocinéticos em cada grupo experimental utilizando o programa Prisma® versão 5.0. Uma probabilidade de 5% foi considerada significante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Validação bioanalítica

A Lyso-7 é uma substância inédita e, por isso, é essencial realizar seu estudo pré-clínico. O desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica para o doseamento da Lyso-7 em amostras biológicas é necessário uma vez que não há dados na literatura, até o momento, sobre sua quantificação. Neste contexto, foi desenvolvido e validado um método específico, preciso, rápido e sensível para quantificar a Lyso-7 em matrizes biológicas, sendo elas baço, coração, fígado, pulmão e rim de camundongos. O desenvolvimento e a validação da metodologia para o doseamento da Lyso-7 em NC e em plasma de camundongo foi previamente validada por Garcia, (2011) (apêndice 1).

Os valores de recuperação para os tecidos (baço, coração, fígado, pulmão e rim) foram baixos quando extraídos com hexano (~40%). A extração com éter não foi muito eficiente para o coração e rim (82%), comparado com acetato de etila que gerou uma recuperação média de 95% para todos os órgãos. Assim, a extração com 500 µL de acetato de etila 3 vezes foi escolhida para todos os tecidos. Todos os valores de porcentagem de recuperação foram altos e satisfatórios para a Lyso-7 e o P.I., como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6: Recuperação absoluta da Lyso-7 e do padrão interno das matrizes biológicas

Tecidos	**Recuperação (%)[a]**	
	Lyso-7	**BZ (P.I.)**
Baço	95,78 ± 2,15	99,45 ± 1,55
Coração	100,58 ± 2,31	101,35 ± 3,70
Fígado	101,97 ± 1,57	101,82 ± 0,76
Pulmão	92,75 ± 3,95	98,71 ± 2,30
Rim	96,22 ± 2,56	98,15 ± 1,77

[a]*Média ± Desvio Padrão (n = 6); BZ, Benznidazol; P.I., Padrão Interno.*

Nenhuma interferência da matriz biológica ou dos reagentes foi encontrada nos cromatogramas, conforme apresentado na figura 8, o que demonstra que o método foi seletivo para o analito (Lyso-7) e o para o P.I. (BZ). A seletividade foi mantida após a extração da Lyso-7 e do P.I. dos tecidos e os tempos de retenção nas condições cromatográficas para a Lyso-7 (4,8 min) e para o P.I. (1,8 min) foram apropriada (figura 11) pela boa separação.

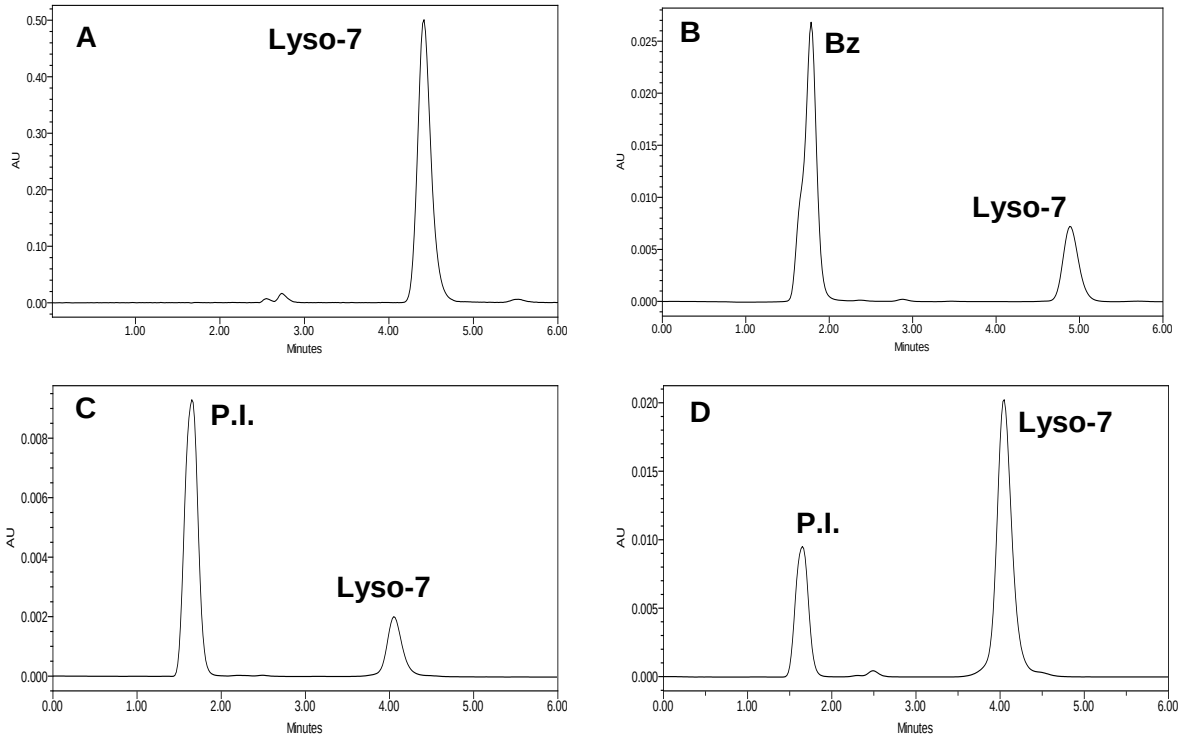

Figura 11*: Cromatogramas obtidos da Lyso-7 NC PLA (A); amostra de plasma obtido 5 min após a administração i.v. da Lyso-7 NC PLA (B); amostra de coração (C) e fígado (D) de camundongos, obtidas 10 min após a administração i.v. da Lyso-7 NC PLA.*

O método foi linear nas concentrações de 0,1 a 10 µg/mL, para todos os tecidos. Os valores de limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) foram 100 ng/mL e 50 ng/mL, respectivamente, em todas as matrizes biológicas. A equação das curvas e coeficiente de correlação estão apresentados na tabela 7, sendo expressos como média de 6 amostras.

Tabela 7: Coeficiente de correlação linear e equação das curvas padrão de calibração da Lyso-7 nos tecidos de camundongos

Tecidos	Coeficiente de correlação (r^2)	Equação das curvas
Baço	0,9965	y = 1,0947x – 0,1094
Coração	0,9968	y = 1,0195x – 0,1385
Fígado	0,9988	y = 0,8013x + 0,1269
Pulmão	0,9991	y = 0,6914x – 0,0367
Rim	0,9976	y = 7,6701x – 1,3502

Como apresentado na tabela 8, os valores de precisão e exatidão intra-dia e inter-dia estão de acordo com os critérios estabelecidos para amostras bioanalíticas (US Food and Drug Administration, 2001). Os testes de estabilidade, apresentados na tabela 9, não apresentaram valores estatisticamente diferentes (p>0,05) das concentrações iniciais do analito e que indicam que o método utilizado é apropriado e seguro para o doseamento da Lyso-7 nas amostras biológicas.

Tabela 8: Precisão e exatidão intra e inter-dia da Lyso-7 determinada pelo método bioanalítico

	Concentração	Precisão (DPR %)[a]		Exatidão (%)[a]	
		Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
Baço µg/g	0,25	9,35	10,20	100,47	102,66
	2,50	8,90	9,46	102,65	104,21
	7,50	8,47	9,78	108,40	109,43
Coração µg/g	0,25	10,70	11,54	101,01	102,70
	2,50	9,64	9,78	100,33	99,56
	7,50	10,47	11,78	99,45	97,12
Fígado µg/g	0,25	8,76	11,01	94,49	101,34
	2,50	7,34	10,45	88,77	106,45
	7,50	9,05	11,67	102,76	98,45
Pulmão µg/g	0,25	10,81	11,38	105,27	106,88
	2,50	8,59	8,44	103,41	105,40
	7,50	11,72	10,56	107,48	109,49
Rim µg/g	0,25	6,25	7,85	99,45	101,40
	2,50	7,33	8,17	101,36	103,44
	7,50	6,12	7,75	101,68	103,76

DPR, Desvio Padrão Relativo; [a]n = 6.

Tabela 9: Dados da estabilidade da Lyso-7 nos tecidos de camundongos (n = 6)

Tecidos		Temperatura ambiente (4 horas)	Equipamento (24 horas)	3 ciclos de congelamento/ descongelamento
Baço	Precisão (%)	7,65	9,21	10,88
	Exatidão (%)	101,50	102,67	105,56
Coração	Precisão (%)	6,44	9,34	8,99
	Exatidão (%)	97,57	100,11	93,39
Fígado	Precisão (%)	5,19	10,37	10,95
	Exatidão (%)	103,63	103,03	104,63
Pulmão	Precisão (%)	8,80	9,10	12,21
	Exatidão (%)	105,70	105,19	106,43
Rim	Precisão (%)	5,48	7,34	9,80
	Exatidão (%)	101,65	99,51	105,70

Portanto, o método bioanalítico desenvolvido e validado se mostrou seletivo uma vez que não houve pico de absorção nos mesmos tempos de retenção da Lyso-7 nos cromatogramas (figura 11), não havendo interferência da presença dos constituintes das amostras biológicas. Além disso, nenhum pico sugestivo de degradação da Lyso-7 foi observado, o que indica que as condições usadas foram apropriada8s para manter a estabilidade química da Lyso-7. O método líquido/líquido de extração/recuperação da Lyso-7 das amostras de tecidos com acetato de etila foi rápido, simples e de baixo custo.

Assim sendo, este método bioanalítico se mostrou sensível, uma vez que é necessária uma pequena quantidade de amostra biológica para se realizar um estudo de biodistribuição. O P.I. selecionado (BZ) foi apropriado visto que apresentou altas taxas de recuperação nas matrizes biológicas (>95%), boa separação cromatográfica do analito e uma solubilidade similar nos solvente utilizados no procedimento de extração. Os dados de estabilidade sugerem que as

amostras biológicas contendo Lyso-7 podem ser manipuladas, congeladas e descongeladas sem perda da sua integridade química e pureza nas matrizes. Estes resultados são uma contribuição importante para auxiliar nas investigações não clínicas e clínicas desta nova substância, como nos estudos da relação entre a farmacocinética e a farmacodinâmica.

5.2 Perfil farmacocinético da Lyso-7

A administração da Lyso-7 livre em solução na dose de 2 mg/Kg levou a morte imediata de todos os animais (*n* = 6), o que indica que a DL_{50} (dose letal) da Lyso-7 é menor que 2 mg/Kg. Por isso, foi avaliado o perfil plasmático da Lyso-7 livre administrando-se uma dose menor (1,6 mg/Kg), que não causou nenhuma morte nos animais. Para avaliação da toxicidade dos solventes e excipientes utilizados no preparo da solução de Lyso-7, foi administrado (*i.v.*) somente o veículo das preparações nos camundongos. Nenhuma reação anormal, sinais de toxicidade (ataxia, bradicardia e convulsão) ou morte foram observados até 24 horas após a administração. A dose de 2 mg/Kg de Lyso-7 encapsulada nas diferentes formulações de NC foi administrada nos animais e não foram observados sinais de toxicidade ou mortes. Isto indica que a associação da Lyso-7 nas formulações de NC poliméricas aumentou a LD_{50} da Lyso-7 e não induziu sinais de toxicidade durante os experimentos. A causa das mortes provocada pela administração *i.v.* da Lyso-7 (2 mg/Kg) ainda é desconhecida e necessita de investigações mais detalhadas. Contudo, os testes *in vivo* apresentados demonstraram que esta toxicidade pode ser reduzida pela associação da Lyso-7 nas diferentes NC. É difícil determinar a fração de Lyso-7 não associada às NC após a sua administração *in vivo*, contudo, as NC são capazes de reter uma alta fração de Lyso-7, como observado pela avaliação da liberação da Lyso-7 em PBS *in vitro* realizado por Garcia (2011) (figura 5). Esta retenção da Lyso-7 dentro das NC pode ter reduzido a fração livre na circulação sanguínea e consequentemente reduzindo a toxicidade. Essa pode ser a diferença chave dos efeitos tóxicos entre a Lyso-7 livre e nas formulações de NC.

A figura 12 apresenta as curvas de concentração plasmática × tempo para a Lyso-7 em solução e nanoencapsulada em diferentes NC poliméricas, após a administração endovenosa. Os valores de concentração plasmática encontrada em até 1 hora após a administração foram significativamente maiores (p<0,05) para a Lyso-7 em NC quando comparada com a Lyso-7 livre.

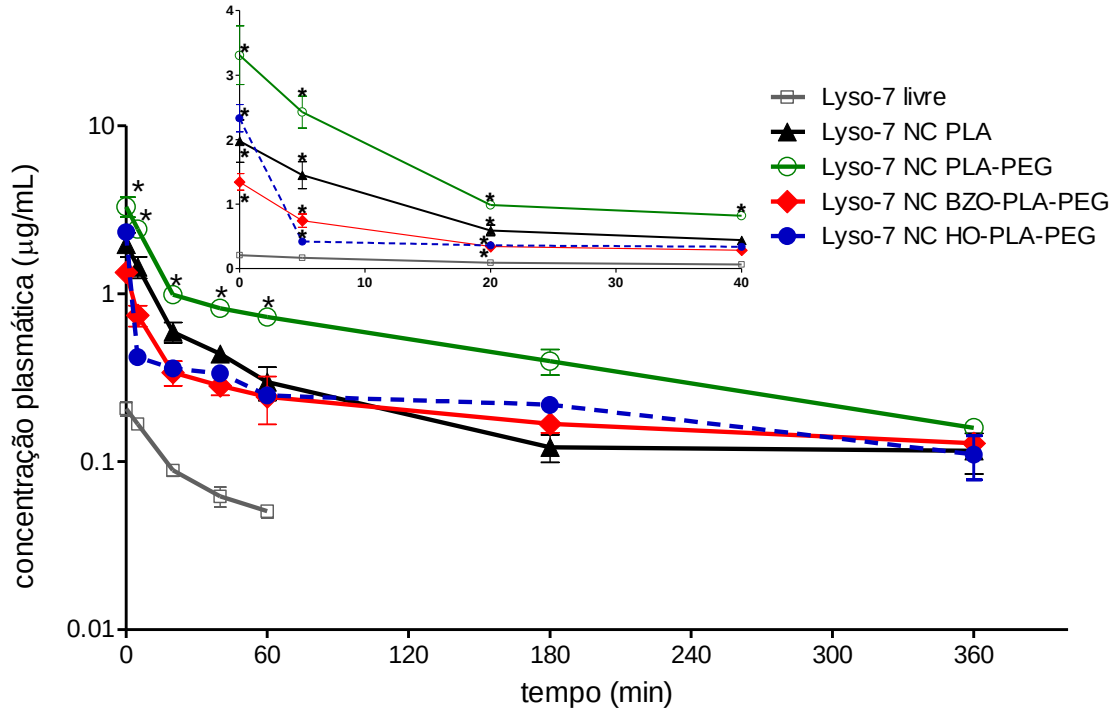

Figura 12: *Perfis de concentração plasmática em função do tempo da Lyso-7 após administração intravenosa na dose de 1,6 mg/Kg na forma livre (em solução) e nas diferentes formulações de NC com variação dos polímeros (média ± erro padrão, n = 6). *diferente da Lyso-7 livre (two-way ANOVA).*

Após 1 hora da administração da Lyso-7 livre, sua concentração plasmática não foi detectável pelo método cromatográfico usado e não foi possível ser determinada uma vez que os valores estavam abaixo do LQ. Valores mais altos de concentração plasmática foram recuperados para a Lyso-7 nanoencapsulada mesmo após 1 hora. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados e estão apresentados na tabela 10, abaixo. Observa-se um perfil muito mais sustentado para a Lyso-7 associada à NC de PLA-PEG sem funcionalização.

Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos da Lyso-7 calculados a partir das concentrações plasmáticas após administração endovenosa em camundongos

Parâmetros [a]	**Lyso-7 livre**	**Lyso-7 PLA NC**	**Lyso-7 NC PLA-PEG**	**Lyso-7 NC HO-PLA-PEG**	**Lyso-7 NC BZO-PLA-PEG**
$ASC_{[0-t]}$ (µg/mL×min)	5,45 ± 0,65	80,43 ± 9,10*	190,65 ± 23,60*	82,84 ± 11,73*	75,51 ± 11,63*
$ASC_{[0-\infty]}$ (µg/mL×min)	5,73 ± 1,05	82,64 ± 7,50*	193,31 ± 22,85*	84,35 ± 12,29*	77,85 ± 10,88*
MRT (min)	27,57 ± 3,47	72,40 ± 13,82*	108,58 ± 19,43*	135,87 ± 11,00*	140,79 ± 31,11*
Cl (mL/min)	244,50 ± 35,20	18,37 ± 2,13*	11,73 ± 2,13*	26,88 ± 3,82*	29,12 ± 9,64*
V_d (mL)	5943 ± 1704	585 ± 34*	378 ± 147*	4248 ± 544	1058 ± 406*
K_e(1/min)	0,042± 0,008	0,031 ± 0,005*	0,031 ± 0,005	0,006 ± 0,002	0,027 ± 0,006
$t_{1/2}$ (min)	16,40 ± 1,40	23,70 ± 2,50*	22,34 ± 3,18*	109,54 ± 12,23*	25,10 ± 7,57

[a]*tempo (t) foi de 60 min para Lyso-7 livre e de 360 min para Lyso-7 nas NC; Dados expressos como media ± erro padrão (n = 6); Doses administradas: 1,6 mg/Kg Lyso-7; *diferente da Lyso-7 livre (p<0,05); Cl, clearance ou depuração plasmática, Vd: volume de distribuição aparente;* $t_{1/2,}$ *tempo de meia vida plasmática; Ke, constant de eliminação, MRT, tempo médio de residência plasmática.*

A encapsulação aumentou a exposição corporal à Lyso-7, sendo observado um aumento significativo da área sob a curva (ASC_{0-t}) após a encapsulação em todas as formulações nanoestruturadas. O valor de ASC_{0-t} após a administração da Lyso-7 encapsulada foi 14 vezes maior para NC PLA e 35 vezes maior para NC PLA-PEG, em relação à Lyso-7 livre. Além disso, a nanoencapsulação da Lyso-7 aumentou consideravelmente o MRT e o $t_{1/2}$. A depuração plasmática (Cl), o volume de distribuição aparente (V_d) e a constante de eliminação (k_e) foram reduzidos. As NC PLA-PEG aumentaram significativamente a ASC da Lyso-7. Esse prolongamento do tempo de circulação plasmática das partículas e de lipossomas que possuem PEG na superfície já é bastante reportado na literatura (Gref e cols, 1995; Torchilin & Trubetskoy, 1995; Mosqueira e cols, 2001b). As cadeias hidrofílicas e flexíveis do PEG reduzem a opsonização das nanopartículas pelas proteínas plasmáticas, reduzindo assim o seu reconhecimento e a fagocitose pelas células do SFM. Consequentemente, essas nanopartículas permanecem mais tempo na circulação (Gref e cols, 1995). Contudo, os valores de ASC da Lyso-7 em NC de HO-PLA-PEG e BZO-PLA-PEG foram similares à ASC da NC PLA, de aproximadamente 14 vezes maior em relação à Lyso-7 livre. O efeito do uso desses copolímeros funcionalizados pode ser observado 1 hora após a administração, onde a eliminação dessas partículas foi muito lenta até 6 horas. Consequentemente, a K_e da NC HO-PLA-PEG foi 7 vezes menor quando comparada à Lyso-7 livre, e aproximadamente 5 vezes menor que as NC de PLA e PLA-PEG. Além disso, o $t_{1/2}$ das NC HO-PLA-PEG foi significativamente superior. Isso pode indicar uma forte interação entre a Lyso-7 e o polímero funcionalizado HO-PLA-PEG, o que retardaria sua eliminação do plasma. De forma diferente, a inserção dos grupamentos benzil não alterou significativamente a capacidade de retenção da Lyso-7 em relação ao PLA. Pode-se observar valores de K_e e $t_{1/2}$ significativamente inferiores aos valores obtidos com o copolímero PLA-PEG e similares ao de PLA. Os grupos benzil podem ter aumentado a hidrofobicidade do polímero o que resultou em maior retenção da Lyso-7 associada ao carreador, por meio de interações fortes de natureza hidrofóbica entre os grupamentos benzil e os anéis aromáticos da Lyso-7. Nesse caso há maior captação pelo SFM e velocidade de remoção do plasma em relação às NC de PLA-PEG não funcionalizadas com benzil.

Modificações da superfície das nanopartículas como a alteração da carga superficial, adição de ligantes específicos ou funcionalizações por inserção de grupamentos químicos específicos podem alterar o comportamento dos nanocarreadores *in vivo,* conforme recentemente revisado por Amin e colaboradores (2015). Yoo & Mitragotri (2010) demonstraram que a tensão interfacial de partículas de PLGA pode ser controlada através da adição de um grupo ácido carboxílico terminal na cadeia do PLGA. A ionização do grupo carboxilato, controlada pela mudança de pH do meio, altera a hidrofilia da partícula, sua tensão interfacial e consequentemente, o seu comportamento no organismo. A inserção de grupamento benzila na cadeia de PLA foi realizada com o intuito de aumentar a interação com fármacos hidrofóbicos, e dos grupos hidroxila, para aumentar a hidrofilia da cadeia de PLA. Observa-se que não houve grande efeito sobre a % encapsulação, mas ainda não foram estudadas a capacidade de liberação prolongada da Lyso-7 nesses dois novos polímeros. Entretanto, *in vivo*, neste estudo já se observam modificações nos parâmetros farmacocinéticos pela simples inclusão de grupamentos com diferentes hidrofilias no bloco do copolímero PLA-PEG menos exposta à fase aquosa externa.

As análises do perfil farmacocinético da Lyso-7 livre demonstram que o seu $t_{1/2}$ foi muito curto em camundongos, aproximadamente 17 min. Para ser viável o uso da Lyso-7 no diabetes, desordens inflamatórias e cardiovasculares e na síndrome metabólica, torna-se necessário uma permanência mais sustentada da Lyso-7 no compartimento vascular. Neste sentido, o aumento da concentração plasmática da Lyso-7, do MRT e a redução do volume aparente de biodistribuição, obtido com o uso das diferentes formulações de NC poliméricas têm evidentemente efeitos benéficos nos aspectos biofarmacêuticos da Lyso-7 (figura 12 e tabela 10). Estes resultados são similares aos obtidos por Mosqueira e colaboradores (2004), onde a administração de um fármaco hidrofóbico, o halofantrino, associado a formulações de NC convencionais (PLA) e furtivas (PLA-PEG) aumentou a ASC *in vivo* aproximadamente 6 vezes em relação à solução (Mosqueira e cols., 2004). Além disso, estas formulações de NC também aumentaram a dose letal do fármaco associado às NC e reduziram a toxicidade cardíaca nos 30 primeiros min após a administração *i.v.* do halofantrino (Mosqueira e cols., 2004; Leite e cols*.,* 2007). Os valores de *Cl* da Lyso-7 foram reduzidos significativamente pelo seu

encapsulamento nas NC poliméricas, provavelmente devido à sua liberação mais prolongada *in vitro.* O perfil de liberação *in vitro* da Lyso-7 a partir de diferentes formulações de NC foi previamente realizado por Garcia (2011) (figura 5).

Em um estudo realizado por Santin e colaboradores (2013a), a dose de 1 µM (0,45 µg/mL) de Lyso-7 inibiu a COX-1 e COX-2 e a doses de 10 e 50 µM (correspondentes a 50% da atividade máxima) ativaram, *in vitro*, os receptores PPAR-α, PPAR-β/δ e PPAR-γ (Santin e cols*.,* 2013a). Assim, se definirmos a concentração mínima efetiva (CME) como 10 µM (4,48 µg/mL), relativa a estas atividades no plasma, seriam necessários pelo menos 3 tempos de meia-vida para que a concentração plasmática da Lyso-7 permaneça acima da CME após a administração *i.v.* de 1,6 mg/Kg. Isto corresponde a aproximadamente 50 e 70 min após a administração da Lyso-7 livre e Lyso-7 NC PLA e PLA-PEG, respectivamente. A dose oral de 3 mg/Kg de Lyso-7 reduziu a infiltração de neutrófilos em camundongos (Santin e cols*.,* 2013b) o que corrobora com os cálculos acima mencionados. Consequentemente, a dose de 1,6 mg/Kg administrada *i.v.* nos experimentos de farmacocinética pode ser capaz de ativar os receptores PPAR bem como inibir COX-1 e COX-2 em camundongos. Estes resultados estão de acordo com as observações anteriores, onde a Lyso-7 foi empregada no tratamento de doenças mediadas pela migração de neutrófilos e no restabelecimento da microcirculação gástrica causado por lesão gástrica induzida *in vivo,* conforme relatado por Santin e colaboradores (2013b).

5.3 Biodistribuição da Lyso-7

Os perfis de distribuição da Lyso-7 no baço, coração, fígado, pulmão e rim estão apresentados na figura 13, como a concentração de Lyso-7 em µg/g de tecido 10, 30 e 60 min após a administração. As concentrações de Lyso-7 em todos os tecidos no tempo de 10 min foram significativamente maiores (p<0,05) quando esta foi administrada em NC poliméricas, em relação a sua administração em solução. A ASC da Lyso-7 NC PLA e da Lyso-7 NC PLA-PEG aumentou (p<0,05), respectivamente, no coração (3,6 e 9 vezes), no fígado (1,8 e 3,8 vezes), no baço

(2,3 e 2,1 vezes), no pulmão (2,8 e 2,9 vezes) e no rim (2 e 2,2 vezes), em comparação à Lyso-7 em solução (figura 13).

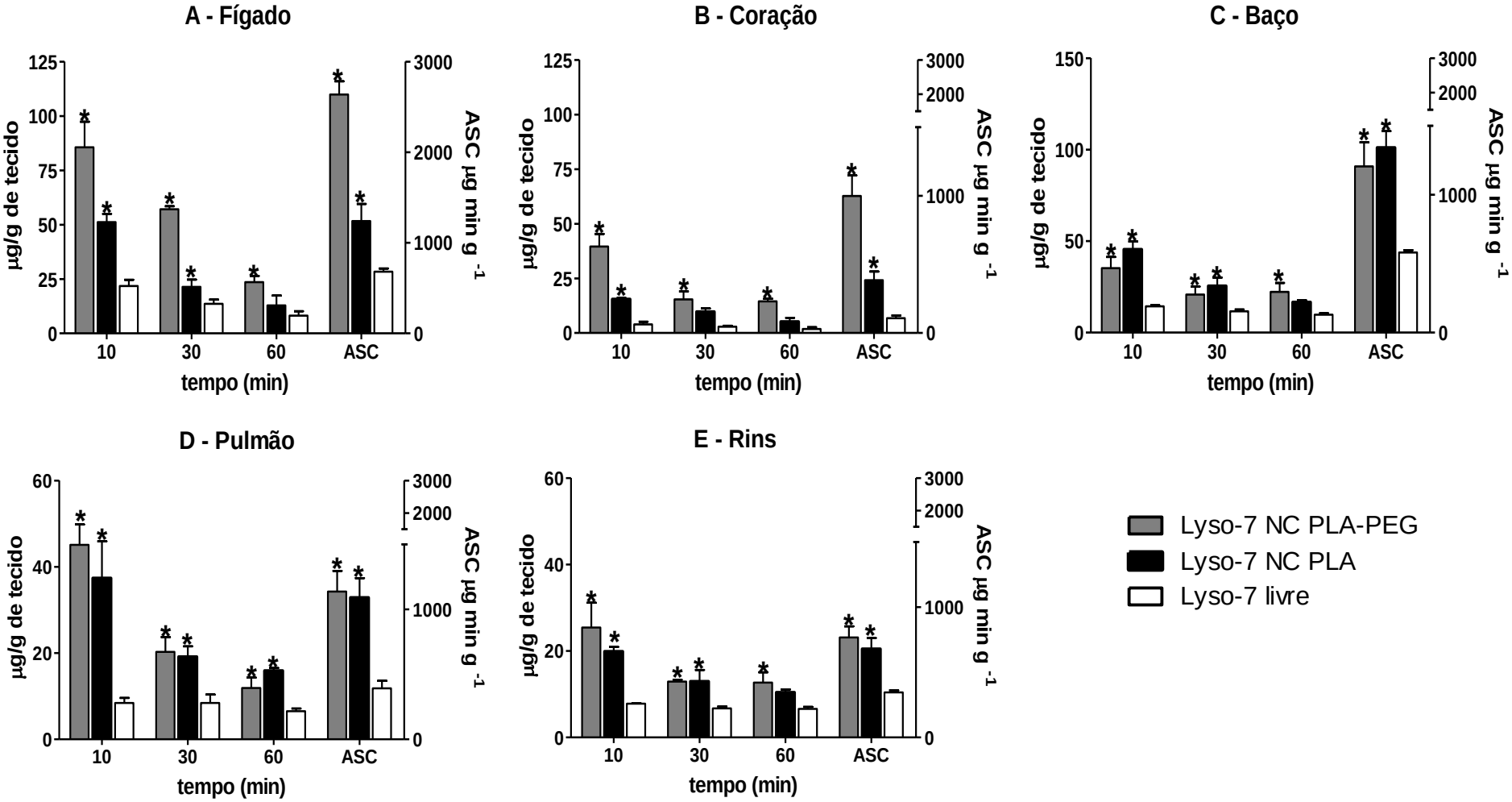

Figura 13: *Concentrações de Lyso-7 no fígado (A), coração (B), baço (C), pulmão (D) e rim (E) de camundongos 10, 30 e 60 min após administração i.v. da Lyso-7 livre (barras brancas), Lyso-7 NC PLA (barras pretas) e da Lyso-7 NC PLA-PEG (barras cinza) e da área sob a curva (ASC) no eixo direito do gráfico. Dose administrada: 1,6 mg/Kg de Lyso-7. *p<0,05 comparado com a Lyso-7 livre (n = 4).*

Tabela 11: Efeito da perfusão dos órgãos com PBS na concentração tecidual da Lyso-7 10 min após administração

	Sem perfusão		**Perfundido**	
	Coração[a]	**Fígado[a]**	**Coração[a]**	**Fígado[a]**
Lyso-7 PLA NC	15,48 ± 2,33	51,17 ± 7,47	13,81 ± 0,96	49,90 ± 5,69
Lyso-7 livre	3,96 ± 1,42	20,82 ± 4,58	3,60 ± 0,49	20,47 ± 6,23

[a] *Média de µg/g de tecido ± desvio padrão (n = 4). Dose administrada: 1,6 mg/Kg.*

As concentrações encontradas no fígado e no baço foram muito maiores quando a Lyso-7 foi administrada em NC PLA e em NC PLA-PEG que sua administração em solução (figura 13). Fagócitos residentes do SFM, como já descrito por muitos autores (Gref e cols., 2000; Mosqueira e cols., 2001b; Pereira e cols., 2009; Oliveira e cols., 2011), são os maiores responsáveis pela captação sanguínea de NP, promovendo sua acumulação no fígado, baço e medula óssea. Por outro lado, o aumento dos níveis de Lyso-7 no coração quando administrada nas NC (figura 13B) foi inesperado. Para um melhor entendimento deste resultado, o sangue dos órgãos foi removido por perfusão com salina (tabela 11) e as concentrações dos órgãos perfundidos foram dosadas novamente. Contudo, nenhuma diferença significativa foi observada na quantificação da Lyso-7 no fígado e no coração com ou sem perfusão, indicando que a concentração da Lyso-7 no coração não está relacionada ao fluxo sanguíneo, mas provavelmente a uma afinidade específica da substância por este órgão após sua exposição plasmática mais prolongada. Além disso, este acúmulo não parece estar relacionado à toxicidade da Lyso-7 livre observada após sua administração *i.v.,* uma vez que a sua concentração no coração aumenta com a administração de Lyso-7 nanoencapsulada e, neste caso, não foram observados sinais de toxicidade. Outra hipótese é que a captação de NC contendo Lyso-7 por diferentes tecidos em um perfil de biodistribuição modificada pode reduzir a toxicidade. De fato, foram observadas grandes modificações na biodistribuição da Lyso-7 após a nanoencapsulação.

