

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
Escola de Farmácia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Leandro Gonzaga de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO SISTEMA POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA) DE  
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE METOTREXATO EM UM MODELO MURINO DE  
INFLAMAÇÃO E ANGIOGÊNESE**

Ouro Preto  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Escola de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO SISTEMA POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA ) DE  
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE METOTREXATO EM UM MODELO MURINO DE  
INFLAMAÇÃO E ANGIOGÊNESE**

Linha de Pesquisa: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Subárea (\*): 4.03.00.00-5

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Sandra Aparecida Lima de Moura.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gisele Rodrigues da Silva.

Ouro Preto

Minas Gerais - Brasil

Maio – 2014

O482a Oliveira, Leandro Gonzaga de.  
Avaliação da eficácia do sistema poli( $\epsilon$ -caprolactona) de liberação controlada de metotrexato em um modelo murino de inflamação e angiogênes [manuscrito] / Leandro Gonzaga de Oliveira – 2014.  
71f.: il. color.; graf., tab.

Orientador (es): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Aparecida Lima de Moura  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gisele Rodrigues da Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

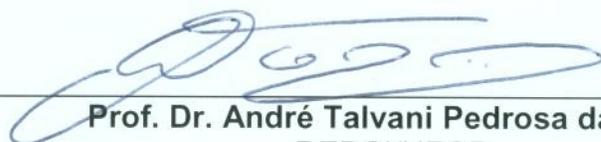
1. Implantes artificiais - Teses. 2. Inflamação - Teses. 3. Metotrexato - Teses. I. Moura, Sandra Aparecida Lima de. II. Silva, Gisele Rodrigues da. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616-089.843

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)

Sessão de defesa da 86ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a Leandro Gonzaga de Oliveira com a defesa da dissertação intitulada: "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO SISTEMA POLI(E-CAPROLACTONA) DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO EM UM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO E ANGIOGÊNESE", avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

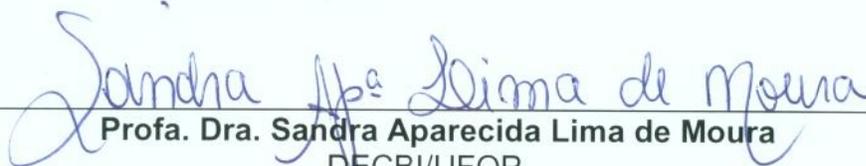
Ouro Preto, 05 de maio de 2014.



**Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva**  
DEBCI/UFOP



**Profa. Dra. Simone Aparecida Rezende**  
DEACL/UFOP



**Profa. Dra. Sandra Aparecida Lima de Moura**  
DECBI/UFOP

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Wilson e Hely,  
Aos meus irmãos Hebe, Helenice e Hilton  
E a minha esposa Fernanda.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Sandra Aparecida Lima de Moura, minha orientadora, muito obrigado pela oportunidade, paciência, amizade e pelos ensinamentos nos campos da ciência e da vida.

À professora Gisele Rodrigues da Silva, minha co-orientadora, obrigado por apostar neste projeto e contribuir com o fornecimento de materiais e preciosas sugestões.

Ao Professor Luís Carlos Crocco Afonso por gentilmente disponibilizar os recursos de reagentes e equipamentos de seu laboratório, possibilitando a realização deste trabalho.

À minha aluna de iniciação científica e colega de laboratório Letícia Aparecida de Figueiredo pelo esforço e dedicação na realização deste trabalho.

Aos amigos do LIP: Bijay, Marina, Hellen, Hebert, Amanda, Renata, Jaime, Leandro (Xuxu), João Lino, Rodrigo, Rodriguinho, Marco Aurélio e Míriam. Muito obrigado pelo convívio, pelas risadas e pelos ensinamentos.

Aos meus pais Wilson e Hely pela força e por sempre acreditarem em meu potencial. À minha irmã Hebe pelo suporte incondicional em todos os aspectos e à minha amada esposa Fernanda pelo companheirismo e apoio nos maus e bons momentos desta caminhada. Vocês são a razão da minha vida.

Aos que de uma maneira mais discreta contribuíram imensamente na realização deste trabalho.

A Deus, que me iluminou, deu força e sabedoria nos momentos de dúvidas, fraquezas e dificuldades.

A todos, meu muito obrigado!

“Aprendi a deixar os dias mais simples, mais leves... Comecei a acreditar que ser feliz é descomplicar a vida, pelo lado de dentro”

Chico Xavier.

**RESUMO**

O direcionamento da liberação dos fármacos permite que doses menores destas substâncias sejam utilizadas para o tratamento de doenças e reduzem a incidência dos efeitos colaterais que poderiam ser provocados por estes princípios ativos. Neste trabalho, propusemos avaliar a eficácia de implantes à base de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e incorporados de metotrexato (PCL-MTX), uma substância com propriedades anti-inflamatória e antiproliferativa. Para cumprir com esse objetivo, utilizou-se o modelo experimental de inflamação e angiogênese a partir de implantes subcutâneos de esponjas de poliéster e poliuretano na região dorsal de camundongos Balb/c. Após 4 dias de inserção dessas esponjas, os sistemas poliméricos de PCL com MTX (grupo tratado) e sem o MTX (grupo controle) foram implantados adjacentes ao sítio de inserção das esponjas. No período de 0h, 24h, 48h e 96 horas pós-implantes do PCL-MTX, os camundongos foram eutanasiados e tiveram as esponjas removidas para análises posteriores. Nos tempos de 48 e 96 horas pós tratamento os marcadores angiogênicos (índice de Hb, número de vasos e níveis de TNF- $\alpha$  indicaram que no grupo tratado ocorreu uma redução significativa desses marcadores da ordem de 85% a 90%, aproximadamente. A análise histológica revelou discreto infiltrado inflamatório, composto por neutrófilos, escassos macrófagos e raros brotos vasculares nos grupos tratados. A deposição de colágeno e o número de fibroblastos na matriz esponjosa foram discretos e constituídos predominantemente por colágeno do tipo III. Tais achados foram confirmados por meio da dosagem de NAG, (índice indireto de macrófagos ativados) e pela dosagem de MPO (índice indireto da ativação de neutrófilos). A análise das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 mostrou níveis reduzidos dessas proteínas nos animais do grupo tratado. Os resultados obtidos indicaram que os sistemas poliméricos permitiram a liberação controlada *in vivo* de MTX em concentrações que possibilitaram o controle da angiogênese e a diminuição dos marcadores inflamatórios produzidos no microambiente inflamatório dos implantes de esponja. Nossos resultados não demonstraram alterações dos marcadores hepáticos e renais em nenhum dos tempos analisados. Diante dos dados obtidos, podemos concluir que os implantes poliméricos de PCL-MTX foram eficazes em controlar os eventos inflamatórios e angiogênicos no modelo de estudo proposto. Adicionalmente, o modelo experimental utilizado revelou-se promissor para futuros ensaios com sistemas de liberação controlada, utilizando o polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona), incorporados a diferentes fármacos nos contextos inflamatório, angiogênico e proliferativo.

Palavras chave: Implantes poliméricos, Inflamação, Metotrexato, Implantes subcutâneos de esponja.

---

**ABSTRACT**

The targeting and modulating release of the drugs allows that small doses of these substances can be used for the treatment of diseases and thus reduce the incidence of side effects that could be caused by these active principles. In this work, we have proposed systems to evaluate the efficacy of implants based on poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and incorporated methotrexate (MTX-PCL), a substance with anti-inflammatory and antiproliferative properties. To achieve this goal, we used the experimental model of inflammation and angiogenesis from subcutaneous implants of polyester and polyurethane sponges inserted in the dorsal region of BALB / c mice. After 4 days of insertion of these sponges, polymeric PCL systems with MTX (treated group) and without MTX (control group) were implanted in the adjacent site of the sponges. In the period 0h, 24h, 48h and 96 h after MTX-PCL implants, mice were euthanized and the sponges removed for further analysis. In times of 48 and 96 hours after treatment, the angiogenic markers (index Hb, number of vessels and TNF- $\alpha$ ) showed significant reduction of these markers on treated group on the order of 85% to 90% approximately. Histological analysis revealed a small inflammatory infiltrate composed of neutrophils, macrophages scarce and rare vascular sprouts in the treated groups. The deposition of collagen and the number of fibroblasts in the spongy matrix were discrete and consists predominantly of collagen type III. These findings were confirmed by measurement of NAG (indirect index of activated macrophages) and by measurement of MPO (an indirect index of neutrophil activation). analysis of TNF- $\alpha$  and IL-6 proinflammatory cytokines showed reduced in animals belonged to the treated group. The results indicated that polymeric systems allows the controlled release of enough amount of MTX *in vivo* in order to control the angiogenesis process and reduction of inflammatory markers produced in the inflammatory microenvironment of sponge implants. Our results demonstrated no changes in hepatic and renal markers on any times of the experiment. In this study, we conclude that polymeric implants with PCL-MTX were effective in controlling the inflammatory and angiogenic events in the site of inflammation. Additionally, the experimental model can be used in the future in studies with controlled release systems using poly ( $\epsilon$ -caprolactone), into the different drugs in inflammatory, angiogenic and proliferative contexts

Keywords: polymeric implants, inflammation, methotrexate, subcutaneous sponge implants.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química do $\epsilon$ -(caprolactona) e poli( $\epsilon$ -caprolactona).....	20
<b>Figura 2</b> Sequência de eventos da resposta inflamatória.....	23
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do ácido fólico e metototrexato.....	26
<b>Figura 4:</b> : Sequência de síntese do sistema do sistema de liberação com MTX através da técnica de modelagem por fusão.....	29
<b>Figura 5:</b> Sequência dos procedimentos de implantação da esponja e posterior inserção dos polímeros de PCL-MTX e PCL puro.....	31
<b>Figura 6:</b> Esponja após ser implantada e seu posicionamento na região subcutânea dorsal dos animais.....	33
<b>Figura 7:</b> Cinética da deposição de matriz extra celular e neoformação nos implantes de esponja Aolongo do experimento.....	42
<b>Figura 8:</b> Foto micrografias dos cortes histológicos (4 $\mu$ m, HE) Representativos dos implantes de esponja dos grupos controle e tratado.....	54
<b>Figura 9:</b> Análise de cortes histológicos (4 $\mu$ m, HE) de fígado (9A) e rins (9B).....	59

---

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Análise da massa dos implantes <i>in vivo</i> .....	43
<b>Gráfico 2:</b> Liberação acumulada de MTX.....	44
<b>Gráfico 3A:</b> Concentração de HB nos implantes de esponja.....	45
<b>Gráfico 3B:</b> Contagem do número de vasos.....	45
<b>Gráfico 4A:</b> Avaliação da inflamação pela atividade da Mieloperoxidase (MPO) nos implantes de esponja.....	48
<b>Gráfico 4B:</b> Avaliação da inflamação pela atividade da N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) nos implantes de esponja.....	48
<b>Gráfico 5A:</b> Níveis do Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) nos implantes de esponja.....	50
<b>Gráfico 5B:</b> Níveis de Interleucina 6 (IL-6) nos implantes de esponja.....	50
<b>Gráfico 6:</b> Peso úmido das esponjas do grupo controle e tratado.....	52
<b>Gráfico 7:</b> Cinética da deposição de colágeno nos implantes de esponja.....	52
<b>Gráfico 8:</b> Avaliação das dosagens séricas hepáticas.....	57
<b>Gráfico 9:</b> avaliação dos marcadores renais.....	57

---

**Gráfico 10:** Avaliação quantitativa da ação do MTX sobre o conjuntos dos glóbulos brancos do sangue.....61

**Gráfico 11:** Avaliação quantitativa da ação do MTX sobre o conjuntos dos glóbulos vermelhos do sangue.....62

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS:

- AR - Artrite Reumatoide
- CCA – Centro de Ciência Animal
- DHR – Dihidrofolato
- DHFR – Dihidro folato Redutase
- DMSO – Dimetilsufóxido
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- HB – Hemoglobina
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido Sulfúrico
- IL-1 – Interleucina 1
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-8 – Interleucina 8
- MPO – Mieloperoxidase
- MTX – Metotrexato
- NAG - N-acetil-β-D-glicosaminidase
- NO – Óxido Nítrico
- PCL – Policaprolactona
- RNA – Ácido ribonucleico
- UFOP–Universidade Federal de Ouro Preto

---

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
2.1 Implantes como sistemas de liberação controlada .....	17
2.2 Principais sistemas de carregamento e liberação de drogas .....	18
2.2.1 Sistemas poliméricos de poli(ε-caprolactona).....	19
2.3 O processo inflamatório .....	21
<b>2.4 Modelo de implantação subcutânea de discos de esponja na indução da angiogênese</b> .....	<b>24</b>
<b>Inflamatória</b> .....	<b>24</b>
2.5 Metotrexato.....	24
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 Objetivo geral .....	27
3.2 Objetivos específicos .....	27
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1 Preparo dos implantes contendo poli(ε-caprolactona) e metotrexato.....	28
<b>4.2. Animais</b> .....	<b>30</b>
4.3 Delineamentos experimental .....	30
4.4 Implantação dos discos de esponja .....	32
4.5 Ensaio de liberação <i>in vivo</i> .....	33
4.6 Quantificação de hemoglobina (HB) para avaliação da angiogênese .....	34
4.7 Avaliação histológica dos discos de esponja .....	34
4.8 Quantificação do colágeno solúvel.....	36
4.9 Dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO) .....	37
4.10 Dosagem da atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase(NAG) .....	37
4.11 Avaliação da cinética de citocinasTNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-10, IL-4, IL-2 e IL-17 produzidas no modelo de implante de esponja .....	38
4.12 Avaliação da toxicidade renal e Hepática.....	39
4.12.1 Análises bioquímicas de enzimas hepáticas e renais .....	39
4.12.2 Análises histológicas de Fígado e Rins.....	39
4.13 Avaliação da mielosupressão desencadeada pelo MTX.....	40
4.14 Análises estatísticas .....	40

---

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1 Estudo da estabilidade e liberação dos polímeros de PCL e ensaios de liberação do MTX <i>in vivo</i> .....	42
5.2 Avaliação da angiogênese induzida por implantes de esponjas. ....	44
5.4 Avaliação do infiltrado inflamatório nos implantes de esponja.....	46
5.5 Avaliação do perfil de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-2 e IL-17 produzidas no modelo de implante de esponja .....	49
5.6 Avaliação dos componentes fibrovascular nos implantes de esponja .....	51
5.7 Avaliação histológica da angiogênese inflamatória .....	53
5.8 Avaliação das funções hepáticas e renais .....	55
5.8.1 Achados histológicos hepáticos renais .....	58
5.9 Avaliação da mielotoxicidade decorrente da liberação de MTX através do sistema polimérico de poli( $\epsilon$ -caprolactona).....	60
5.10 Resumo de resultados .....	64
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação constitui uma resposta dos tecidos vivos frente à ação agressiva de agentes de diversas naturezas na tentativa de eliminar ou neutralizar esses agentes nocivos. A presença do estímulo flogógeno induz a liberação de quimiocinas e citocinas que serão responsáveis pelo aumento da permeabilidade capilar e, conseqüentemente, propiciam a saída de líquido e células dos vasos sanguíneos para o interstício, desencadeando o edema e rubor característicos (KOATZ, 2001).

Dependendo do tempo de duração, a inflamação pode ser dividida em aguda ou crônica. A inflamação aguda pode durar de horas a até poucos dias e apresenta predominantemente fenômenos exsudativos, ao passo que inflamações que persistem por períodos de meses ou até anos, e que se caracterizam por uma série de fenômenos produtivos como aumento do número de vasos, proliferação de fibroblastos, produção de colágeno, aumento da migração de monócitos e linfócitos são classificadas como crônicas (MONTENEGRO, 2006).

Doenças inflamatórias crônicas, tais como artrite reumatoide (AR), psoríase e lúpus eritematoso sistêmico vêm acometendo grande parcela da população mundial e são responsáveis por acarretar grandes prejuízos para o indivíduo afetado, seja por comprometer suas atividades laborais ou por gerar lesões estéticas que interfiram na sua vida social, como o caso da psoríase.

No âmbito terapêutico, o metotrexato (MTX) tem sido considerado o fármaco de primeira linha no tratamento de uma série de processos inflamatórios, além de sua utilização como antineoplásico em função de sua atividade antiproliferativa. Porém, embora este fármaco tenha se apresentado eficaz na modulação da resposta inflamatória e na regressão da doença como um todo, a multiplicidade de efeitos adversos provenientes do seu uso como náusea, anorexia, diarreia e queda de cabelo, tem feito com que uma expressiva porcentagem dos pacientes abandone o tratamento (VAN EDE *et al*, 1998). Em virtude desses inconvenientes terapêuticos relacionados ao uso deste e de outros inúmeros fármacos, nas últimas décadas, tem-se aumentado a busca por novos sistemas com o objetivo de potencializar a ação dos diferentes fármacos em seu sítio específico de ação, utilizando uma dosagem menor e, conseqüentemente, reduzindo a incidência e intensidade de reações adversas. De modo geral, esses objetivos têm sido alcançados com o emprego de diversas matrizes poliméricas que, após serem implantadas no tecido alvo, são capazes de liberar, de forma regulada e sustentada, quantidades terapêuticas de fármacos que não são atingidas pelas vias de administração convencionais.