Quando um fármaco é administrado na forma de uma dose única pela via endovenosa, a sua absorção pode ser considerada instantânea desde que todo o fármaco entre na circulação imediatamente. A taxa de captação tecidual irá

depender da sua lipofilia, do fluxo sanguíneo do tecido, do peso molecular do fármaco e da sua afinidade de ligação aos tecidos (Shargel e cols*.,* 2012). Após a administração *i.v.,* a Lyso-7 foi rapidamente distribuída por todos os tecidos avaliados, como evidenciado pelo seu rápido decaimento no plasma, atingindo a concentração máxima tecidual em 10 min (figuras 12 e 13). Esta é, provavelmente, uma consequência da alta lipofilia da Lyso-7 (log*P* = 5,64) e da sua habilidade em permear barreiras biológicas, o que induz uma rápida distribuição tecidual e um alto V_d. As NC retêm a Lyso-7 no plasma por um período mais prolongado, o que pode estar relacionado com uma liberação mais lenta da Lyso-7 ou com da ligação NC contendo Lyso-7 em lipoproteínas plasmáticas, como recentemente observado por Benita e colaboradores (2013) em NC PLGA. Contudo, as NC produzidas com o polímero PLA-PEG apresentaram uma maior captação pelo fígado quando comparadas com a administração de NC PLA. Valores negativos de potencial, mesmo na presença de PEG como discutido no capítulo 1, podem reduzir a resistência a adsorção proteica dos carreadores (Sant e cols*.,* 2008;. Mosqueira e cols., 2001). Outros fatores que podem influenciar na taxa de adsorção por proteínas plasmáticas estão relacionados ao tamanho da cadeia e a densidade de PEG presente no copolímero. A adsorção de proteínas pode ser reduzida tanto com o aumento do peso molecular do PEG quanto pelo aumento da densidade de PEG ligado ao polímero, permitindo um maior recobrimento da superfície das partículas (Gref e cols*.,* 2000). Estes fatores podem ter influenciado na grande captação das NC PLA-PEG pelo fígado e baço, além dos dados da farmacocinética que mostraram que a ASC plasmática de NC PLA-PEG foi 2,4 vezes maior quando comparada a PLA NC (tabela 10), aumentando o tempo de exposição da Lyso-7 e, consequentemente, sua concentração tecidual.

A rápida redução da concentração da Lyso-7 nos tecidos, observada 30 min após a sua administração nas NC comparadas com a Lyso-7 livre, indica um mecanismo eficiente de depuração tecidual para nas NC contendo Lyso-7 (figura 13). Saxena e colaboradores (2009) analisaram o perfil do marcador fluorescente indocianina verde (log *P* = 6) em PLGA NC e um perfil de distribuição similar foi observado em diferentes órgãos (Saxena e cols*.,* 2006). Também foi observada uma redução da concentração do marcador associado a NC nos diferentes órgãos de 10 a 30 min após a administração de, aproximadamente, 55%

no fígado, 20% no baço, 40% nos pulmões, 17% no coração e de 30% nos rins. Valores semelhantes foram encontrados nos perfis de biodistribuição da Lyso-7 (log *P* = 5,6) relatados acima com, com uma depuração tecidual de 10 a 30 min após a administração de 56% no fígado, 45% no baço, 50% nos pulmões, 40% no coração e 20% nos rins. Semelhantemente, nos 10 min iniciais após a administração foi observado um aumento da indocianina verde de 1,8 vezes no fígado, 5.5 vezes no baço, 4 vezes no coração, 8 vezes nos pulmões e 5 vezes nos rins, o que corrobora com os resultados apresentados para a Lyso-7. A semelhança entre tais estudos pode ser atribuída aos valores de lipofilia das substâncias avaliadas, que possui uma forte correlação com a permeação e a eliminação em diferentes órgãos. A afinidade de um fármaco por um tecido depende fortemente de suas características lipofílicas e de permeabilidade e, infelizmente, a separação da fração da substância livre da encapsulada no plasma ou nos tecidos é muito difícil de ser realizada experimentalmente após a administração *in vivo.* Contudo, a farmacodinâmica investigacional aqui apresentada para da Lyso-7 e o método para a sua quantificação nos tecidos mencionados poderão ser usadas como uma ferramenta no estabelecimento da faixa terapêutica necessária e na potencialidade da Lyso-7 em subsequentes experimentos *in vivo*.

Como observado na figura 13, a Lyso-7 apresentou uma afinidade de ligação em alguns tecidos, como o coração e o fígado. Neste sentido, o uso de triglicerídeos de cadeia média (TCM) nas formulações de NC podem parcialmente ser responsável na biodistribuição da Lyso-7 encapsulada. O uso de TCM como componente do núcleo de NC possui algumas vantagens, como a alta capacidade de dissolver moléculas comparado com os triglicerídeos de cadeia longa (TCC), baixa acumulação no tecido adiposo e fígado, rápida depuração plasmática, baixa capacidade de induzir a síntese de mediadores pró-inflamatórios e resistência a oxidação (Olivecrona & Olivecrona, 2010). Têm sido sugerido que grandes quantidades de TCM são retiradas do sangue por diferentes tecidos sem modificações de sua estrutura (Ton e cols*.,* 2005; Savonen e cols*.,* 2015), o que poderia no caso da Lyso-7, aumentar a sua associação nestes mesmos tecidos.

Muitas tentativas para se definir o destino das pequenas gotas de óleo após a administração endovenosa de partículas lipídicas já foram relatadas (Ferezou e

cols., 1999; Sakaeda & Hirano, 1998; Lainé e cols., 2014; Hultin e cols., 2015). Após a administração endovenosa, as gotículas lipídicas podem alcançar as apoliproteínas (apoC-II e apoE) através do HDL e são geralmente metabolizadas como quilomícrons endógenos ou podem ser reconhecidas como um corpo estranho e serem eliminadas pelo SFM, como relatado na literatura (Ferezou e cols., 1999; Sakaeda & Hirano, 1998; Lainé e cols., 2014; Hultin e cols., 2015; Calder e cols., 2015).

Os TCM são bons substratos para se ligarem a lipases lipoprotéicas endoteliais (LPL) que medeiam a lipólise dos triglicerídeos. Estudos demonstraram que a inclusão de TCM na mistura de triglicerídeos acelera a lipólise, levando a uma rápida produção de pequenas moléculas remanescentes, que são eficientemente captadas pelos tecidos por um transportador membranar de ácidos graxos, altamente expresso no coração, tecido adiposo e músculo esquelético (Olivecrona & Olivecrona, 2010).

As LPL expressas no endotélio de diferentes órgãos desempenham um papel importante no aumento da sensibilidade à insulina induzido por agonistas PPAR (Kim e cols., 2001). De fato, as gotas de óleo dos TCM aumentam o contato dos triglicerídeos com estas enzimas no endotélio e aumentam sua transferência uma vez que TCM possuem solubilidade 4 vezes maior pela interface membrana/água, comparado a outros triglicerídeos usados no preparo de NP lipídicas sólidas ou semissólidas, por exemplo. Uma vez que o endotélio de alguns tecidos é um dos possíveis alvos celulares da Lyso-7 (novo agonista PPAR), a sua associação com o núcleo oleoso de TCM em NC pode apresentar efeitos benéficos no seu direcionamento para o endotélio, aumentando os efeitos na sensibilização à insulina e no desenvolvimento da aterosclerose, relatado para esta classe de fármacos (Savonen e cols., 2015; Kim e cols., 2001; Fajas e cols., 2001). Recentemente, foi demonstrado que o tratamento de camundongos LDLr-/- com a Lyso-7 reduziu o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, reduziu os níveis de glicose, melhorou o perfil lipídico e reduziu a expressão de CD40 e CD40L sem efeito no peso dos animais. Estes resultados indicam que a Lyso-7 atenua a progressão aterosclerótica pela modulação da inflamação e do metabolismo lipídico com efeitos adversos limitados em camundongos (César e cols., 2015).

Recentemente, Attili-Qadri e colaboradores (2013) demonstraram que NC de PLGA foram recobertas por proteínas e fosfolipídios do plasma após a administração oral e *i.v.* (Attili-Qadri e cols*.,* 2013). Este efeito reduziu a liberação do docetaxel no plasma e alterou significativamente a biodistribuição tecidual. Estas observações justificam os resultados aqui apresentados do aumento da retenção da Lyso-7 PLA NC no plasma comparado com sua forma livre. A encapsulação da Lyso-7 no núcleo oleoso das NC poliméricas aumentou os níveis plasmáticos da Lyso-7 após a administração *i.v.,* o que pode estar relacionado com a associação da Lyso-7 com essas lipoproteínas, seguindo da sua distribuição nos tecidos. Como previamente demonstrado, quanto maior for a expressão de LPL no endotélio de um tecido específico, uma maior quantidade de lipídeo associado aos quilomícrons serão captados. Em experimentos anteriores, 5% da dose administrada de um quilomícron marcado foi recuperado no coração 2 minutos após a administração *i.v.* (Savonen e cols*.,* 2015). Esta pode ser uma hipótese para a alta associação da Lyso-7 nanoencapsulada no coração.

Os agonistas PPAR-γ, particularmente a pioglitazona, possui propriedades cardioprotetoras em pacientes com diabetes do tipo 2 (Wilding, 2012). Vale ressaltar que a Lyso-7, também um agonista PPAR-γ (Santin e cols*.,* 2013a), pode ser uma alternativa interessante na promoção de efeitos cardioprotetores e ainda, por ter apresentado uma aumentada concentração no coração após sua nanoencapsulação. Como revisado e discutido por Consoli & Formoso (2013), o uso de TZD, particularmente a Pioglitazona, possui algumas vantagens, até o surgimento de um novo modulator PPAR-γ capaz de apresentar os efeitos positivos da Pioglitazona com menos efeitos adversos e melhor tolerabilidade. Além disso, foi relatado que após uma única injeção intramuscular, NP PLGA contendo Pioglitazona se acumulam nos capilares e no endotélio. Ainda, estas NP na dose de 1 µg/Kg resultaram em uma maior angiogênese e efeitos aterogênicos e aumentaram o fluxo sanguíneo ao passo foi necessário uma dose de 1000 µg/Kg da Pioglitazona livre para produzir o mesmo efeito (Nagahama *e cols.,* 2012). Assim, é esperado que a administração de NC PLA e NC PLA-PEG possa ser útil no aumento da concentração da Lyso-7 no endotélio (Santin e cols*.,* 2013b). Contudo, os potenciais efeitos adversos cardíacos da sua administração crônica necessitam ser investigados e estudos detalhados *in vitro/in vivo* tornam-se necessários.

Devido aos proeminentes efeitos dos receptores PPAR (α, β/δ, e γ) no metabolismo da glicose e na oxidação e armazenagem dos ácidos graxos, os tecidos que possuem maior atividade neste processo apresentam elevados níveis de PPAR (Attili-Qadri e cols*.,* 2013). Neste sentido, receptores PPAR-δ possuem ampla expressão, ao passo que os receptores PPAR-α são altamente expressos no fígado, rim, coração, intestino, músculo esquelético e tecido adiposo. Já os receptores PPAR-γ são expressos no tecido adiposo, vascular e nas células imunes, retina, intestino e cérebro (Braissant e cols*.,* 1996). Uma vez que a expressão de PPAR apresenta uma gama de distribuição tecidual, os ligantes sintéticos de PPAR podem apresentar efeitos pleiotrópicos, além de efeitos na redução de glicose e lipídeos (Ahmadian e cols*.,* 2013). Estes efeitos incluem a modulação de vias de inflamação no coração (Blasi e cols*.,* 2009), fígado (Lee e cols*.,* 2012), rim (Sarafidis & .Bakris, 2006) e pulmão (Lakshmi e cols*.,* 2013), bem como nos mecanismos envolvidos na progressão da nefropatia diabética (Sarafidis & Bakris, 2006). Assim, o aumento das concentrações de Lyso-7 no fígado, coração, pulmão e rim podem afetar os processos patofisiológicos e fornecer efeitos benéficos a esta substância. Todavia, são necessários maiores investigações para elucidar se a ativação local de PPAR pode também estar envolvida em efeitos adversos, como os apresentados pelas TZD.

Portanto, considerando os efeitos benéficos da redução da toxicidade aguda e dos perfis de farmacocinética/biodistribuição após a administração endovenosa da Lyso-7 nas NC poliméricas descritas acima, esta nova TZD, com eficácia aumentada *in vivo* quando comparada a outros agentes anti-inflamatórios (Santin e cols*.,* 2013a; Santin e cols*.,* 2013b) é uma formulação promissora a ser avaliada no tratamento experimental de desordens metabólicas de degenerativas, como o diabetes tipo 2 e a aterosclerose.

CAPÍTULO III

Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e cardíacos da toxicidade da Lyso-7 livre e nanoencapsulada

1. INTRODUÇÃO

No desenvolvimento de novas nanopartículas adequadas à administração parenteral ou oral, torna-se crucial o conhecimento de suas características físico-químicas, que irão influenciar diretamente no comportamento da partícula no organismo e na sua interação com os órgãos e células. Os efeitos tóxicos advindos da administração destas formulações são etapas essenciais na avaliação pré-clínica de novas substâncias ativas ou novas formas farmacêuticas, principalmente no caso de sistemas nanoestruturados.

Além disso, a avaliação da segurança pré-clínica de um fármaco e de sua forma farmacêutica para administração envolve a avaliação dos efeitos sobre o sistema cardiovascular, sistema hepático, renal, sistema nervoso central e sistema respiratório. Geralmente estes testes são realizados antes da exposição humana ao composto. Assim, torna-se essencial a avaliação dos efeitos tóxicos da administração da Lyso-7, livre e nanoencapsulada, pela análise de alterações sanguíneas, hepáticas, renais e principalmente cardiovasculares, uma vez que há relatos de graves efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular associada ao uso clínico de TZD, como a insuficiência cardíaca.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a toxicidade aguda das diversas formulações de NC brancas e de NC contendo Lyso-7 quanto aos parâmetros de toxicidade hematológicos, hepáticos e renais *in vivo* em camundongos *Swiss;*
2. Avaliar o efeito *in vitro* da Lyso-7 sobre miócitos ventriculares recém-isolados do coração de camundongos C57BL/6;
3. Avaliar a segurança da administração crônica da Lyso-7 livre e nanoencapsulada *in vivo* frente a toxicidade sobre o sistema cardiovascular em camundongos C57BL/6.

3. MATERIAIS

Para o preparo das formulações NC foram utilizados os mesmos reagentes descritos nos capítulos anteriores. NaCl, $MgCl_2$, HEPES, $CaCl_2$, NaOH, glicose e Triton X Foram adquiridos da Sigma-Aldrich (França e Brazil). Indo-1AM foi adquirido da Invitrogen (França) e Fluo-4-AM da Molecular Probes, Eugene, OR. A enzima liberase de alto grau de pureza foi fornecida pela Roche (Basel, Suíça).

4. MÉTODOS

4.1 Avaliação da toxicidade aguda *in vivo*

4.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas utilizados em igual número, pesando de 23-25 g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência em Animal da UFOP (CCA) e mantidos de acordo com o guia estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo nº 2013/26). Os animais foram mantidos no ciclo de 12 horas dia/noite, temperatura de 22 ± 2ºC, dieta padrão e água *ad libitum*.

4.1.2 Protocolo experimental

Os animais (*n* = 10), machos e fêmeas, foram distribuídos em 6 grupos experimentais conforme delineamento apresentado na figura 14. A Lyso-7 foi administrada na dose de 2 mg/kg, tanto na sua forma livre quanto nas diferentes formulações de NC. Todos os grupos receberam uma dose única por via endovenosa *in bolus* de 200 µL da formulação na concentração de 0,5 mg/mL. Após a administração, os animais foram monitorados por 14 dias e as alterações de peso,

os sinais de toxicidade e o número de mortes diárias foram avaliados. Nos animais do grupo controle foram administradas 200 µL de uma solução de glicose 5%.