Dentro deste contexto, os implantes poliméricos constituídos de poli( $\epsilon$ -caprolactona) constituem alternativas interessantes de sistemas de entrega de substâncias ativas *in vivo*. Essa afirmação é respaldada por duas características intrínsecas desse sistema: sua biocompatibilidade, que afasta os riscos de rejeição pelo organismo e sua biodegradação que dispensa a necessidade de uma segunda incisão para retirada da matriz vazia após a saída de todo fármaco.

Estudos anteriores realizados por Sartori *et al.* (2007) avaliaram a incorporação de MTX em sistemas poliméricos carreadores nanoestruturados e sua estabilidade na córnea de coelhos. Os resultados demonstraram que a matriz polimérica não provocou lesão significativa ao epitélio da córnea, sendo desta forma, viável a administração desses sistemas *in vivo*.

Recentemente, PEREIRA *et al.* (2013), utilizando o MTX incorporado em implantes poliméricos de PCL no modelo de tumor sólido de Ehrlich em patas de camundongos, demonstraram que o MTX liberado foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de células inflamatórias e promover a diminuição do tumor em torno de 42,7%.

Embora diversos trabalhos tenham demonstrado a funcionalidade e aplicabilidade deste tipo de sistema polimérico, ensaios que avaliam a cinética temporal de liberação dos fármacos associada aos efeitos locais e sistêmicos *in vivo*, ainda não foram realizados.

Considerando-se as inúmeras vantagens dos sistemas “*delivery*”, torna-se fundamental a caracterização da cinética temporal de liberação dos fármacos. O estudo em um microambiente compartimentalizado *in vivo* poderia ser de fácil reprodutibilidade e elucidaria a eficiência do sistema em manter uma resposta controlada e sustentada do fármaco.

Neste trabalho, propusemos avaliar o sistema de liberação controlada, constituído por poli( $\epsilon$ -caprolactona) utilizando o fármaco metotrexato (sistema PCL-MTX) no modelo murino de inflamação e angiogênese induzido por implantes subcutâneos de esponja. A partir dos dados obtidos, novas perspectivas de aplicabilidade deste modelo para o estudo de triagem de novos sistemas de liberação controlada de fármacos poderão ser desenvolvidos no contexto das doenças inflamatórias.

## 2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Implantes como sistemas de liberação controlada

Os implantes são sistemas de liberação controlada de fármacos constituídos por polímeros biodegradáveis e não biodegradáveis. O propósito desses sistemas é promover a liberação de fármacos no próprio local de ação utilizando-se de concentrações terapêuticas mais eficazes e que normalmente não são obtidas por vias de administração convencionais. Esse mecanismo possibilita também a redução e o número de efeitos colaterais aumentando, conseqüentemente, a adesão do paciente ao tratamento (LEE *et al*,2010).

Implantes elaborados com polímeros não biodegradáveis promovem uma liberação controlada e sustentada da droga seguindo uma cinética de ordem zero. No entanto, o fato deste sistema não ser metabolizado, faz com que, após a saída de todo o fármaco, o paciente seja submetido a uma segunda cirurgia para retirada do implante, expondo-o a riscos de infecções (MANSOOR *et al*, 2009). Por outro lado, sistemas de implantes biodegradáveis e compostos de material sintético ou natural, são metabolizados e originam subprodutos não tóxicos que são facilmente eliminados pelo organismo. O fato deste sistema não exigir a realização de uma segunda incisão para sua retirada após a completa liberação do fármaco, somada a sua biocompatibilidade, tornam-o uma alternativa bastante vantajosa para o tratamento de diversas doenças inflamatórias crônicas (CHU, 2008).

Uma grande variedade de polímeros biodegradáveis tem sido estudada para o desenvolvimento de novos implantes. Polímeros naturais como a albumina bovina, albumina humana, colágeno e gelatina também têm sido investigados com esse propósito. No entanto, o uso desses polímeros têm se tornado inviável devido ao grau de pureza questionável. Por outro lado, polímeros sintéticos como poliamidas, poliuretano, poliéster, e poliacrilamidas têm sido extremamente utilizados na confecção de sistemas de liberação em decorrência de não apresentarem as desvantagens provenientes do uso de polímeros naturais (JAIN, 2000; MOURA, 2011).

## 2.2 Principais sistemas de carregamento e liberação de drogas

Em face ao alto custo de desenvolvimento e ou obtenção de novas moléculas ativas, os sistemas nanoestruturados de entrega de fármacos têm se tornado um foco atrativo dentro do setor da indústria farmacêutica. Isso porque uma nova formulação em nanopartículas pode resgatar drogas promissoras, que foram descartadas após vultuosos investimentos por causa da descoberta de potenciais efeitos colaterais ou baixa biodisponibilidade, além de gerar novas patentes (SHAFFER, 2005). Entretanto o alto custo dessa tecnologia tem direcionado sua aplicabilidade para fármacos de maior interesse mercadológico e negligenciado sua utilização para doenças que afetam populações de baixo poder aquisitivo. No entanto, pesquisas criativas, como as desenvolvidas aqui mesmo no Brasil, sugerem que o uso de biopolímeros de baixo custo como a quitosana ou plásticos biodegradáveis utilizados em embalagens como o polihidroxialcanoato podem ser alternativas viáveis. (THOMAS et al, 2006)

Outra classe de sistemas carreadores de fármacos são os lipossomas que se constituem de vesículas esféricas artificiais de tamanho variável (20 nm a vários micrômetros de diâmetro) que podem ser produzidas com fosfolipídios naturais e colesterol. Esse mecanismo possibilita que fármacos hidrossolúveis fiquem encapsulados no interior da cavidade lipossomal enquanto que os fármacos lipossolúveis são incorporados na bicamada lipídica. Essa bicamada, por sua vez, pode se fundir com outras bicamadas lipídicas, como de células, liberando o conteúdo dos lipossomas (BANGHAM, 1961). O relativo baixo custo e facilidade de obtenção dessas esferas artificiais têm aumentado o seu potencial aplicação para a terapia gênica de uma série de doenças como anemia falciforme, câncer, fibrose cística, hemofilia e entre outras (MATSURA, 2003).

Dentro deste contexto de sistemas de liberação, podemos citar as Ciclodextrinas que constituem uma família de oligossacarídeos cíclicos tridimensionais com alto número de hidroxilas o que lhes confere uma boa solubilidade em água. Como seu interior é hidrofóbico, servem bem para solubilizar drogas lipossolúveis. Existem também os dendrímeros que são polímeros globulares altamente ramificados, com cerca de 1-10 nm produzidos pela primeira vez no início da década de 1980 por Donald Tomalia. Sua vantagem em relação às outras partículas poliméricas é a previsibilidade de seu tamanho e número de grupos funcionais, o que confere maior segurança quanto à quantidade de fármaco ou DNA complexado. Quanto à toxicidade, os dendrímeros catiônicos são mais tóxicos e os aniônicos mais biocompatíveis (D'EMANUELE, 2005).

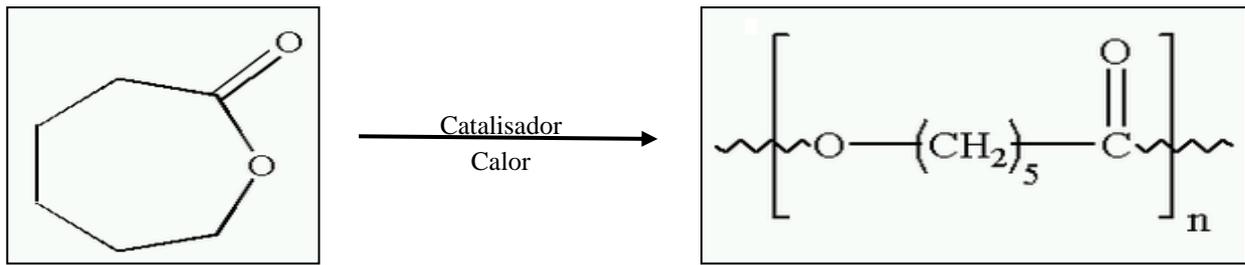
De modo geral, todos esses sistemas de liberação controlada de fármacos apresentam em comum várias vantagens em relação aos sistemas convencionais: maior controle da liberação do princípio ativo, diminuindo o aparecimento de doses tóxicas e subterapêuticas; utilização de menor quantidade do princípio ativo, resultando em menor custo, maior intervalo de administração e melhor aceitação do tratamento pelo paciente. Por outro lado, as desvantagens como possível toxicidade dos produtos da sua biodegradação e custo mais elevado inerentes ao processo desenvolvimento desses sistemas devem ser monitoradas e contornadas.

### 2.2.1 Sistemas poliméricos de poli( $\epsilon$ -caprolactona)

O poli( $\epsilon$ -caprolactona), obtido em 1934 por VAN-NATTA *et al* (FIGURA 1), é formado pela polimerização de monômeros de  $\epsilon$ -caprolactona. Sua estrutura apresenta-se como um poliéster hidrofóbico devido a sequência de quatro hidrocarbonetos e sua biodegradação ocorre de modo lento (2 a 3 anos) por meio da hidrólise das ligações éster, liberando quantidades mínimas de subprodutos ácidos que poderiam desencadear uma reação inflamatória *in vivo* (BERGSMA, 1995). Entretanto, o organismo consegue tamponar essas pequenas variações de pH na região do implante e, conseqüentemente, inibir o desenvolvimento de um processo inflamatório (WOODRUFF & HUTMACHER, 2010).

Estudos utilizando implantes de PCL, preparado por diversas técnicas e contendo inúmeras substâncias antineoplásicas tem sido relatados nas últimas décadas. Ensaio com esses sistemas carreadores incorporados com 5-fluoroacil (HOU *et al*, 2011) e Bis(maltolato)oxovanádio (JAKCSON *et al*, 1997) foram realizados e os resultados obtidos demonstraram que essas matrizes poliméricas foram capazes de promover a liberação controlada de substâncias ativas e inibir o crescimento tumoral local.

Baseado nas características de biocompatibilidade, alta permeabilidade e biodegradação intrínsecas deste polímero, o PCL foi utilizado neste trabalho na obtenção de implantes incorporados com MTX utilizando-se a técnica de modelagem por fusão (FIGURAS 3 e 4).



**Figura 1:** Estrutura química da do monômero  $\epsilon$ - caprolactona e seu polímero poli ( $\epsilon$ - caprolactona) (VAN-NATTA *et al*, 1934). Sua estrutura apresenta-se como um poliéster hidrofóbico devido a sequência de quatro hidrocarbonetos e sua biodegradação dá-se por meio da hidrólise das ligações éster (BERGSMA, 1995).

### 2.3 O processo inflamatório

Lesões tissulares de natureza química, física ou biológica desencadeiam um foco inflamatório caracterizado por rubor, calor, dor e edema cuja finalidade é, em última análise, reestabelecer o equilíbrio fisiológico e, conseqüentemente, promover a cicatrização da região lesada (ALBINI *et al*, 2005; BALKWILL *et al*, 2005). Esses sinais cardinais, como são conhecidos, são explicados da seguinte maneira: na presença de um agente nocivo, ocorre liberação de mediadores químicos que provocam aumento da permeabilidade vascular permitindo o extravasamento de líquido do interior dos vasos para a cavidade intersticial gerando o edema. O fluxo sanguíneo mais intenso na região lesada e conseqüente hipertrofia do calibre dos vasos provocam o calor e rubor característicos. A dor é decorrente da estimulação das terminações nervosas por substâncias como bradicinina e prostaglandinas liberadas durante o processo inflamatório. Há ainda o último sinal cardinal que é a perda de função do órgão a qual ocorre devido ao edema, à dor e a substituição de células funcionais por tecido de cicatrização. (PUNCHARD *et al*, 2004).

Nesse sentido, com a finalidade de promover a defesa e o remodelamento do tecido durante o processo inflamatório, ocorre a migração de leucócitos para a região lesada. Os neutrófilos constituem as primeiras células de defesa a adentrar no foco da lesão e são atraídos por citocinas inflamatórias liberadas por plaquetas ativadas e células endoteliais para promover a limpeza do local (fagocitose) e impedir a invasão e/ou proliferação de micro-organismos patogênicos (DIEGELMANN & EVANS, 2004).

Numa seqüência temporal, os monócitos, também atraídos por citocinas inflamatórias, migram do espaço intravascular para a região da lesão (Figura1), local onde são ativados e passam a ser denominados de macrófagos. Essas células ativadas secretam mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO), IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e fatores de crescimento que atuam em processos importantes, como deposição de colágeno, angiogênese e na contração da ferida (TIMOTHY & DIPIETRO, 2011). Na etapa seguinte ocorre a migração de células das áreas adjacentes como células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos, os quais participarão ativamente do processo de fibroplasia (produção de colágeno pelos fibroblastos), deposição de matriz extracelular, angiogênese (formação de novos vasos), cicatrização e reepitelização do local da lesão (SINGER & CLARK, 1999) (FIGURA 2).

Estabelecido o processo inflamatório com conseqüente eliminação ou estabilização do agente nocivo, o organismo pode responder de duas maneiras: reestruturar o local da injúria e promover a reconstrução do tecido lesado, no caso de eliminação do estímulo nocivo ou, caso o agente nocivo persista, dar continuidade ao processo inflamatório com a finalidade de amplificar sua resposta.

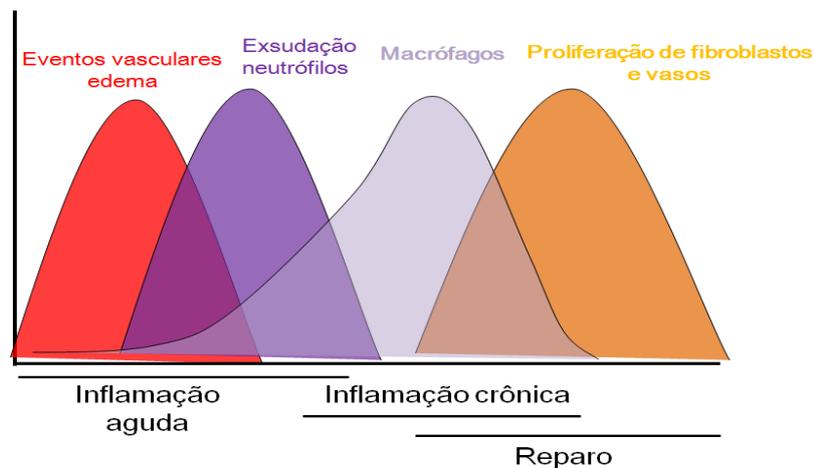
Dentre os eventos característicos da resposta inflamatória crônica a angiogênese, definida como a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, é de vital importância para o remodelamento e reparo tecidual na manutenção deste tipo de resposta. Trata-se de um processo complexo regulado por sinalizadores biológicos como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento liberados por células presentes no foco inflamatório. A formação de um novo vaso inicia-se pela ativação de células endoteliais provenientes de vasos pré-existentes. Quando ativadas, essas células liberam enzimas proteolíticas que degradam a membrana basal adjacente e permitem a sua migração em direção à matriz extracelular onde será formado o broto capilar estimulado por uma variedade de fatores de crescimento liberados por diversas células como macrófagos, células Natural Killer e fibroblastos presentes no local da injúria (ARROYO & IRUELA-ARISPEM, 2010; JAKCSON *et al*, 1997). Na fase final do processo angiogênico ocorre a formação das “alças” capilares e a determinação da polaridade das células endoteliais que será importante para a formação do lúmen capilar e para o fortalecimento das interações célula-célula e célula-matriz (BISCHOFF, 1997). Desse modo, o vaso recém-formado permitirá o aporte de oxigênio, nutrientes e células inflamatórias cruciais para o processo de remodelamento e/ou cicatrização do tecido.

Importante salientar que, embora a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes representa um aspecto extremamente importante para o desenvolvimento e reparo tecidual, a angiogênese também possui papel crítico no desenvolvimento de várias doenças associadas a processos inflamatórios crônicos como psoríase e a artrite reumatoide. (JAKCSON *et al*, 1997).

Atualmente é clara a idéia que a inflamação normal (protetora), isto é, que promove reparação tecidual, é auto-limitada. Qualquer fator desregulador deste processo pode ser patogênico, como acontece nas inflamações crônicas e no câncer. Portanto, dependendo do contexto, as células inflamatórias podem ter papel benéfico e/ou prejudicial, estando envolvidas na patogênese de diversas doenças, incluindo as neoplasias (COUSSENS & WERB, 2002).