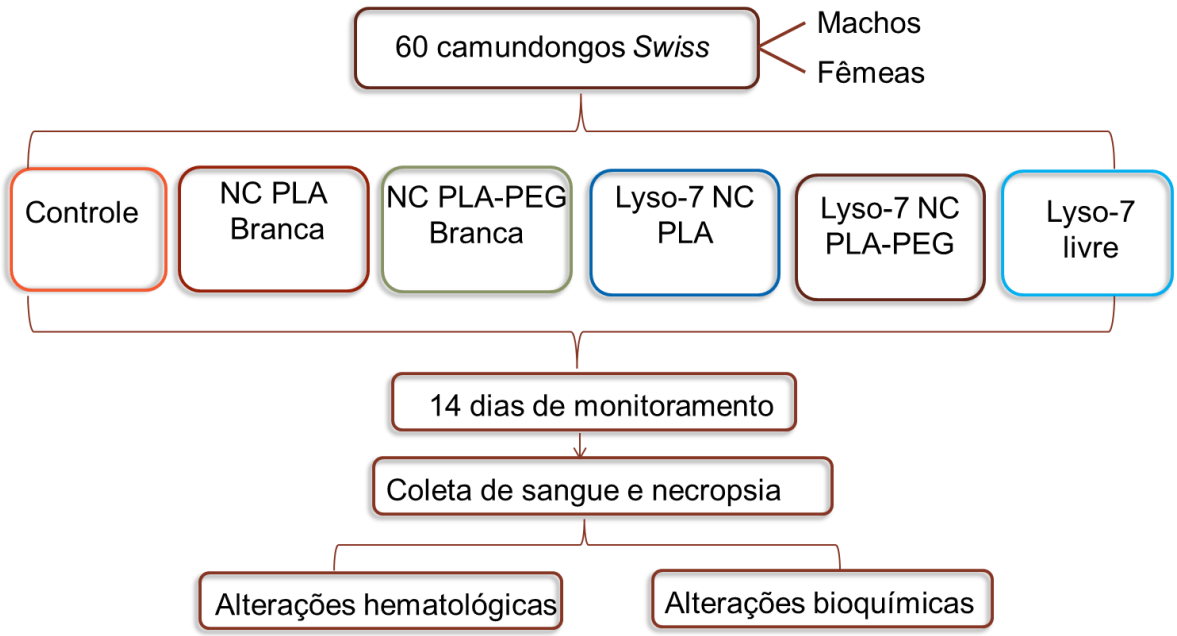

Figura 14: *Delineamento experimental do teste de toxicidade aguda in vivo segundo o guia do ICH, 2009.*

4.1.3 Análises hematológicas, hepática e renal

Todas as análises foram realizadas nos animais que sobreviveram após os 14 dias do tratamento com a solução salina, as diferentes NC sem a Lyso-7 (brancas), Lyso-7 livre e encapsulada. Os camundongos foram anestesiados com (ketamina 60 mg/kg e xilazina 7,5 mg/kg) e as amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA 0,18% (para análises hematológicas realizadas no mesmo dia) e tubos sem anticoagulante (para análises bioquímicas), onde o plasma e o soro respectivamente foram separados e armazenados a -20ºC até a análise. Após a coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos foram coletados para posterior análise histológica. Os parâmetros hematológicos avaliados incluíram a contagem de hemácias (Hm), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), leucócitos (Leuc) e plaquetas (PLAQ). As análises foram realizadas utilizando um analisador automático (BC-2800Vet, Mindray) calibrado para a quantificação em

sangue de camundongos. As alterações da função hepática e a nefrotoxicidade foram avaliadas bioquimicamente utilizando reagentes químicos. Foram realizadas as medidas da alanina transaminase (AST) e aspartato transaminase (ALT). A nefrotoxicidade foi avaliada pela determinação das concentrações de ureia no sangue e creatinina no soro. Todas as análises bioquímicas foram realizadas por espectrofotometria utilizando-se um autoanalizador (Wiener Lab modelo CM200) e kits de diagnóstico de análise cinética da linha Cristal, doados pelo laboratório Bioclin-Quibasa (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Os resultados foram expressos como média do grupo ± desvio padrão.

4.2 Avaliação da cardiotoxicidade

A avaliação da influência a Lyso-7 na fisiologia e funcionamento dos cardiomiócitos foi realizada *in vitro* e *in vivo.* Todos os testes foram realizados sob orientação do Dr. Sylvain Richard na Université de Montpellier e Institute National de la Santé et la Rechaerche Médicale (INSERM U1046), no laboratório de Fisiologia & Medicina Experimental do Coração e Músculos, na França.

4.2.1 Animais

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê Local de Pesquisas em Animais (Languedoc Roussillon, n° CE-LR-0714). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a diretriz europeia 2010/63 e o Concelho de Proteção Animal de 22 de setembro de 2010. Camundongos C57BL/6 machos de 7 semanas foram fornecidos pelo instituto Janvier (Le Genest-Saint-Isle, França), mantidos no ciclo de 12 horas dia/noite, temperatura de 22 ± 2ºC, dieta padrão e água *ad libitum*.

4.2.2 Isolamento de cardiomiócitos de camundongos

Os experimentos com células foram realizados com miócitos recém-isolados do ventrículo esquerdo de camundongos C57BL/6. Resumidamente, o coração do animal foi removido, após eutanásia dos camundongos por deslocamento cervical. Estes foram limpos e a aorta foi canulada e fixada ao sistema de Langendorff para o início da perfusão retrógrada. A perfusão foi realizada com fluxo de 5-10 mL/min, a 37ºC e durante 6-8 minutos com solução Tyrode contendo: (em mM) 135 NaCl , 1 $MgCl_2$, 2 HEPES, 4 KCl, 1,8 $CaCl_2$, 10 Glicose, ajustada para pH 7.4, com NaOH e 0,1 g/mL de liberase. Após a digestão enzimática, o ventrículo esquerdo foi removido, depositado numa placa e cortado em pequenos pedaços para separação das células. Os miócitos isolados foram ressuspensos na mesma solução de Tyrode sem a enzima e a concentração de Ca^{2+} das células ventriculares foi aumentada gradualmente pela adição de $CaCl_2$ (0,1 M) em 4 passos: 1) adição de 10 µL e incubação por 5 minutos; 2) adição de 10 µL e incubação por 5 minutos; 3) adição de 30 µL e incubação por 10 minutos; 4) adição de 50 µL e incubação por 20 minutos. A suspensão de miócitos foi mantida em temperatura ambiente até serem utilizadas. Apenas células tolerantes ao cálcio, quiescentes e com estrias bem definidas foram utilizadas. Os cardiomiócitos isolados foram utilizados entre 1-6 horas após o início da preparação. Para a realização dos experimentos, 50 µL da suspensão de células foi adicionado à 450 µL da solução de Tyrode contendo 0,0018 g/mL de glicose.

4.2.3 Contratilidade do cálcio

As medidas do tamanho do sarcômero (SR) e a fluorescência (405 e 480 nm) foram simultaneamente registrados utilizando-se o sistema IonOptix (Milton, MA). Para o monitoramento do Ca^{2+} livre intracelular, os cardiomiócitos foram marcados com Indo-1AM (10 µM). As células foram estimuladas a 1,0 Hz com pulsos de corrente de 1 ms (IonOptix system, Hilton, USA). O Ca^{2+} fluorescente foi medido por 30

segundos de estímulo (1.0 Hz), seguido por 30 segundos de repouso. Os níveis de Ca^{2+} diastólico, tempo de decaimento do transiente de Ca^{2+} (t) e o número de células que apresentaram contrações involuntárias foram quantificadas.

4.2.4 “Sparks” de cálcio

As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio confocal Zeiss LSM510 (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany) equipado com laser de argônio (488 nm) e uma objetiva de imersão em água de 40×, com resolução axial e radial de 1,0 e 0,4 µm, respectivamente. As *sparks* de Ca^{2+} foram registradas em miócitos quiescentes incubados com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4-AM (4 µM) durante 15 minutos. O comprimento de onda de excitação do marcador foi de 488 nm e a emissão de fluorescência foi capturada por um filtro a 505 nm. Os miócitos foram estimulados a 1Hz com corrente de pulso de 1 ms (milissegundo) gerada por eletrodos de platina. Após estímulo, os miócitos foram repetitivamente escaneados ao longo de todo o comprimento da célula em intervalos de 1,5 ms por no máximo 6 s. A intensidade do laser foi reduzida a 5% para reduzir o dano celular e o fotobranqueamento "bleaching” do marcador. Os *sparks* de Ca^{2+} foram determinados pela medida da intensidade de cada escaneamento sequencial e plotados como média da intensidade em função do tempo. Para a detecção e análise dos *sparks* de Ca^{2+} foi utilizado o programa ImageJ (Collins, 2007) com a ferramenta SparkMaster.

4.2.5 Influência da Lyso-7 sobre os cardiomiócitos *in vitro*

Foram avaliados os efeitos agudos da incubação de Lyso-7 com cardiomiócitos recém-isolados do ventrículo esquerdo (contração e concentração intracelular de cálcio). Para tal, foram utilizados 50 µL da suspensão de células em 450 µL da solução de Tyrode glicosada, acrescido de 5 µL da solução de Lyso-7 nas concentrações finais de 450, 45 e 4,5 µM. As células foram incubadas por 5 minutos, seguido da análise do tamanho do sarcômero e medidas de Ca^{2+} diastólico. Como

controle, foram analisadas células na ausência de Lyso-7 utilizando-se os excipientes da solução. Também foi avaliado o efeito da exposição dos cardiomiócitos com a associação de Lyso-7 e o β-adrenérgico isoproterenol (ISO 10 nM).

4.2.6 Avaliação da administração de NC contendo Lyso-7 sobre os cardiomiócitos *in vivo*

Para a avaliação do efeito crônico da administração de Lyso-7 livre e nanoencapsulada, os camundongos C57/BL6 machos foram tratados com 2 mg/Kg/dia de Lyso-7 durante 7 dias. Os grupos (*n* = 8) foram divididos segundo delineamento abaixo (figura 15). Após o tratamento, os animais foram eutanasiados, seguindo-se da retirada do coração, o isolamento dos miócitos do ventrículo esquerdo e análise do tamanho do sarcômero e medidas de Ca^{2+} diastólico, conforme metodologia já descrita nas seções anteriores.

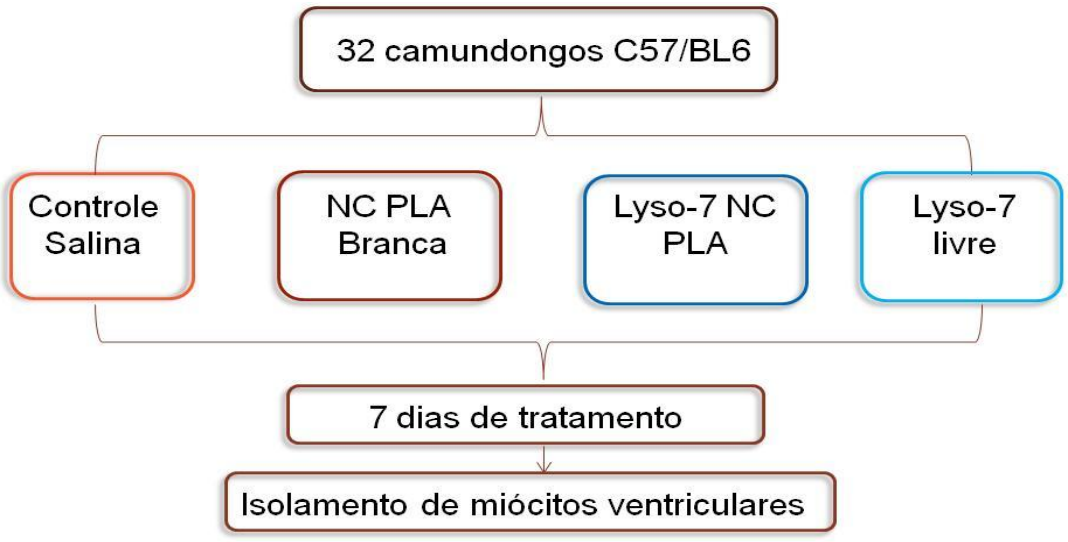

Figura 15: *Delineamento experimental para avaliação da cardiotoxicidade in vivo da Lyso-7 livre e associada a NC poliméricas.*

4.3 Análise estatística

Os dados hematológicos e bioquímicos foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas usando o teste de variância ANOVA one-way seguido do teste de Tukey. Uma probabilidade de 5% foi considerada significante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Toxicidade aguda

Os resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos 14 dias após a administração *intravenosa* da Lyso-7 (1,6 mg/Kg) livre e nanoencapsulada estão representados nas tabelas 12 e 13. Não foram observados sinais de toxicidade após a administração das formulações e durante dos dias avaliados quando comparados ao grupo controle e aos valores normais para esta espécie animal. Entretanto, camundongos fêmeas tratados com a Lyso-7 em NC PLA e NC PLA-PEG tiveram alteração significativa dos parâmetros de hemácias, hemoglobina e hematócrito (tabela 12). De acordo com Drobovolskaia e cols. (2008) as hemácias ocupam uma grande fração do volume sanguíneo, quando comparadas com as células do SFM, assim, uma administração endovenosa de nanopartículas irá interagir com as hemácias antes mesmo de interagir com as células do sistema imune. Este contato inicial com as hemácias com relação à série de interações que ocorrem no sangue, bem como a sua intensidade, torna essencial a avaliação da atividade hemolítica. Apesar do teste de hemólise *in vitro,* apresentado no capítulo 1, indicar que os valores hemolíticos encontrados para essas mesmas formulações foram inferiores aos valores aceitáveis para este tipo celular, esses achados do teste agudo *in vivo* podem indicar anemia. O estudo de biodistribuição dessas NC (capítulo 2) indicou que essas partículas possuem um maior acúmulo no fígado e baço, que são órgãos do SFM, juntamente com a medula óssea. Contudo, para confirmarmos um possível efeito hematopoiético dessas formulações contendo Lyso-7, é essencial realizar a avaliação histológica desses animais. A avaliação histológica está sob análise.

Tabela 12: Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas obtidos 14 dias após o tratamento por via endovenosa de Lyso-7 na dose de 1,6 mg/Kg

Grupos	Sexo	Leuc[a] (× 10^9/L)	Hm[a] (× 10^{12}/L)	Hb[a] (g/dL)	Ht[a] (%)	PLQ[a] (10^9/L)
Controle	**M**	5 ± 1,6	8 ± 0,6	15 ± 0,9	29 ± 2,1	302 ± 45
	F	6 ± 1,0	10 ± 0,8	19 ±1,6	37 ± 4,1	291 ± 60
Lyso-7 livre	**M**	8 ± 1,5	7 ± 0,8	14 ± 0,5	27 ± 0,9	321 ± 39
	F	7 ± 1,3	11 ± 0,8	19 ± 1,7	39 ± 1,7	242 ± 13
Lyso-7 NC PLA	**M**	7 ± 2,3	7 ± 0,6	14 ± 1,3	27 ± 2,5	293 ± 31
	F	3 ± 1,8	5 ± 0,8*	9 ± 1,8*	19 ± 3,7*	263 ± 23
Lyso-7 NC PLA-PEG	**M**	4 ± 1,4	9 ± 1,6	16 ± 2,3	31 ± 1,7	307 ± 31
	F	4 ± 1,9	5 ± 1,3*	9 ± 2,5*	20 ± 4,7*	265 ± 29
NC PLA Branca	**M**	5 ± 0,9	6 ± 1,1	12 ± 2,4	24 ± 3,9	268 ± 33
	F	5 ± 1,1	6 ± 1,3	13 ± 2,3	31 ± 4,9	264 ± 29
NC PLA-PEG Branca	**M**	7 ± 0,9	5 ± 1,1	16 ± 3,1	34 ± 4,9	298 ± 29
	F	6 ± 0,8	8 ± 1,3	18 ± 2,1	38 ± 4,7	270 ± 43

[a]*média ± desvio padrão (n = 10); Leuc (Leucócitos); Hm (Hemácia); Hb (Hemoglobina); Ht (Hematócrito); PLQ (plaquetas).*

Não foram observadas alterações significativas dos parâmetros bioquímicos avaliados (tabela 13). Contudo, ao se avaliar a relação uréia/creatinina houve um aumento significativo dessa relação nos camundongos machos que receberam Lyso-7 em NC PLA e NC PLA branca. Valores elevados de ureia e creatinina plasmática podem indicar insuficiência renal (Leite e cols., 2009). Além disso, nos estágios iniciais da insuficiência renal, a secreção de creatinina pode estar aumentada, consequentemente evitando aumento da sua concentração plasmática (Asna e cols., 2005). Assim, nos estágios iniciais, valores aumentados da relação ureia/creatinina indica uma redução da perfusão renal bem como da taxa de filtração glomerular, como observado para o grupo de machos tratados com Lyso NC PLA e NC PLA branca. Além disso, Emanuele & Balasubramaniam (2014), demonstraram que o uso de poloxamer 188, tensoativo hidrofílico utilizado no preparo das NC de PLA, induz uma disfunção renal dose/dependente, e os danos puderam ser mais

bem avaliados histologicamente. Não houve alteração significativa de ASL e ALT, o que indica que tanto a Lyso-7 livre quanto associada às NC não apresentaram toxicidade hepática neste teste realizado.