Nesse sentido, baseado na co-dependência entre inflamação crônica e angiogênese, fármacos com capacidade antiproliferativa como o metotrexato (MTX), têm sido bastante estudados. Em nosso trabalho, a escolha desta substância foi justificada por sua conhecida ação sobre a modulação de aspectos importantes da resposta inflamatória. A inflamação por sua vez, fornece um microambiente repleto de marcadores biológicos como citocinas, mediadores químicos

da inflamação, fatores de crescimento, distintas células inflamatórias e angiogênicas, além dos constituintes da matriz extracelular que podem ser avaliados. Desta forma podemos estabelecer uma plataforma de testes não apenas com o MTX, mas com qualquer substância inovadora que se queira testar utilizando a tríade: fármaco, processo inflamatório e o sistema de liberação a base de PCL. A obtenção desta plataforma de testes portanto, constituir-se-á em um dos pontos relevantes deste trabalho.



Fonte: Adaptado de Robbins,2008, pag. 81

**Figura 2- Sequência de eventos durante a resposta inflamatória.** A inflamação inicia-se com a hiperemia e aumento da permeabilidade vascular. Posteriormente, ocorre a exsudação de neutrófilos e, em seguida de macrófagos. Caso o agente flogógeno seja eliminado, inicia-se a fase de reparo.

## 2.4 Modelo de implantação subcutânea de discos de esponja na indução da angiogênese

### Inflamatória

A implantação de matrizes sintéticas de poliéster-poliuretano induz uma reação inflamatória, do tipo corpo estranho, com conseqüente formação de tecido de granulação rico em novos vasos sanguíneos, representando um sistema que tem sido apropriado para o estudo da angiogênese inflamatória.

O modelo de implantação subcutânea de matrizes esponjosas em animais foi descrito inicialmente por GRINDLAY & WAUGH (1951) e modificado por ANDRADE em 1987. Assim, processos naturais como a vascularização de feridas na cicatrização podem ser mimetizados utilizando-se esse modelo. Outros fatores como desnutrição, doenças inflamatórias sistêmicas diabetes e tumores já mostraram afetar o processo de reparo neste e em outros modelos (Andrade *et al.*, 1987; Teixeira *et al.*, 1999; Brashaw *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2006).

Além disso, o modelo de esponja permite o estudo temporal do infiltrado inflamatório, a análise bioquímica dos fluidos coletados, os efeitos de drogas sobre o processo, além de estudos histológicos e morfométricos (Andrade *et al.*, 1987; Bailey, 1988; Barcelos *et al.*, 2004).

Utilizando-se essa abordagem metodológica, tem sido possível caracterizar vários componentes envolvidos na neoformação vascular bem como sua associação com eventos inflamatórios e tumorais.

Dentro deste contexto, diante das particularidades intrínsecas deste modelo de poliéster-poliuretano propomos avaliar a eficácia do sistema polimérico de liberação controlada (PCL/MTX) no microambiente inflamatório e proliferativo dos implantes subcutâneos de esponja.

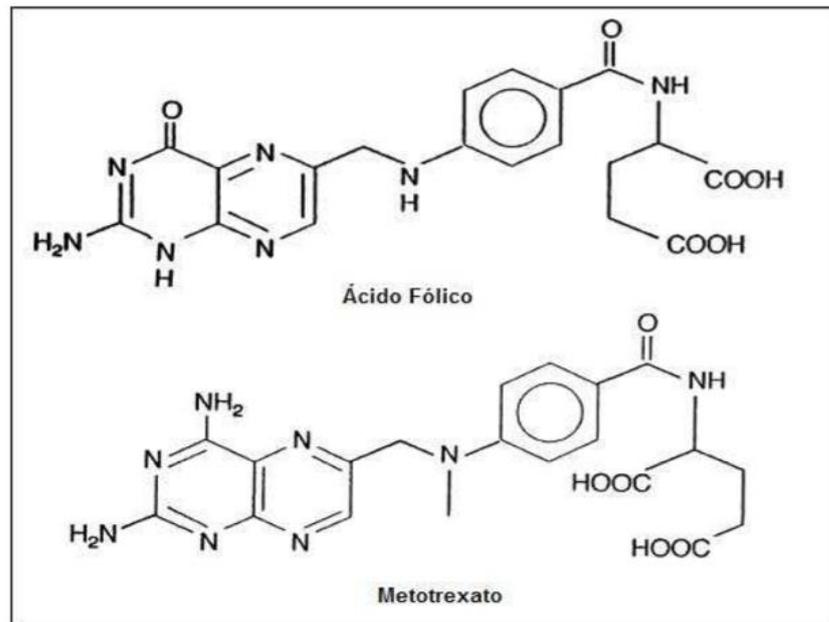
## 2.5 Metotrexato

O metotrexato (FIGURA.3) é um antagonista do ácido fólico e foi utilizado inicialmente em 1947 nos Estados Unidos para o tratamento de leucemia aguda em crianças. Posteriormente, na década de 80, descobriu-se que a droga possuía também elevada atividade anti-inflamatória, fazendo com que fosse empregado como fármaco de primeira linha para o tratamento de várias

doenças inflamatórias crônicas como psoríase e Artrite Reumatoide. (WEINBLATT & MAIER, 1990).

Este fármaco penetra na célula através de um transportador ativo e inibe a enzima dihidrofolato redutase (DHFR) fazendo com que a conversão de Dihidrofolato (DHF) em Tetrahydrofolato (THF) seja interrompida (GROSFLAM & WEINBLATT, 1991; GOLDMAN *et al*, 1995). Consequentemente, ocorre inibição do metabolismo de purina e pirimidina, desencadeando o bloqueio da síntese de DNA, RNA e 5- Metil- tetrahydrofolato (5-metil-THF). A diminuição da disponibilidade deste leva a um aumento da concentração de adenosina plasmática. De acordo com o exposto, o MTX possui atividade antiproliferativa, decorrente da inibição da síntese de ácidos nucleicos e anti-inflamatória, desencadeada pelo aumento da liberação de adenosina. Esse nucleosídeo possui papel central na regulação da resposta inflamatória e atua diminuindo a adesão de neutrófilos, inibindo a atividade de células NK, macrófagos e linfócito T. Além disso, em processos inflamatórios crônicos como psoríase e artrite reumatoide, por exemplo, o MTX atua modulando a expressão de importantes citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8. (VAN EDE *et al*, 1998).

O MTX é um pó cristalino amarelado, com ponto de fusão entre 182 a 189 °C e peso molecular de 454,4 g/mol. É praticamente insolúvel em água, etanol, clorofórmio e éter, e bastante solúvel em soluções diluídas de hidróxidos de álcalis e carbonatos (CLARKE'S, 2006). Sua estrutura é constituída por uma porção heterocíclica (anel pterínico 2,4- diamino-substituído) ligada a uma porção *p*-aminobenzoil que, por sua vez, está ligada a uma unidade de ácido glutâmico. A molécula é um polieletrólito com dois grupos carboxílicos cujas constantes de dissociação (pKa) são de 3,36 ( $\alpha$ -carboxil) e 4,70 ( $\gamma$ -carboxil), além de uma variedade de funções nitrogenadas, onde a mais básica é provavelmente o grupamento N- 1 guanídico do anel pterina (pKa 5,71). Sua solubilidade aquosa é pH dependente, variando de 0,9 mM em pH 5 até 20 mM em pH 7. A principal diferença estrutural do MTX em relação ao seu análogo ácido fólico é a substituição de uma hidroxila por uma amina no C2 e uma metilação no N10 (RUBINO, 2001) (FIGURA 3).



Fonte: RUBINO, 2001. P. 219 – 220.

**Figura 3:** Estrutura química do Ácido fólico e Metotrexato.

Neste contexto, baseados em critérios de biocompatibilidade, alta permeabilidade a diversos fármacos de natureza anti-inflamatória e por ser biodegradável, polímeros de PCL foram utilizados neste trabalho com o objetivo de produzir implantes incorporados de MTX através da técnica de modelagem molecular por fusão.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia do sistema poli( $\epsilon$ -caprolactona) de liberação controlada de metotrexato em um modelo murino de inflamação e angiogênese.

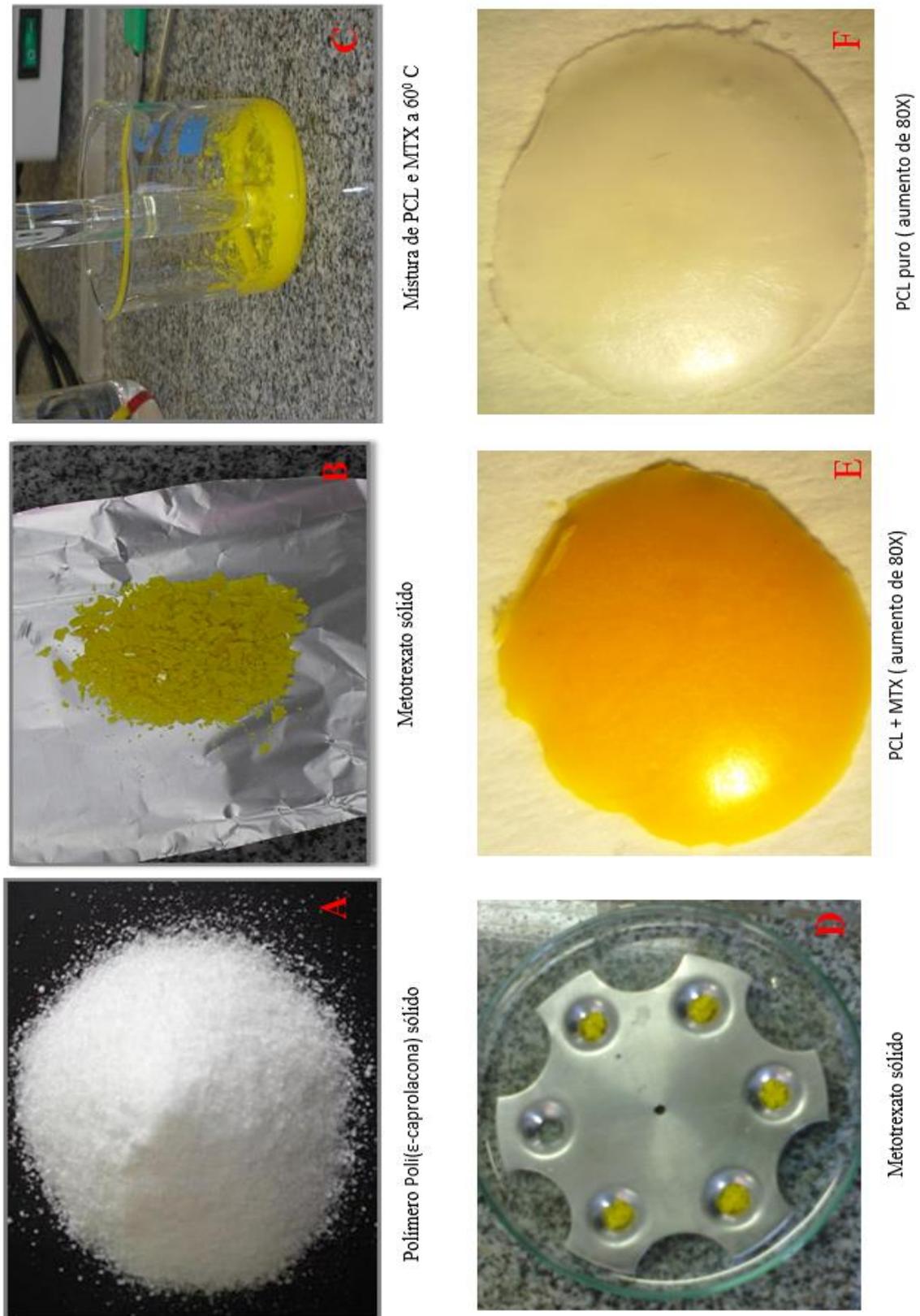
#### 3.2 Objetivos específicos

1. Preparar e obter os implantes à base de PCL e MTX.
2. Avaliar o perfil de liberação do MTX a partir dos sistemas de PCL *in vivo*.
3. Estabelecer uma plataforma de testes *in vivo* para o estudo do sistema de liberação controlada de fármacos utilizando o sistema PCL-MTX.
4. Avaliar o efeito dos sistema PCL-MTX na cinética da angiogênese inflamatória por meio de análises histomorfométricas, bioquímicas e imunoenzimáticas.
5. Avaliar o impacto sistêmico e medular do PCL-MTX por meio de análises bioquímicas dos marcadores renais (ureia e creatinina), hepáticos (TGO e TGP) e parâmetros hematológicos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preparo dos implantes contendo poli( $\epsilon$ -caprolactona) e metotrexato

Os implantes foram preparados por meio da técnica denominada modelagem por fusão que consiste na mistura do metotrexato (MTX; Sigma Chemical Co. USA) (FIGURA 4B) com partículas fundidas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL; MW ~ 14,000; densidade = 1.145 g/ml a 25° C, Sigma Chemical Co.; USA) (FIGURA. 4A e 4C). Em seguida a mistura foi colocada em um molde esférico metálico especial (FIGURA. 4D). Inicialmente, a PCL foi aquecida até completa fusão. Posteriormente, adicionou-se o MTX lentamente sobre a PCL fundida a 60°C e submeteu-se a mistura à agitação constante a 50 RPM por 20 minutos. A mistura resultante foi coletada e moldada a implantes esféricos PCL-MTX contendo cada implante 2 mg de MTX e 15 mg de PLC (FIGURA. 2E). Implantes sem fármaco (FIGURA 4F) também foram preparados com 15 mg de PCL puro (FIGURA 4).



**FIGURA 4:** Sequência de síntese do sistema do sistema de liberação com MTX através da técnica de modelagem por fusão.

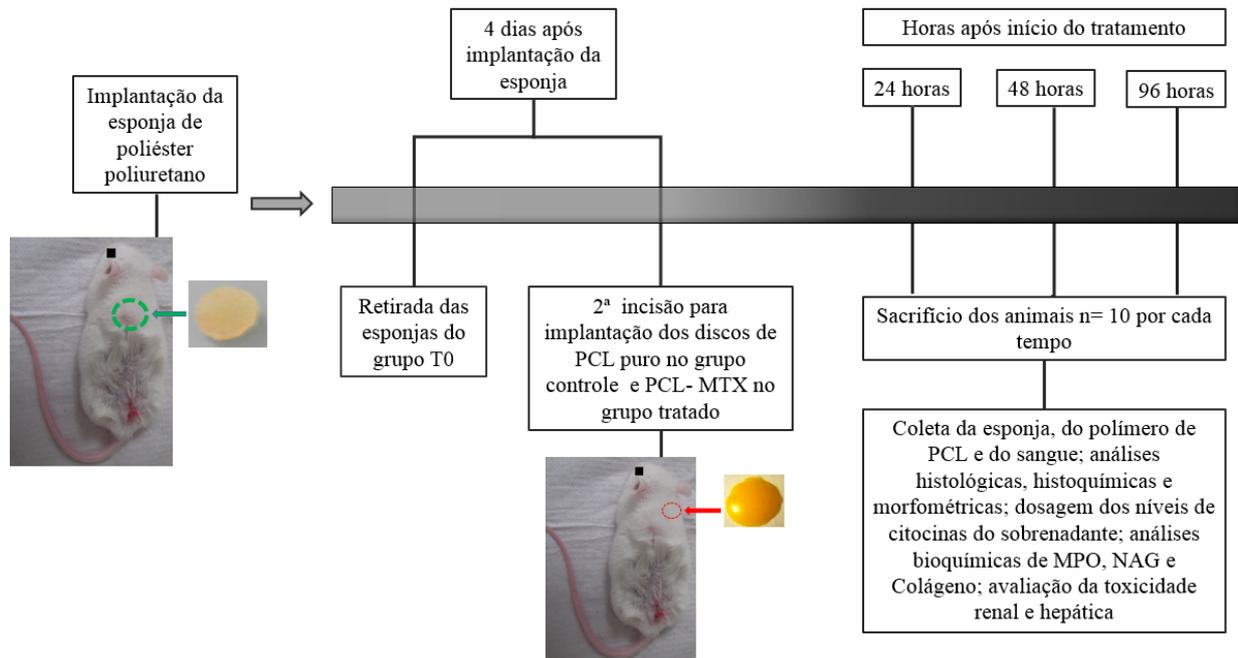
## 4.2. Animais

Foram utilizados 90 animais machos da linhagem Balb/c com idade entre 6 a 8 semanas, pesando aproximadamente 30 gramas, provenientes do Centro de ciência animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram separados aleatoriamente (n=5/gaiola) e mantidos com livre acesso à água e ração (FIGURA 3).

A eutanásia foi realizada através de deslocamento cervical em animais anestesiados com uma mistura de ketamina e xilasina conforme estabelecido pelo CEUA (Comissão de ética no uso de animais) registrado no protocolo de aprovação número 054/2012, de 16 de maio de 2012. (ANEXO 1).