O uso das TZD no tratamento de pacientes com diabetes do tipo 2, apesar de apresentar muitos efeitos benéficos como já mencionado, é limitado em função de seus efeitos adversos graves como edema, ganho de peso indução e exacerbação de insuficiência cardíaca (Diamant & Heinhe, 2003; Lincoff e cols*.,* 2007; Nissen & Wolski, 2007; Endo e cols*.,* 2011). Entretanto, nenhum estudo toxicológico foi ainda publicado para essa nova TZD, a Lyso-7.

Assim, pensando nas possíveis aplicações clínicas da Lyso-7 foi realizada avaliação preliminar da sua toxicidade pré-clínica em camundongos, conforme preconizado pelas agências regulamentadoras (ICH, 2009; EMA, 2010; ANVISA, 2013), para avaliar a sua segurança. Análises histopatológicas dos grupos que receberam a dose única de Lyso-7 nas diferentes formulações estão sendo realizadas e são fundamentais para melhor compreender os efeitos da Lyso-7 livre e nanoencapsulada. Além disso, as análises da administração da Lyso-7 em repetidas doses necessitam ser avaliadas uma vez que as alterações relatadas com o uso de TZD possuem uma relação de dose/dependência.

Tabela 13: Parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss machos e fêmeas 14 dias após administração intravenosa de Lyso-7 na dose de 1,6 mg/Kg

Grupos	Sexo	AST[a] (U/L)	ALT[a](U/L)	Creatinina[a] (mg/dL)	Uréia[a](mg/dL)	Ureia/creatinina
Controle	**M**	208 ± 21	27 ± 5,5	0,34 ± 0,10	67 ± 8,9	197,0
	F	188 ± 19	31 ± 1,7	0,44 ± 0,05	52 ± 5,8	122,7
Lyso-7 livre	**M**	184 ± 34	37 ± 7,3	0,43 ± 0,05	71± 9,8	165,1
	F	195 ± 36	32 ± 2,8	0,44 ± 0,07	54 ± 11,5	122,7
Lyso-7 NC PLA	**M**	199 ± 22	31 ± 8,9	0,30 ± 0,12	76 ± 8,5	253,3*
	F	181 ± 38	23 ± 5,2	0,51 ± 0,08	65 ± 21,9	127,5
Lyso-7 NC PLA-PEG	**M**	188 ± 34	34 ± 9,3	0,34 ± 0,05	70 ± 9,8	205,9
	F	201 ± 27	27 ± 9,3	0,49 ± 0,09	59 ± 12,7	120,4
NC PLA Branca	**M**	179 ± 29	21 ± 6,8	0,34 ± 0,08	72 ± 12,4	211,8*
	F	196 ± 19	35 ± 9,3	0,51 ± 0,10	61 ± 13,4	119,6
NC PLA-PEG Branca	**M**	189 ± 29	29 ± 9,2	0,34 ± 0,08	62 ± 12,4	182,4
	F	201 ± 17	32 ± 6,9	0,42 ± 0,08	60 ± 11,8	142,8

AST = Alanina transaminase; ALT = Aspartato transaminase; [a]média ± desvio padrão (n = 10).

5.2 Avaliação dos efeitos agudos da Lyso-7 sobre os cardiomiócitos *in vitro*

Como já exposto, existem muitos relatos do aumento da incidência de insuficiência cardíaca e mortalidade por complicações cardiovasculares com o uso de agonistas do receptor PPAR em pacientes diabéticos (Nissen & Wolski, 2007). Os mecanismos dos efeitos cardíacos destes agonistas responsáveis pela disfunção do miocárdio ainda não são totalmente descritos. Contudo, estudos anteriores demonstraram que ligantes PPAR-γ podem apresentar efeitos eletromecânicos em tecidos cardíacos isolados (Cheng e cols, 2010). Dessa forma, torna-se importante investigar o comportamento dos agonistas PPAR-γ, usados no tratamento do diabetes.

A Lyso-7 foi incubada com cardiomióticos recém-isolados do ventrículo esquerdo nas doses de 4,5, 45 e 450 µM. Não foi observado nenhum efeito no comprimento do SR em repouso e na sua amplitude, em todas as concentrações testadas (figura 16A e 16B). Contudo, ao se avaliar o "encurtamento" (*shortening)* dos cardiomiócitos (índice de contração), houve uma redução significativa na concentração de 450 µM, obtido pelas medidas das alterações do comprimento do SR durante o estímulo (figura 16C). Um maior índice de contração de cardiomióticos corresponde a um aumento da força de contração destas células que podem ser um indicativo de arritmia, associado a alteração na velocidade de relaxamento (figura 16D).

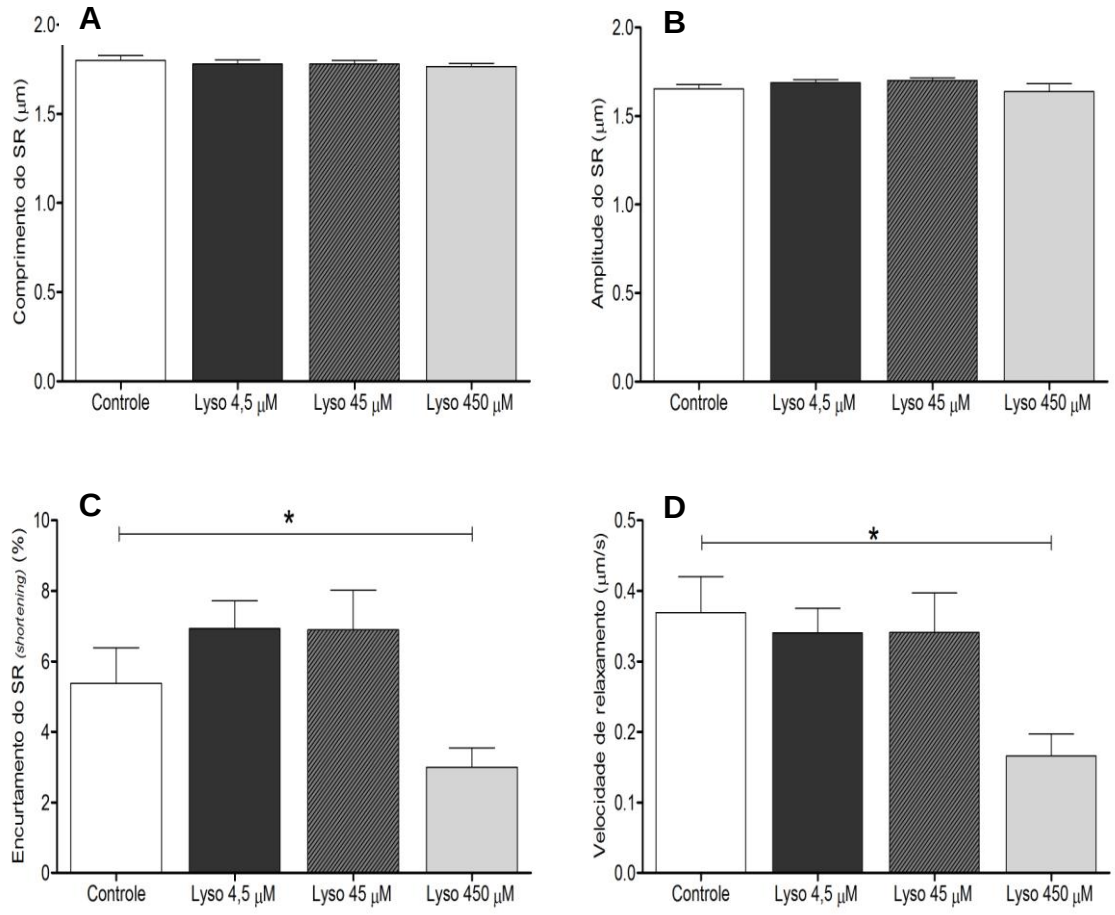

Figura 16*: Efeito da Lyso-7 no comprimento do sarcômero (A), na amplitude (B), no encurtamento (C) e na velocidade de relaxamento (D), avaliado como a porcentagem da linha de base.*

As análises dos transientes de Ca^{2+} (figura 17) não indicaram alteração na amplitude (figura 18A) em todas as concentrações testadas. Em contraste, foi

observado que a Lyso-7 reduziu o tempo de decaimento do transiente de Ca^{2+} na concentração de 450 µM (gráfico 18B). Além disso, em todas as concentrações testadas houve uma redução significativa do nível de Ca^{2+} diastólico (figura 19), que é consistente com a aceleração do decaimento do transiente de Ca^{2+} na concentração de 450 µM.

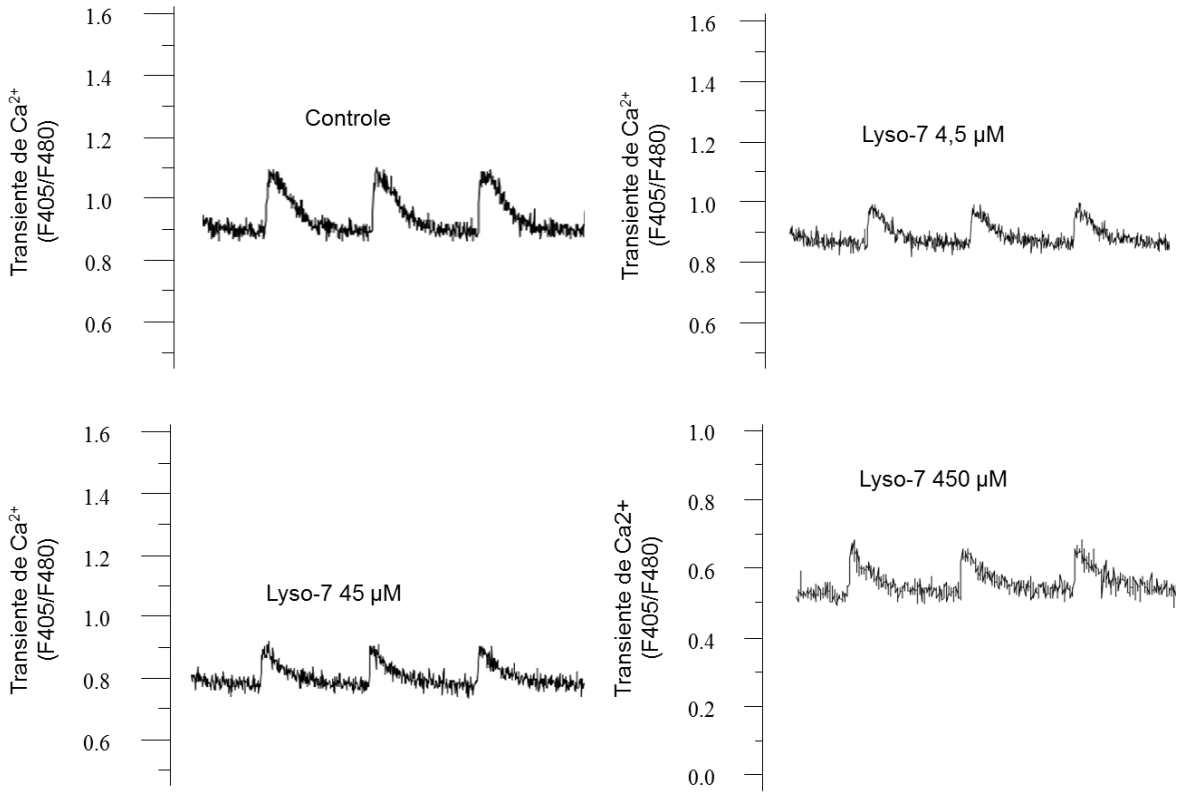

***Figura 17**: Traços representativos do transiente de Ca^{2+}i de miócitos ventriculares após incubação com Lyso-7 em diferentes concentrações.*

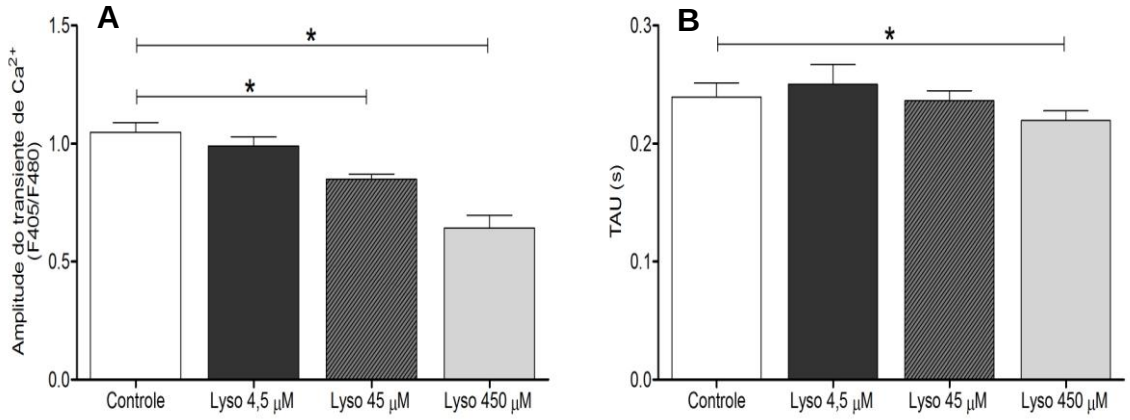

Figura 18: *Efeito da Lyso-7 na amplitude do transiente de Ca^{2+} (A) e na cinética de recaptação (B) em cardiomiócitos ventriculares de camundongos.*

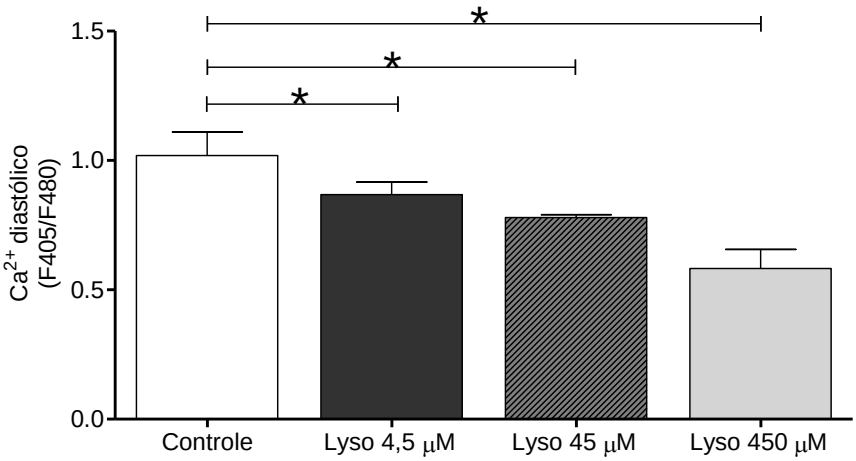

Figura 19: *Efeito da Lyso-7 no Ca^{2+} diastólico de cardiomiócitos ventriculares.*

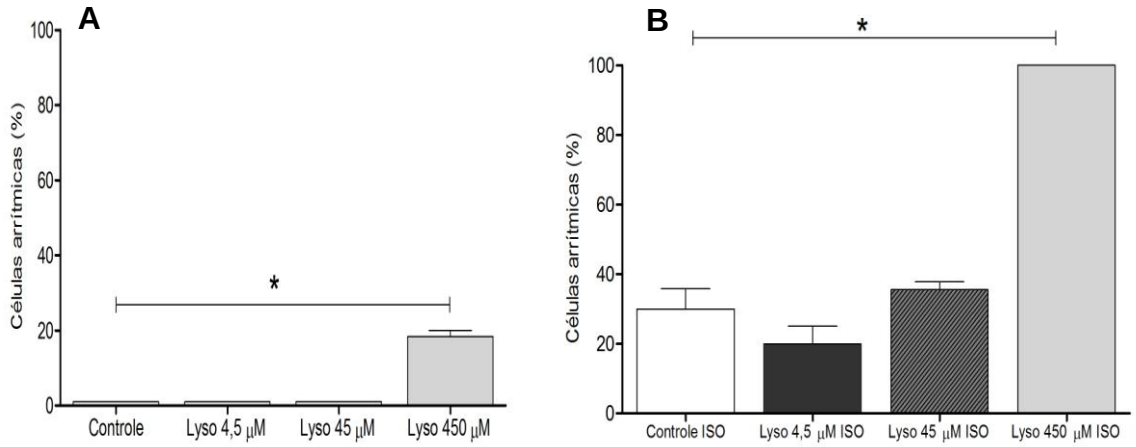

Figura 20: *Indução de arritmias ventriculares em cardiomióticos após a incubação com Lyso-7. (A) basal, (B) após estimulação com ISO 10 nM).*

Em condições basais, a Lyso-7 promoveu ondas ectópicas de Ca^{2+} (figura 20A) na concentração de 450 µM. Estes eventos espontâneos ocorreram na ausência de estímulos extracelulares (durante o período de repouso), seguido por uma maior carga de trabalho gerada pelo estímulo (figura 20A). Esta resposta reflete do mecanismo intrínseco das células (aumento do Ca^{2+} intracelular) e corresponde ao nível cardíaco das contrações ventriculares ectópicas que podem, eventualmente, induzir arritmias. Ondas ectópicas de Ca^{2+} favorecidas pelo β-adrenérgico (ISO 10 nM) (figura 20B) em condições controladas foram drasticamente aumentadas com a Lyso-7 na concentração de 450 µM (100% das células apresentaram ondas espontâneas de Ca^{2+}).

A avaliação da frequência e amplitude dos *sparks* são importantes indicativos do estado funcional do receptor de rianodina (RyR2). Os receptores RyR2 são canais sensíveis a Ca^{2+} que formam aglomerados contendo centenas de canais. Assim, a abertura de poucos canais pode desencadear uma maior liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, formando um *spark* (Bray e cols, 2007). A Lyso-7 na concentração de 450 µM promoveu um aumento na ocorrência de aberturas espontâneas dos receptores RyR2, observados como *sparks* de Ca^{2+} (figura 21). Os *sparks* de Ca^{2+} são naturalmente aumentados com a incubação com ISO, como relatado na literatura e, de maneira similar, a Lyso-7 na concentração de 450 µM, que apresentou número de eventos duplicados quando comparados com o controle. Além disso, a Lyso-7 aumentou o efeito do ISO. Em suma, a Lyso-7 induziu efeitos significativos nos seguintes parâmetros do acoplamento excitação/contração: aumento de contração, aceleração no decaimento do transiente de Ca^{2+}, promoveu abertura dos canais RyR2 durante a diástole (aumento de *sparks*) e uma possível capacidade de induzir ondas espontâneas de Ca^{2+} pró-arritmogênicas. Estes efeitos foram observados somente na concentração de 450 µM, que foi a maior concentração testada e que foi possível solubilizar no tampão. Acima desta concentração a Lyso-7 precipita e os resultados não podem mais ser analisados com precisão. O aumento na recaptura de Ca^{2+} no SR (correlacionado com a redução do Ca^{2+} diastólico) e o escape por RyR2 podem explicar a propensão de ondas ectópicas de Ca^{2+} pró-arrítmicas. Os efeitos induzidos por ISO podem proporcionar efeitos mais intensos deste mecanismo. Para melhor avaliar esses efeitos observados *in vitro,* nos estudos *in vivo*, a Lyso-7 livre e encapsulada em NC

poliméricas foi administrada em camundongos durante 7 dias, seguindo-se avaliação semelhante dos cardiomiócitos isolados.

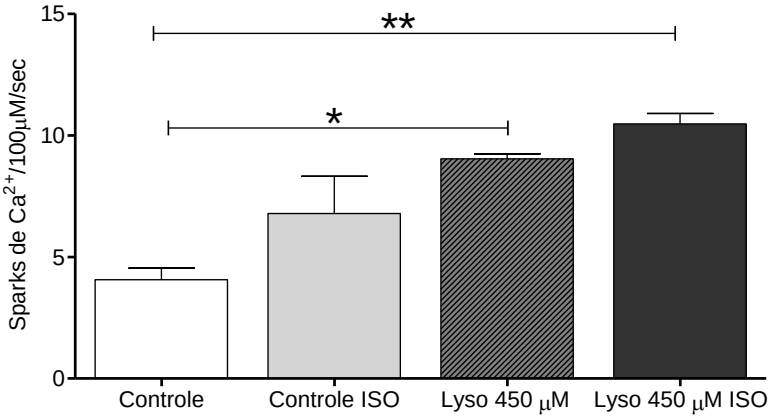

Figura 21: *Efeito da Lyso-7 na indução de sparks de Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares.*

5.3 Avaliação dos efeitos crônicos *in vivo* da administração de Lyso-7 livre e encapsulada em NC em cardiomiócitos isolados

Para avaliar os efeitos crônicos *in vivo* da administração da Lyso-7, camundongos C57/BL6 receberam 1,6 mg/Kg/dia de Lyso-7 livre durante 7 dias. Esta mesma dose foi administrada em NC de PLA. Os grupos controle receberam água e NC PLA branca. Conforme apresentado no figura 22A e 22B, a Lyso-7 não tem efeito sobre o comprimento e na amplitude do SR, respectivamente, durante o período de repouso. Contudo, a administração crônica da Lyso-7 livre provocou uma redução no índice de contração do SR com relação ao grupo controle (figura 22C) e na velocidade de relaxamento (figura 22D). A administração de Lyso-7 NC PLA bem como NC PLA brancas não induziram efeitos no comprimento do SR em relação aos controles.

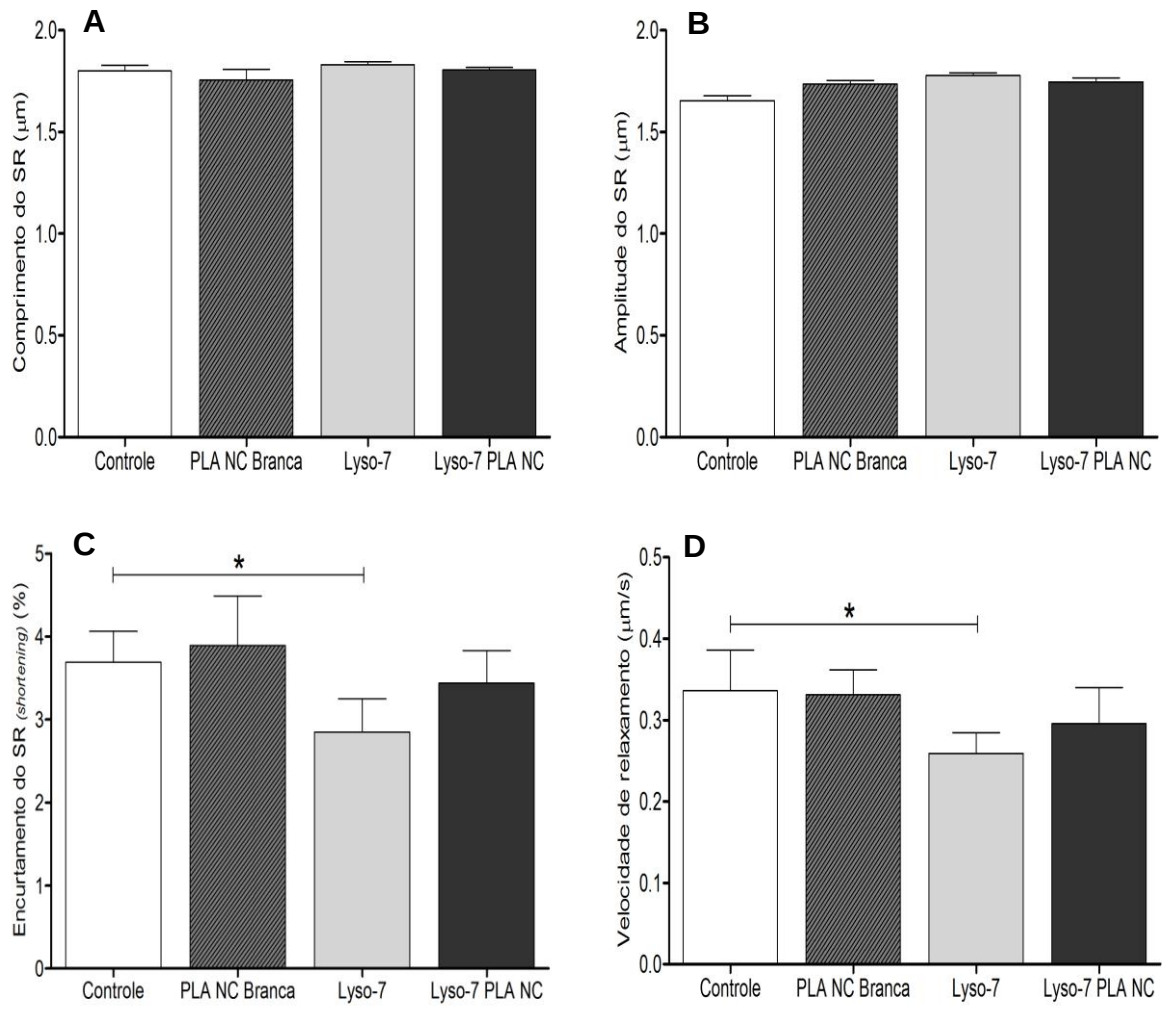

Figura 22: *Efeito da Lyso-7 no comprimento do sarcômero (SR) (A), na amplitude (B), no encurtamento do SR (C) e na velocidade de relaxamento (D), avaliado como a porcentagem da linha de base após administração de 1,6 mg/Kg/dia durante 7 dias.*

De forma semelhante aos efeitos observados *in vitro, a* Lyso-7 não apresentou efeito na amplitude do transiente de Ca^{2+} (figura 23A). Porém, o tempo de decaimento do transiente de Ca^{2+} (TAU) foi acelerado para a Lyso-7 livre (figura 23B). Além disso, a Lyso-7 livre reduziu os níveis de Ca^{2+} diastólico quando comparado ao grupo controle. Estes parâmetros não apresentaram alteração quando a Lyso-7 foi administrada em NC PLA e para as NC PLA brancas (figura 24). O influxo de Ca^{2+} desencadeia uma alta liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, ativando assim outras correntes iônicas que contribuem para a contratilidade dos cardiomiócitos (Huser e cols., 2000). A quantidade de Ca^{2+} liberada pelo retículo sarcoplasmático depende não somente do influxo inicial, mas também da quantidade de Ca^{2+} armazenada no retículo e da $[Ca^{2+}]_i$ (Diaz e cols, 2005). Esses níveis de Ca^{2+} são controlados, na sua maioria, pelo balanço entre a

captação de Ca^{2+}, via SERCA2a, e a liberação pelos receptores RyR2. Assim, outros experimentos estão sendo realizados para melhor delinear os mecanismos responsáveis pelas alterações encontradas (alteração na expressão de proteínas reguladores de Ca^{2+} e estudo eletrofisiológico).

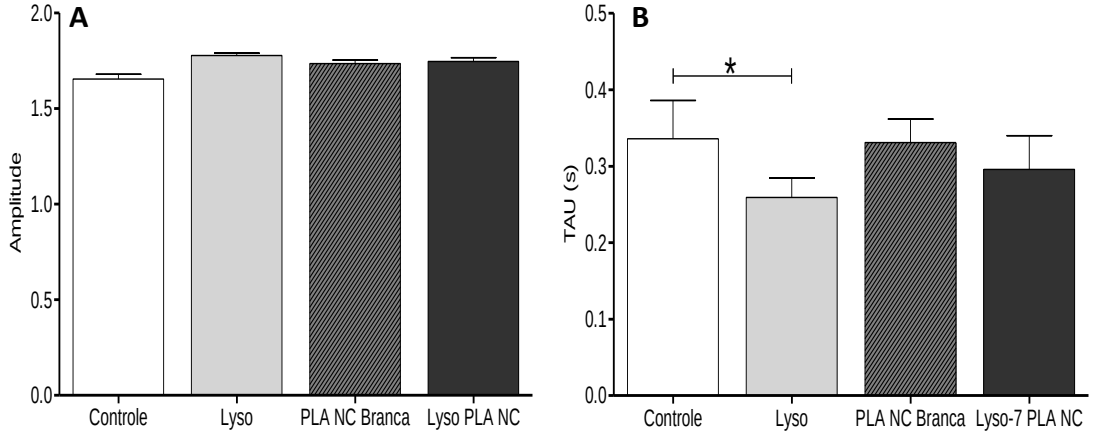

Figura 23: *Efeito da Lyso-7 na amplitude do transiente de Ca^{2+} (A) e na cinética de recaptação (B) em cardiomiócitos ventriculares após administração de 1,6 mg/Kg/dia durante 7 dias.*

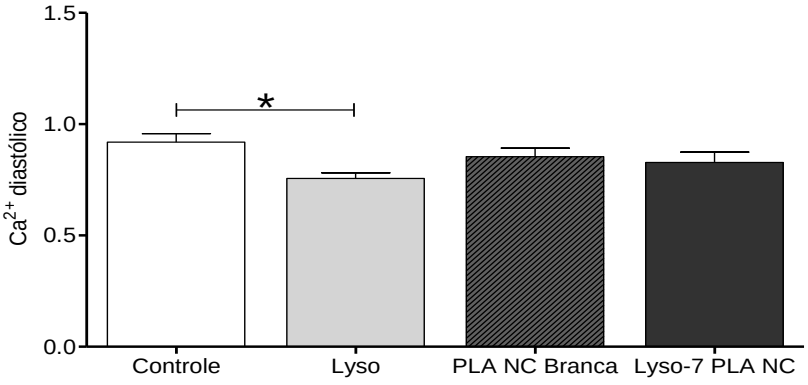

Figura 24: *Efeito crônico da Lyso-7 no Ca^{2+} diastólico de cardiomiócitos ventriculares (dose 1,6 mg/Kg/dia por 7 dias).*

Com relação à segurança, a Lyso-7, quando administrada associada com as NC PLA durante 7 dias, não apresentou alterações que indicassem cardiotoxicidade (avaliada nas condições experimentais descritas em cardiomiócitos), ao passo que sua administração em solução levou a efeitos significativos. Ainda, a administração da Lyso-7 nanoencapsulada aumenta a sua ASC plasmática em 14 vezes, além de aumentar a concentração no coração 3,5 vezes, conforme o estudo de farmacocinética e biodistribuição discutido no capítulo II, que poderia eventualmente

ocasionar efeitos indesejáveis. Contudo, os resultados deste estudo indicaram que a nanoencapsulação da Lyso-7 foi capaz de reduzir os efeitos tóxicos da substância livre e de reduzir qualquer alteração nos parâmetros normais. Dessa forma, a associação da Lyso-7 em NC PLA é promissora e pode ser uma opção terapêutica para reduzir os eventuais efeitos pró-arrítmicos ventriculares dependentes de Ca^{2+}.

Além disso, Lee e colaboradores (2013b) observaram que ratos diabéticos com e sem hipertensão apresentam um prolongamento significativo no tempo de decaimento de Ca^{2+}_{i}, que é revertido após o tratamento com rosiglitazona. Assim, foi evidenciado que o tratamento com rosiglitazona altera a regulação dos níveis de Ca^{2+} cardíaco em ratos diabéticos com ou sem hipertensão. Não há dados na literatura referente aos efeitos da Lyso-7 associados a alterações cardíacas e os resultados aqui relatados são importantes na avaliação toxicológica desta nova TZD.

DISCUSSÃO GERAL

4. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo trata da Lyso-7, uma nova substância da classe das TZD, sintetizada para conter na mesma molécula propriedades farmacológicas da classe das TZD e dos anti-inflamatórios, e da associação dessa molécula com NC poliméricas, sua caracterização físico-química e também a avaliação biológica dos efeitos da nanoencapsulação *in vivo*. O uso de sistemas nanodispersos se justifica pelo fato da Lyso-7 ser altamente lipofílica e assim, ter uma biodisponibilidade oral reduzida. Além disso, as TZD já conhecidas, embora apresentem efeitos benéficos no tratamento do diabetes, possuem indicação clínica limitada devido à ocorrência de efeitos adversos graves, sendo que algumas delas foram retiradas do mercado.

Por outro lado, as nanocápsulas foram escolhidas por serem capazes de encapsular uma quantidade maior de moléculas de Lyso-7 devido à presença de um núcleo oleoso na sua estrutura que pode acomodar melhor fármacos lipofílicos. Em estudos anteriores, a Lyso-7 apresentou boa solubilidade nos triglicerídeo de cadeia média (Miglyol), sendo este o óleo utilizado no preparo das formulações (Garcia, 2011). Os polímeros utilizados são derivados do PLA, polímero biodegradável (eliminado via ciclo do ácido cítrico), pouco tóxico e de uso aprovado pelo FDA. Também foram utilizados os copolímeros anfifílicos em blocos, do tipo PLA-PEG, dibloco, com e sem funcionalização na cadeia hidrofóbica do PLA. Esta funcionalização consistiu da inserção randômica de monômeros epóxidos durante a polimerização, que inseriram grupamentos benzil (BZO-PLA-PEG), que após hidrogenação catalítica (Pd/C) para desproteção resultaram em grupos hidroxila (HO-PLA-PEG) ao longo do bloco de PLA (figura 3).