## 4.3 Delineamentos experimental

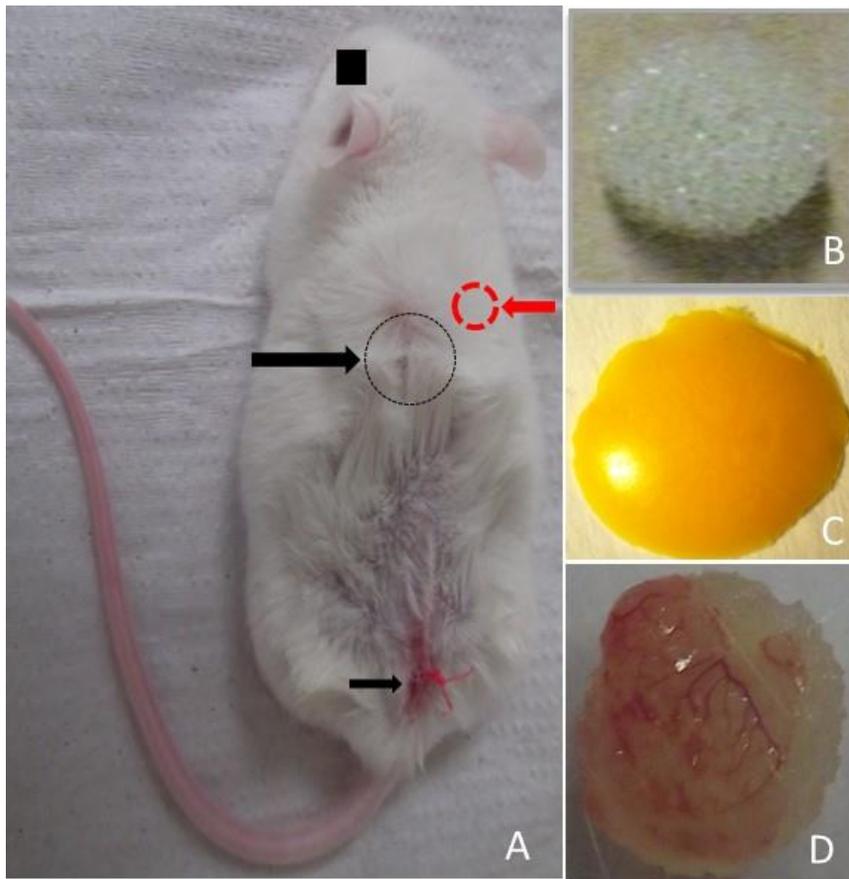
Inicialmente, inseriu-se uma esponja na região dorsal do animal com o objetivo de induzir o processo inflamatório. Quatro dias após este procedimento, foi feita uma nova incisão na região lateral ao local do implante, o tecido foi divulsionado e o sistema polimérico PCL-MTX foi inserido adjacente as esponjas no tecido subcutâneo dos animais do grupo tratado. Os animais do grupo controle receberam apenas o polímero (PCL puro), sem o fármaco. Os camundongos foram então divididos em grupos e submetidos a períodos de tratamento (contabilizados a partir da implantação dos polímeros de PCL) de 24, 48 e 96 horas respectivamente. Após este período os animais foram eutanasiados e as esponjas retiradas para análise. Também foi utilizado um quarto grupo denominado de tempo zero (T0) no qual as esponjas eram retiradas dos animais logo após decorridos os quatro dias de sua implantação. Conseqüentemente, esse grupo não foi submetido ao processo de incisão do polímero de PCL e serviu como um balizador para a avaliação dos grupos tratados e não tratados. (FIGURA 5).



**FIGURA 5: sequência dos procedimentos de implantação da esponja e posterior inserção dos polímeros de PCL-MTX e PCL puro.** Após 4 dias de implantação da esponja os animais foram submetidos a nova incisão para retirada da esponja do grupo T0 e inserção dos discos poliméricos de PCL-MTX e PCL puro nos grupos tratado e controle, respectivamente. Os grupos foram subdivididos em tempos de 24, 48 e 96 horas de tratamento e após esta etapa, coletou-se a esponja, o polímero de PCL, sangue, rins e fígado para realização das análises propostas.

#### **4.4 Implantação dos discos de esponja**

Discos de esponjas de poliéster-poliuretano medindo 8,0 mm de diâmetro, 5 mm de espessura, e 4,64 mg de peso (Vitaform, Manchester UK), foram preparados e colocados em álcool 70°GL por 24 horas. No dia da implantação, as esponjas foram lavadas e fervidas a 95 °C em água destilada por 20 minutos. Os animais foram anestesiados utilizando uma solução de xilazina e quetamina 0,3 mL por animal, a região dorsal foi tricotomizada e fez-se a assepsia com álcool 70°GL. Foi realizada uma incisão com cerca de 1 cm de comprimento na pele da região dorso-lombar. O tecido subcutâneo foi divulsionado e a esponja inserida a 2 cm acima da região de incisão. Posteriormente, os animais foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração (FIGURA 6).



Fonte: imagens do autor

**FIGURA 6:** Esponja após ser implantada e seu posicionamento na região subcutânea dorsal dos animais (A). Disco de esponja antes da implantação (B); Polímero de PCL contendo MTX (C); Disco de esponja com 8 dias pós-implantação com presença de tecido fibrovascular (D). Esponja inserida no tecido (setas preta grande) e incisão cirúrgica já cicatrizada do local da inserção (seta preta pequena); Local de implantação do polímero PCL-MTX 4 dias após a implantação do disco de esponja (seta vermelha).

#### 4.5 Ensaio de liberação *in vivo*

O ensaio de liberação *in vivo* do metotrexato a partir dos sistemas poliméricos foi realizado nos tempos de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inserção dos implantes. Os animais tratados foram eutanasiados utilizando previamente uma solução de xilazina e quetamina 0,6 mL por animal e em seguida foi feito o deslocamento cervical dos mesmos. Após esta etapa, os implantes de MTX- PCL foram cuidadosamente retirados. Na sequênciao implantes foram dissolvidos em 50 mL de solução de HCl 0,1 mol/L e uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de

10 mL, sendo o volume completado com o mesmo solvente. O conteúdo de MTX remanescente nos implantes removidos foi determinado por meio da medida da absorvância da solução à 307 nm.

#### 4.6 Quantificação de hemoglobina (HB) para avaliação da angiogênese

A avaliação da angiogênese foi realizada através de método colorimétrico a partir da medição do conteúdo de hemoglobina dos implantes pelo método de Drabkin & Austin (1932) adaptado como índice de neovascularização por Plunkett *et al*, (1990). As amostras foram analisadas nos tempos de 24, 48 e 96 horas após o início do tratamento. No dia da retirada dos implantes os animais foram eutanasiados e os implantes removidos e avaliados. Aqueles implantes que na análise macroscópica apresentaram indícios de hemorragia ou infecções foram descartados.

Os implantes foram pesados e homogeneizados em 2 mL de reagente de Drabkin (Kit de dosagem hemoglobina-Labtest). O homogenato foi centrifugado por 40 min a 13000 RPM e o sobrenadante filtrado em filtro 0.22 µm (Millipore). A concentração de hemoglobina das amostras foi determinada através de leitura espectrofotométrica a 570 nm. A concentração de hemoglobina foi obtida comparando-se as leituras obtidas com uma curva padrão previamente estabelecidas e foi expressa em µg de Hb/ tecido.

#### 4.7 Avaliação histológica dos discos de esponja

A avaliação histológica foi realizada nos tempos de T0, 24, 48 e 96 horas pós-implante do sistema PCL-MTX e PCL puro nos grupos tratados e controle, respectivamente. Os tecidos coletados para avaliação histológica foram fixados em solução formol-salina a 10% durante 48 horas e posteriormente, processadas para inclusão em parafina. Após estes procedimentos os blocos foram cortados a 4µm e corados com hematoxilina-eosina (HE).

Os cortes histológicos foram analisados e digitalizados por uma microcâmera JVC-TK 1270/JGB e a imagens transferidas para o analisador (Kontromeletronis, Carls Zeiss-KS300 versão

2) e o índice de vascularização do tecido foi avaliado por meio de análises morfométricas. Para a contagem dos vasos sanguíneos, esses foram definidos como estruturas com luz e com presença ou não de hemácias. O número mínimo de campos contados (amostra) para a determinação do número de vasos foi determinado pela técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios em relação à amostra. Em uma lâmina representativa de cada grupo experimental foi determinado o número de vasos em 50 campos (aumento de 400x). Com os dados dessas 50 amostras foram criados, através de sorteio aleatório com reposição, grupos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 amostras. A média e o desvio padrão foram calculados para cada grupo.