As NC foram preparadas com esses polímeros e alguns efeitos da modificação das cadeias de PLA foram observados sobre o potencial zeta, e o diâmetro médio das NC. As inserções dos grupos hidroxil e benzil aumentaram o tamanho médio das NC em relação às NC de PLA-PEG não funcionalizadas, sugerindo uma organização diferenciada desses polímeros na parede das NC. A adição da Lyso-7 nas NC aumentou o tamanho das mesmas, indicando um possível aumento do volume interno das NC para acomodação da substância. Além disso, todas as NC encapsularam eficientemente a Lyso-5 na concentração de 0,5 mg/mL,

com rendimento médio de 85% e eficiência próximo a 100%. As análises por MFA e MEV das NC indicaram a presença de estruturas arredondadas, homogêneas e deformáveis.

Para avaliar a influência das características físico-químicas das NC no comportamento das mesmas após administração *in vivo,* foram realizados os estudos de farmacocinética e biodistribuição usando um método bioanalítico desenvolvido e validado neste estudo, por esta ser uma substância inédita e não ter dados na literatura sobre seu doseamento. Para a realização da farmacocinética, foi injetada uma dose única *i.v.* da Lyso-7 (1,6 mg/Kg) livre e associada à NC PLA, NC PLA-PEG, NC HO-PLA-PEG e NC BZO-PLA-PEG. Os parâmetros foram obtidos com base do modelo não-compartimental de administração intravenosa em *bolus*. Não foi possível quantificar a Lyso-7 livre após 60 min da sua administração, ao passo que a Lyso-7 encapsulada foi quantificada até 6 horas. De modo semelhante ao descrito por outros autores, as NC PLA-PEG foram capazes de prolongar a permanência plasmática da Lyso-7, com valor de área sobre a curva (ASC) (concentração × tempo) 35 vezes maior que a ASC da Lyso-7 livre. A ASC da Lyso-7 associada aos copolímeros funcionalizados foi praticamente a mesma da ASC encontrada para NC PLA, aproximadamente 14 vezes maior que a Lyso-7 livre. A K_e da Lyso-7 NC HO-PLA-PEG foi 5 vezes menor e o $t_{1/2}$ foi 4 vezes maior quando comparado com a NC PLA-PEG não funcionalizado. Possivelmente, a introdução de grupos hidroxil no bloco de PLA aumentou a interação com a Lyso-7, mantendo-a por mais tempo associada às NC no sangue. Estes resultados evidenciam que a composição e as características de superfície das NC influenciam diretamente no seu comportamento *in vivo,* sendo possível desenvolver polímeros funcionalizados destinados a reter mais ou menos um fármaco para um refinamento maior do tempo de liberação no organismo.

As NC aumentaram significativamente a exposição tecidual da Lyso-7 quando comparada a sua forma livre, sendo que os valores de ASC tecidual foram maiores para as NC PLA-PEG em todos os órgãos. As partículas preparadas com o homopolímero PLA são rapidamente reconhecidas pelas células do SFM, são removidas do plasma mais rapidamente e se acumulam nos órgãos deste sistema. Contudo, este mesmo efeito foi observado para as NC PLA-PEG, que se

acumularam no fígado e no baço, contrariamente ao observado por outros autores. Diversos fatores influenciam na capacidade das partículas peguiladas em retardar a evasão da captação pelo SFM, principalmente o tamanho e a densidade das cadeias de PEG na superfície dos nanocarreadores. Dados da literatura indicam que quanto maior for a cadeia do PEG e quanto mais efetiva for sua capacidade de recobrir a partícula (maior densidade), menor será a adesão de proteínas plasmáticas e, consequentemente, maior será a permanência dessas partículas na circulação. Neste trabalho foram utilizados copolímeros PLA-PEG com PEG de baixo peso molecular (2 kDa) e também em baixa densidade, o que justifica o acúmulo dessas NC nos órgãos do SFM. Além disso, altos valores de ASC da Lyso-7 foram encontrados no coração. Conforme já relatado, as TZD possuem efeitos cardioprotetores em pacientes com diabetes do tipo 2, em decorrência de suas ações como agonistas sintéticos dos receptores PPAR-γ. Assim, a Lyso-7, que teve sua ação como agonista PPAR-γ recentemente relatada, pode ter efeito cardioprotetor promissor e, ainda, este efeito pode ser incrementado por sua administração em NC, que aumentam a concentração da Lyso-7 no coração.

A administração crônica de TZD está associada à exacerbação e à indução de IC em pacientes diabéticos e sendo a Lyso-7 uma substância inédita, faz-se necessária a avaliação da sua segurança terapêutica. Para tal, foram realizados os testes de toxicidade aguda *in vivo*, conforme preconizado pelas agências regulamentadoras, e possíveis alterações na fisiologia e funcionamento de cardiomiócitos *in vitro* e *in vivo.* O teste de toxicidade aguda avaliou as alterações hematológicas, hepáticas e renais 14 dias após a administração *i.v.* de uma dose única de Lyso-7 (1,6 mg/Kg) livre e associada a NC PLA e NC PLA-PEG. Não foram encontradas alterações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados tanto para a Lyso-7 livre, quanto nanoencapsulada. A cardiotoxicidade *in vitro* da Lyso-7 foi avaliada pelas alterações dos níveis de cálcio em cardiomiócitos ventriculares recém-isolados após incubação com Lyso-7 nas concentrações de 4,5, 45 e 450 µM. A Lyso-7, na concentração de 450 µM, aumentou o índice de contração dos cardiomiócitos, a velocidade de decaimento do transiente de Ca^{2+} e os *sparks* de cálcio, que estão correlacionados à abertura dos canais RyR2. Além disso, foi observada uma redução significativa dos níveis de Ca^{2+} diastólico, que indicam um maior sequestro de Ca^{2+}_{i}. Todas essas alterações indicam uma ação pró-

arritmogênica da Lyso-7. Os efeitos cardiovasculares da administração crônica de Lyso-7 livre e em NC PLA foram também avaliados pela administração de 1,6 mg/Kg/dia de Lyso-7, durante 7. Corroborando com os resultados *in vitro,* a Lyso-7 livre aumentou o índice de contração dos cardiomiócitos, a velocidade de decaimento de cálcio e os níveis de Ca^{2+} diastólico, ao passo que a mesma dose de Lyso-7 em NC PLA não apresentou nenhuma alteração desses parâmetros, mesmo a Lyso-7 nanoencapsulada permanecendo por mais tempo na circulação sanguínea (ASC 14 maior quando comparada com a Lyso-7 livre), como evidenciado pelo estudo de farmacocinética. Estes resultados indicam que a Lyso-7 altera a regulação dos níveis de cálcio cardíacos, podendo induzir alteração do funcionamento do coração. Ainda, a associação da Lyso-7 em NC é muito promissora, uma vez que as NC foram capazes de reduzir os efeitos cardiotóxicos da Lyso-7 nos parâmetros avaliados. Contudo, análises mais detalhadas são ainda necessárias para um delineamento específico sobre os mecanismos de atuação da Lyso-7 nos receptores e/ou canais iônicos cardíacos.

5. CONCLUSÃO

As NC poliméricas preparadas com derivados do PLA encapsularam eficientemente a Lyso-7, produzindo partículas monodispersas e estáveis. As diferenças nas estruturas químicas desses polímeros alteram o tempo de permanência sanguínea Lyso-7 nanoencapsulada, aumentando a sua exposição e captação tecidual. Ainda, as NC contendo Lyso-7 mostraram-se seguras para uma administração parental, não induziram alteração nos parâmetros hematológicos, hepáticos e renais, além de inibirem os efeitos cardiotóxicos da Lyso-7 *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS

AHMAD S.R., SINGER S.J. & LEISSA B.G. (2001) Congestive heart failure associated with itraconazole. *Lancet*. 357, 1766-7.

AHMED F., PAKUNLU R.I., BRANNAN A., BATES F., MINKO T. & DISCHER D.E. (2006) Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *J. Control. Release*. 116, 150-158.

ALEXIS F., PRIDGEN E., MOLNAR L.K. & FAROKHZAD O.C. (2008) Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharmaceut*. 5(4), 505–515.

AMIN L., JOO J.Y., YI D.K. & AN S.S.A. (2015) Surface modification and local orientations of surface molecules in nanotherapeutics. *J Control Release.* 207, 131-142.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2013) Guia para a Condução de Estudos Não clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. 1–48.

ASNA N., LEWY H., ASHKENAZI I.E., DEUTSCH V., PERETZ H., INBAR M. & RON I.G. (2005) Time dependent protection of amifostine from renal and hematopoietic cisplatin induced toxicity. *Life Sci*. 76(16), 1825–1834.

ATTILI-QADRI S., KARRA N., NEMIROVSKI A., SCHWOB O., TALMON Y., NASSAR T. & BENITA, S. (2013) Oral delivery system prolongs blood circulation of docetaxel nanocapsules via lymphatic absorption. *PNAS*. 110, 17498-17503.

AZOULAY L., YIN H., FILION K.B., ASSAYAG J., MAJDAN A., POLLAK M.N. & SUISSA S. (2012) The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: nested case-control study. *British Medical Journal*. 344, 1-11.

BARROSO I., GURNELL M., CROWLEY V.E., AGOSTINI M., SCHWABE J.W., SOOS M.A., MASLEN G.L., WILLIAMS T.D., LEWIS H., SCHAFER A.J. & COLS. (1999) Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature*, 402, 880–883.

BELETSI A., PANAGI Z. & AVGOUSTAKIS K. (2005) Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers. *Int J Pharm*. 298(1), 233-41.

BERS D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 415, 198-205.

BERS D.M. (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Physiol*. 70, 23-49.

BILENSOY E.M., SEN M. & HINCAL A.A. (2006) Effect of drug physicochemical properties on *in vitro* characteristics of amphiphilic cyclodextrin nanospheres and nanocapsules. *J. Microencapsul*. 23, 59–68.

BRANQUINHO R.T. (2014) Farmacocinética e eficácia terapêutica de lactona sesquiterpênica nanoestruturada na doença de Chagas experimental em modelo Murino. Tese de doutorado, UFOP.

BRANQUINHO R.T., MOSQUEIRA V.C.F., KANO E.K., SOUZA J., DORIM D.D.R., SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. & LANA M. (2014) HPLC–DAD and UV–Spectrophotometry for the Determination of Lychnopholide in Nanocapsule Dosage Form: Validation and Application to Release Kinetic Study. *J. Chromatogr. Sci*. 52(1), 19-26.

BRAY M.A., GEISSE N.A. & PARKER K.K. (2007). Multidimensional Detection and Analysis of Ca2+ Sparks in Cardiac Myocytes. *Biophys. J*. 92, 4433–4443.

BRENDER E.A., ADORNE M.D., COLOMÉ L.M., ABDALLA D.S.P., GUTERRES S.S. & POHLMANN A.R. (2012) Hemocompatibility of poly(ε-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *Int. J. Pharm*. 426, 271-279.

CÉSAR, F.A., RUDNICKI, M., DE LAS HERAS, B., BOSCÁ, L., LIMA, M.C.A., PITTA, I.R. & ABDALLA, D.S.P. (2015) New indole-thiazolidine attenuates atherosclerosis in LDLr−/− mice. *Vascul. Pharmacol*. *in press* [doi:10.1016/j.vph.2015.03.009].

CHAWLA A., SCHWARZ E.J., DIMACULANGAN D.D. & LAZAR, M.A. (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 135, 798–800.

CHENG A.Y., FANTUS G. (2004) Thiazolidinedione induced congestive heart failure. *Ann. Pharmacother.* 38, 817-20.

CHENG C.C., PAN N.H., CHEN Y.C., YEH H.I., LIN C.I., CHEN S.A. & CHEN Y.J. (2010). Atherosclerosis modulates the electrophysiological effects of a

peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator on pulmonary veins. *Int. J. Cardiol*. 145(3), 578-82.

CHINETTI G.; FRUCHART J.C. & STAELS B. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflammation Research*. 49, 497-505.

COLLIN, M. & THIEMERMANN, C. (2003) The PPAR-γ ligand 15-deoxy(δ12,14) prostaglandin J2 reduces the liver injury in endotoxic shock. *Eur. J. Pharmacol*. 29, 257–258.

CONSOLI A. & FORMOSO G. (2013) Do thiazolidinediones still have a role in treatment of type 2 diabetes mellitus? *Diabetes Obes. Metab*. 11, 967-77.

DE GENNES P.G. (1987) Polymers at an interface; a simplified view. *Adv. Colloid. Interface Sci*. 27, 189–209.

DELEA T.E., EDELSBERG J.S., HAGIWARA M., OSTER G. & PHILLIPS L.S. (2003) Use of thiazolidinediones and risk of heart failure in people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 26, 2983-9.

DELERIVE P., MARTIN-NIZARD F., CHINETTI G., TROTTEIN F., FRUCHART J.C., NAJIB J., DURIEZ P. & STAELS, B. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signalling pathway. *Circ. Res*. 85, 394–402.

DESVERGNE B. & WAHLI W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Rev.* 20, 649-688.

DIAMANT M. & HEINE R.J. (2003) Thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus: current clinical evidence. *Drugs*. 63, 1373-405.

DIAZ M.E., GRAHAM H.K., O'NEILL S.C., TRAFFORD A.W. & EISNER D.A. (2005) The control of sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac muscle. *Cell Calcium*. 38, 391–6.

DREYER C., KREY G., KELLER H., GIVEL F., HELFTENBEIN G. & WAHLI W. (1993) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 68, 879–87.

DOBROVOLSKAIA M.A., AGGARWAL P., HALL J.B. & MCNEIL S.E. (2008) Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol. Pharm*. 5(4), 487-95.

EMA, EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Non-clinical Toxicology. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000397.jsp&mid=WC0b01ac058002956f, 2012].

EMA, EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Questions and answers on the review of pioglitazone-containing medicines (Actos, Glustin, Competact, Glubrava and Tandemact). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicine_QA/2011/07/WC500109179.pdf, 2011.

ESSA, S., RABANEL, J.M., HILDGEN, P. (2010) Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D-L-lactide) (PLA) based nanoparticles. *E. J. Pharm. Bioph.* 75(2), 96-106.

FESSI H., PUISIEUX F., DEVISSAGUET J.P., AMMOURY N. & BENITA S. (1989) Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int. J. Pharm.* 55, R1-R4.

FINNE, A.-C.A. (2004) New functionalized polyesters to achieve controlled architectures. Journal of Polymer Science Part A: *Polymer Chemistry*. 42, 444-452.

GAD S.C. (2008) Preclinical Development Handbook: Toxicology. North Carolina: John Wiley & Sons, Inc., 1ª edição.

GARCIA, G.M. (2011) Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para direcionamento de fármacos: Estudo físico-químico e aplicações no encapsulamento de fármacos anti-Trypanosoma cruzi e anti-aterogênico. Dissertação de Mestrado. UFOP. 1-160.

GHAZZI M.N., PEREZ J.E., ANTONUCCI T.K., DRISCOLL J.H., HUANG S.M., FAJA B.W. E COLS. (1997) Cardiac and glycemic benefits of troglitazone treatment in NIDDM. The Troglitazone Study Group. *Diabetes.* 46, 433-9.

GÓES A.J.S., LIMA W.T., NAGY H.J., ALVES A.J., FARIA A.R., LIMA J.G. & MAIA M.B.S. (2004) Síntese e atividade antiedematogênica de derivados N-triptofil-5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona e N-triptofil-5-benzilideno-rodanina. *Quim. Nova.* 27(6), 905-910.

GOMEZ A.M., VALDIVIA H.H., CHENG H., LEDERER M.R., SANTANA L.F., CANNELL M.B., MCCUNE S.A., ALTSCHULD R.A. & LEDERER W.J. (1997) Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*. 276(5313), 800-6.

GRAHAM T.L., MOOKHERJEE C., SUCKLING K.E., PALMER C.N. & PATEL L. (2005) The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *Atherosclerosis.* 181(1), 29-37.

GRAHAM D.J., OUELLET-HELLSTROM R., MACURDY T.E., ALI F., SHOLLEY C., WORRALL C., KELMAN J.A. (2010) Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone. *JAMA*. 304, 411-18.

GREF R., MINAMITAKE Y., PERACCHIA M.T., TRUBETSKOY V., TORCHILIN V. & LANGER R. (1994) Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*. 18, 1600-3.

GREF R., DOMB A., QUELLEC P., BLUNK T., MÜLLER R. H., VERBAVATZ J. M. & LANGER, R. (1995) The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliver. Rev*. 16, 215-233.

GREF R., LÜCK M., QUELLEC P., MARCHAND M., DELLACHERIE E., HARNISCH S., BLUNK T. & MÜLLER R. H. (2000) 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B*: 18, 301-313.

HALABI C.M., BEYER A.M., LANGE W.J., KEEN H.L., BAUMBACH G.L., FARACI F.M. & SIGMUND C.D. (2008) Interference with PPAR-γ Function in Smooth Muscle Causes Vascular Dysfunction and Hypertension. *Cell. Metabolism.* .7, 215–226.

HASSELLÖV M., READMAN J.W., RANVILLE J.F. & TIEDE, K. (2008) Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*. 17, 344-61.

HE C., HUA Y., YIN L., TANG C. & YIN, C. (2010) Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 31, 3657–3666.

HEGELE R.A., CAO H., FRANKOWSKI C., MATHEWS S.T. & LEFF T. (2002) PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*. 51, 3586–3590.

HUSER J., BLATTER L.A., LIPSIUS S.L. (2000). Intracellular Ca2+ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J. Physiol*. 524, 415–22.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE (1994) International Conference on Harmonisation. Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S3A/Step4/S3A_Guideline.pdf.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE (2005) International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q29(R1), ICH Steering Committee, Geneva, Switzerland, p.1–13.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE (2012) International Conference on Harmonisation, Safety Guidelines, disponível em http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety- guidelines.html.

JEON S.I., LEE J.H., ANDRADE J.D. & DE GENNES P.G. (1991) Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory. *J. Colloid Interface Sci*. 142, 149–158.

JONES T.W, MCCARTHY G., TAMBORLANE W.V., CAPRIO S., ROESSLER E., KRAEMER D., STARICK-ZYCH K., ALLISON T., BOULWARE S.D. & SHERWIN R.S. (1990) Mild hypoglycemia and impairment of brain stem and cortical evoked potentials in healthy subjects. *Diabetes*. 39, 1550-1555.

KAKIZAWA Y. & KATAOKA K. (2002) Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv. Drug Deliver. Rev*. 54, 203-222.

KLANG V. & MATSKO N. (2014) Electron Microscopy of Pharmaceutical Systems. *Advances in Imaging and Electron Physics.* 181, 126-196.

LEE T.I., KAO Y.H., CHEN Y.C. & CHEN Y.J. (2009) Proinflammatory cytokine and ligands modulate cardiac peroxisome proliferator-activated receptors. *Eur. J. Clin. Invest*. 39, 23–30.

LEE T.-I., KAO Y.-H., CHEN Y.-C., HUANG J.-H., HSIAO F.C. & CHEN Y.-J. (2013a) Peroxisome proliferator-activated receptors modulate cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes research and clinical practice*. 100, 330–339.

LEE T.-I., CHEN Y.-C, KAO Y.-H., HSIAO LIN Y-K., J.-H. & CHEN Y.-J. (2013b) Rosiglitazone induces arrhythmogenesis in diabetic hypertensive rats with calcium handling alteration. *International Journal of Cardiology*. 165, 299–307.

LEGRAND P., BARRATT G., MOSQUEIRA V.CF, FESSI H. & DEVISSAGUET J-P. (1999) Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. *Pharma. Sci.* 9, 411-418.

LEHRKE M., & LAZAR M.A. (2005) The many faces of PPARgamma. *Cell*. 123, 993–999.

LEITE E.A., GRABE-GUIMARÃES A., GUIMARÃES H.N., MACHADO-COELHO L.L., BARRATT G. & MOSQUEIRA, V.C.F. (2007) Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. *Life Sci*. 80, 1327-1334.

LEITE E.A., GIUBERTI CDOS S., WAINSTEIN A.J., WAINSTEIN A.P., COELHO L.G., LANA A.M., SAVASSI-ROCHA P.R. & DE OLIVEIRA M.C. (2009) Acute toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin in mice after intraperitoneal administration. *Life Sci*. 84(19-20), 641-9.

LEWIS J.D., FERRARA A., PENG T., HEDDERSON M., BILKER W.B., QUESENBERRY C.P.JR. E COLS. (2011) Risk of Bladder Cancer Among Diabetic Patients Treated With Pioglitazone Interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*. 34, 916-922.

LI A. C., BINDER C.J., GUTIERREZ A., BROWN K.K., PLOTKIN C.R. E COLS. (2004) Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARα, β/δ, and γ. *J. Clin. Invest.* 114, 1564–1576.

LI S. & PALMER A.F. (2004) Structure of small actin-containing liposomes probed by atomic force microscopy: effect of actin concentration & liposome size. *Langmuir*. 20(19), 7917-25.

LINCOFF A.M., WOLSKI K., NICHOLLS S.J. & NISSEN S.E. (2007) Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA.* 298, 1180-8.

LINDNER M., BRANDT M.C., SAUER H., HESCHELER J., BOHLE T. & BEUCKELMANN D.J. (2002) Calcium sparks in human ventricular cardiomyocytes from patients with terminal heart failure. *Cell Calcium*. 31(4), 175-82.

LIPINSKI C.A., LOMBARDO F., DOMINY B.W. & FEENEY P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 46(1-3), 3-26.

LOUGHREY C.M., MACEACHERN K.E., NEARY P. & SMITH G.L. (2002) The relationship between intracellular [Ca(2+)] and Ca(2+) wave characteristics in permeabilised cardiomyocytes from the rabbit. *J. Physiol*. 543(Pt 3), 859-70.

MAKINO K., OHSHIMA H., KONDO, T. (2002) Mechanism of hydrolytic degradation of poly(lactide) microcapsules: effects of pH, ionic strength and buffer concentration. *Photobiol*. 76(2), 208-16.

MANDARD S., MÜLLER M. & KERSTEN S. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 61(4), 393-416.

EMANUELE M. & BALASUBRAMANIAM B. (2014) Differential effects of commercial-grade and purified poloxamer 188 on renal function. *Drugs R. D*. 14(2), 73-83.

MAXWELL C.B. & JENKINS A.T. (2011) Drug-induced heart failure. *Am. J. Healthy-Syst. Pharm.* 68, 1791-04.

MOGHIMI S.M., HUNTER A.C. & ANDRESEN T.L. (2012) Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 52, 481–503.

MOGHIMI S.M., HUNTER A.C., DADSWELL C.M., SAVAY S., ALVING C.R., SZEBENI J. (2004) Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F65, FlocorTM)-induced complement activation in human sera. A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels, *Biochim. Biophys. Acta.* 1689, 103-113.

MOHANRAJ V.J. & CHEN Y. (2006) Nanoparticles – A Review. *Trop. J. Pharm. Res*. 5, 561-573.

MORA-HUERTAS C.E., FESSI H. & A. ELAISSARI. (2011) Influence of process and formulationparameters on the formation of submicron particles by solvent displacementand emulsification–diffusion methods: critical comparison. *Adv. Colloids Inter. Sci*. 163, 90–122.

MOSQUEIRA V.C.F., LEGRAND P., ALPHANDARY H.P., PUISIEUX F. & BARRATT G. (2000) Poly (D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci*, 89, 614-26.

MOSQUEIRA V.C.F., LEGRAND P., GULIK A., BOURDON O., GREF R., LABARRE D. & BARRATT, G. (2001a) Relationship Between Complement Activation, Cellular Uptake and Surface Physicochemical Aspects of Novel PEG-Modified Nanocapsules. *Biomaterials*. 22, 2967-2979.

MOSQUEIRA V.C.F., LEGRAND P., MORGAT J.L., VERT M., MYSIAKINE E., GREF R., DEVISSAGUET J.P. & BARRATT, G. (2001b) Biodistribution of long-

circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. *Pharm. Res.* 18, 1411–1419.

MOSQUEIRA V.C.F., LOISEAU P.M., BORIES C., LEGRAND P., DEVISSAGUET J.-P. & BARRATT, G. (2004) Efficacy and Pharmacokinetics of Intravenous Nanocapsule Formulations of Halofantrine in Plasmodium berghei-Infected Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1222-1228.

MOSQUEIRA V.C.F., LEGRAND P. & BARRATT G. (2006) Surface-modified and conventional nanocapsules as novel formulations for parenteral delivery of halofantrine. *J. Nanosci. Nanotechnol*. 6(9-10), 3193-202.

MOSQUEIRA V.C.F.; RABANEL J-M. & HILDGEN Patrice (2009) One Step Reaction for Functionalized Biodegradable Block Copolymers Towards Surface Engineering and Targeted Stealth Nanocarriers. In: 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2009, Copenhagen. *Proceedings of 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society*. 36, 417-418.

MURTHY N.S. & SRINIVASA V. (2003) Screening of new synthetic thiazolidne-4-ones for anti-inflammatory activity in albino rats. *Indian J. Pharmacol.* 35, 61-62.

NAGAHAMA R., MATOBA T., NAKANO K., KIM-MITSUYAMA S., SUNAGAWA K. & EGASHIRA K. (2012) Nanoparticle-Mediated Delivery of Pioglitazone Enhances Therapeutic Neovascularization in a Murine Model of Hindlimb Ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 32, 2427-34.

NISSEN S.E. & WOLSKI K. (2007) Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N. Engl. J. Med.* 356, 2457-71.

OLIVEIRA L.T., GARCIA G.M., KANO E.K., TEDESCO A.C. & MOSQUEIRA V.C.F. HPLC-FLD methods to quantify chloroaluminum phthalocyanine in nanoparticles, plasma and tissue: application in pharmacokinetic and biodistribution studies. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 56, 70-77.

PERACCHIA M.T., GREF R., MINAMITAKE Y., DOMB A., LOTAN N. & LANGER R. (1997) PEG coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics. *J. Control. Release*. 46, 223-231.

PEREIRA M.A., MOSQUEIRA V.C.F, CARMO V.A., FERRARI C.S., REIS E.C., RAMALDES G.A. & CARDOSO V.N. (2009) Biodistribution study and

identification of inflammatory sites using nanocapsules labeled with (99m)Tc-HMPAO. *Nucl. Med. Commun*. 30, 749-55.

PETERS J.M., LEE S.S., LI W., WARD J.M., GAVRILOVA O., EVERETT C., REITMAN M.L., HUDSON L.D. & GONZALEZ, F.J. (2000) Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor β. *Mol. Cell Biol.* 20, 5119–5128.

QIU L.Y. & BAE Y.H. (2006) Polymer architecture and drug delivery. *Pharm. Res.* 23, 1-30.

RABANEL J.M., FAIVRE J., TEHRANI S.F., LALLOZ A., HILDGEN P. & BANQUY X. (2015) Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7(19), 10374-85.

RAO J.P. & GECKELER K.E. (2011) Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci*. 36, 887–913.

ROBINSON S., CHAPMAN K., HUDSON S., SPARROW S. E COLS. (2009) Guidance on dose level selection for regulatory general toxicology studies for pharmaceuticals. *The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*. 1–36.

ROSEN E.D., SARRAF P., TROY A.E., BRADWIN G., MOORE K., MILSTONE D.S., SPIEGELMAN B.M. & MORTENSEN R.M. (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell.* 4, 611–617.

ROSENSON R.S., WRIGHT R.S., FARKOUH M. & PLUTZKY J. (2012) Modulating peroxisome proliferator-activated receptors for therapeutic benefit? Biology, clinical experience, and future prospects. *Am. Heart J.* 164, 672-680.

RUSSEL P. & BATCHELOR D. (2010) SEM and AFM: complementary techniques for high resolution surface investigations. *Analitical instrumentation facilities*. 1-12.

SANT S., POULIN S. & HILDGEN P. Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of pegylated nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 87(4), 885-95.

SANTOS L.C., UCHÕA F.T., CANAS A.R.P.A., SOUSA I.A., MOURA R.O., LIMA M.C.A., GALDINO S.L., PITTA I.R. & BARBE J. (2005) Synthesis and anti-

inflammatory activity of new thiazolidine-2, 4-diones, 4-thioxothiazolidinones and 2-thioxoimidazolidinones. *Heterocyclic Communications*. 11(2), 121–128.

SANTIN J.R., UCHÔA F.D., LIMA M.C., RABELLO M.M., MACHADO I.D., HERNANDES M.Z., AMATO A.A., MILTON F.A., WEBB P., NEVES F.A., GALDINO S.L., PITTA I.R, FARSKY S.H.P. (2013a) Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48, 689-697.

SANTIN J.R., MACHADO I.D, RODRIGUES S.F.P., TEIXEIRA S., MUSCARÁ M.N., GALDINO S.L., PITTA I.R. & FARSKY S.H.P. (2013b) Role of an índole-thiazolidine molecule PPAR pan-agonist and COX inhibitor on inflammation and microcirculatory damage in acute gastric lesions. *Plos One*. 8, e76894.

SAVAGE D.B., TAN G.D., ACERINI C.L., JEBB S.A., AGOSTINI M., GURNELL M., WILLIAMS R.L., UMPLEBY A.M., THOMAS E.L., BELL J.D. E COLS. (2003) Human Metabolic Syndrome Resulting From Dominant-Negative Mutations in the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-{gamma}. *Diabetes*. 52, 910–917.

SINGH S., LOKE Y.K. & FURBERG C.D. (2007) Thiazolidinediones and Heart Failure: A Teleo-Analysis. *Diabetes Care*. 29, 1-14.

SINGH R., SINGH S. & LILLARD J.W. (2008) Past, present, and future technologies for oral delivery of therapeutic proteins. *J. Pharm. Sci*. 97, 2497-2523.

SINHA V.R., BANSAL K., KAUSHIK R., KUMRIA R. & TREHAN A. (2004) Poly-[epsilon]-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*. 278, 1-23.

STAELS B., KOENIG W., HABIB A., MERVAL R., LEBRET M., TORRA I.P., DELERIVE P., FADEL A., CHINETTI G. E COLS. (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARα but not by PPARγ activators. *Nature*. 393, 790–793.

STEGEMANN S., LEVEILLER F., FRANCHI D., DE JONG H. & LIND´ENE H. (2007) When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. *Eur. J. Pharm. Sci*. 31, 249–261.

STIENSTRA R., DUVAL C., MÜLLER M. & KERSTEN S. (2007) PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res*. .2007, 1-10.

TAKANO H., NAGAI T., ASAKAWA M., TOYOZAKI T., OKA T. & KOMURO I. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit

lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 87, 596–602.

TAVARES V., HIRATA M. H. & HIRATA R. D. C. (2007) Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPARγ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. 51, 526-533.

TORCHILIN V.P. & TRUBETSKOY V.S. (1995) Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? *Adv. Drug Delivery Rev.* 16, 141–155.

UCHÔA F.T., DA SILVA T.G., DE LIMA M.C.A., GALDINO S.L., PITTA I.R. & DALLA COSTA T. (2009) Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: an anti-inflammatory candidate. J. Pharm. Pharmacol. 61, 339-345.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2001) Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. *Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville.*

VERT M. (2015) Lactic acid-based degradable polymers. RAPRA handbook of degradable polymers. 2ª Edição, 301-320.

VIDAL A. (2014) Nanocápsulas de arteméter: caracterização físico-química, cardiotoxicidade, neurotoxicidade e eficácia na malária experimental. Tese de doutorado, UFOP.

WILDING J.P.H. (2012) PPAR agonists for the treatment of cardiovascular disease in patients with diabetes. *Diabetes Obes. Metab*. 14(11), 973-82.

YKI-JARVINEN H. (2004) Drug Therapy-Thiazolidinediones. *N. Engl. J. Med*. 351, 1106–1118.

YOO J.W. & MITRAGOTRI S. (2010) Polymer particles that switch shape in response to a stimulus. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 107, 11205–11210.

YUMEI Y., YU L., SARASWATHY M., BRIAN C.T. & YOCHAI B. (2008) Pioglitazone protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury in eNOS and iNOS knockout mice. *Am. J. Physiol.: Heart. Circ. Physiol.* 295, 2436–2446.

ZAMPIERI A.L, FERREIRA F.S., RESENDE E.C., GAETI M.P., DINIZ D.G., TAVEIRA S.F. & LIMA E.M. (2013) Biodegradable polymeric nanocapsules based on poly(DL-lactide) for genistein topical delivery: Obtention, characterization and skin permeation studies. *J. Biomed. Nanotechnol*. 9, 527-534.

ZHANG Y., HUO M., ZHOU J. & XIE S. (2010) PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed*. 99, 306-14.

7. APÊNDICE

7.1 Artigo publicado

7.2 Protocolo aprovado no comitê de ética