O número mínimo representativo de campos microscópicos por tratamento foi obtido quando o aumento no número de campos não resultou em considerável redução ( $\leq 5\%$ ) no respectivo valor do desvio padrão. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. do número total de vasos/15 campo.

#### 4.8 Quantificação do colágeno solúvel

A quantidade de colágeno solúvel total foi determinada através da colorimetria (PHILLIPS *et al*, 2004; CAMPOS *et al*, 2006; MENDES *et al*, 2009) baseada na reação de *picrossirius red*. As amostras de esponja foram homogeneizadas com salina/Triton-X-100 (pH 7,8). Em seguida, foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 25°C. Posteriormente, adicionou-se 50µL do reagente *picrossirius red* a 25 µL da amostra. Após incubação de 30 minutos a temperatura ambiente, o complexo colágeno-*picrossiriusred* foi novamente centrifugado, a 3000 rpm por 10 minutos a 25°C. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento lavado com 500 µL de etanol (99% puro e livre de metanol, Synth) e o complexo colágeno-corantes é reconstituído em 1mL de reagente alcalino NaOH 0,5M (Synth). Após solubilização, as amostras foram transferidas para placa de 96 poços e lidas a 540nm em leitor de microplacas. A quantificação de colágeno foi determinada através da comparação de uma curva padrão utilizando padrão de gelatina (Merck) e os resultados expressos em microgramas (µg) de colágeno por miligramas de implante.

#### 4.9 Dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos. A dosagem de MPO é uma técnica que tem sido usada com sucesso como um marcador bioquímico de recrutamento de neutrófilos na lesão e permite demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (MULLANE *et al.*, 1985; CROSS *et al.*, 2003).

Após a dosagem da hemoglobina, o sedimento obtido foi pesado e solubilizado em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio a 80 mM, pH 5,4. Transferiram-se 200 µL da amostra para um eppendorf de 1,5 mL e foram acrescentados 600 µL de HTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio-Sigma). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi usado no ensaio enzimático. O ensaio enzimático foi feito da seguinte maneira: em um microtubo foram adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 1,2mM em tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4; 100 µL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido- Merck) e 200 µL do sobrenadante das amostras. Esses reagentes foram incubados a temperatura ambiente durante 1 minuto. Após este período, foi adicionado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) a 4 M para paralisar a reação. Transferiram-se 200 µL do produto da reação para a placa de ELISA e foi feita a leitura em espectrofotômetro a 450 nm. A atividade de MPO foi expressa em densidade óptica (OD) / mg de tecido.

#### 4.10 Dosagem da atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A dosagem do NAG é uma técnica utilizada como índice da infiltração dessas células nos sítios inflamatórios (BAILEY, 1988). Após a dosagem da hemoglobina, o sedimento obtido foi pesado e solubilizado em 2,0 mL de solução de NaCl a 0,9% w/v contendo 0,1% v/v de Triton X-100. Procedeu-se à centrifugação a 3000 RPM durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado para o ensaio enzimático.

Para o ensaio enzimático foram adicionados 100 µL do sobrenadante das amostras diluídas 1:5 em tampão citrato/fosfato 0,039 M pH e 4,5 a placa de ELISA. As amostras, foram adicionados

100  $\mu\text{L}$  do substrato (p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina) (Sigma) a 2,24 mM diluído em tampão citrato-fosfato pH 4,5 (200 mL de ácido cítrico a 0,1M; 310 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 0,1M).

O sobrenadante e substrato foram incubados a 37°C durante 60 minutos. Para paralisar a reação foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de tampão glicina pH 10,6 (misturados volumes iguais de glicina a 0,8M; NaCl a 0,8M e NaOH a 0,8M) em cada poço. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor ELISA a 400 nm. Os resultados foram expressos como atividade NAG em densidade óptica (OD)/mg tecido.

#### **4.11 Avaliação da cinética de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-2 e IL-17 produzidas no modelo de implante de esponja**

As dosagens de citocinas no sobrenadante das esponjas dos grupos controles e tratados foram realizadas pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando os kits Th1/Th2/Th17 (IL-6, IL-10, MCP-1, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17).

As amostras foram descongeladas em banho maria à 37°C e centrifugadas por 10 minutos à 14000 RPM. Os padrões foram reconstituídos 15 minutos antes do uso com 2,0 mL de Reagente G (diluyente) sendo, posteriormente, submetidos a uma diluição seriada de  $\frac{1}{2}$  até o limite de 1/250.

As *beads* para cada uma das citocinas são marcadas com intensidades de fluorescências distintas (APC), de modo a serem separadas, graficamente, no momento da aquisição no citômetro de fluxo. Desta forma, as posições das *beads* e as citocinas correspondentes são as seguintes: A1= IL-6, A2= IL-10, A3=MCP1, A4=IFN- $\gamma$ , A5=TNF- $\alpha$ , A6=IL-12. Posteriormente, 15 $\mu\text{L}$  da mistura de Beads foram adicionados a 25 $\mu\text{L}$  dos respectivos padrões (em suas respectivas diluições) e à 25  $\mu\text{L}$  das amostras nos seus respectivos tubos.

Em seguida, em cada tubo foi adicionado 18 $\mu\text{L}$  de Reagente B (reagente de detecção marcado com PE) e os mesmos foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, foram adicionados 500 $\mu\text{L}$  de Reagente F (*Wash Buffer*) em cada tubo e fez-se uma centrifugação à 1300 RPM por 7 minutos. Numa última etapa, o sobrenadante de cada tubo foi aspirado e as amostras foram ressuspensas em 100 $\mu\text{L}$  de Reagente F para as aquisições em citômetro de fluxo, BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram analisados utilizando o software *BD CBA Analysis* e os gráficos obtidos através do software GraphPad Prism 5.0

## 4.12 Avaliação da toxicidade renal e Hepática

### 4.12.1 Análises bioquímicas de enzimas hepáticas e renais

Após a realização da eutanásia dos animais, conforme descrito no item (4.2), o sangue foi retirado por punção cardíaca e posteriormente processado em centrífuga para microtubo a 164 x g durante 15 min para obtenção do soro. Após essa etapa o material foi congelado a -80°C para futuras análises bioquímicas.

Os reagentes utilizados foram cedidos pela **Bioclin – Quibasa**, através do programa “Bioclin nos Laboratórios Científicos”. Foram realizados os seguintes ensaios: testes de função renal: ureia e creatinina; e função hepática: aspartato cetoglutarato aminotransferase (TGO) e alanina cetoglutarato aminotransferase (TGP) e função cardíaca: aspartato cetoglutarato aminotransferase (TGO) e creatinoquinase isoenzima MB (CK-MB).

As amostras foram processadas no analisador automático Metrolab 2300 – Wiener (*FullyAutomaticRandom Access Clinical Analyzer*) devidamente ajustado com os calibradores e controles específicos para os kits diagnósticos Bioclin-Quibasa (Controle Normal – Biocontrol N K073 – Bioclin; Controle Patológico Biocontrol P K074 – Bioclin; Calibrador – Biocal K072 – Bioclin).

### 4.12.2 Análises histológicas de Fígado e Rins

Após o procedimento de eutanásia e coleta de sangue e retirada das esponjas, fez-se a coleta dos rins e do fígado. Os órgãos assim obtidos foram fixados em formol tamponado 10% por um período de 48h. Fragmentos desses tecidos medindo 1cm<sup>2</sup> foram processados rotineiramente por meio do processador automático de tecidos LUPETEC<sup>®</sup> MODELO PT05.

Após o processamento, os órgãos foram incluídos em parafina à 60°C e submetidos à microtomia em cortes de 4µm e corados com hematoxilina-eosina (HE). Os cortes corados, assim

obtidos, foram fixados entre lâmina e lamínula para que finalmente pudessem ser analisados. Conforme testes de coloração anteriormente realizados, adotaram-se como período de imersão em cada um dos corantes o tempo para coloração de hematoxilina/eosina para o fígado 60/40s e 50/50s para os rins.

As imagens foram digitalizadas no Laboratório de Multiusuários NUPEB/UFOP com o auxílio do microscópio óptico de captura Leica® DM5000 através do software *Leica Application Suite* (versão 2.4.1).

#### **4.13 Avaliação da mielosupressão desencadeada pelo MTX**

Após a realização da eutanásia dos animais, conforme descrito no item (4.2), o sangue foi retirado por punção cardíaca e posteriormente transferido para tubos BD vacutainer® contendo anticoagulante EDTA. As amostras foram então homogeneizadas e submetidas ao analisador automático MICROS 60 Horiba® para contagem do diferencial de leucócitos. Para confirmação da contagem de leucócitos e avaliação dos demais perfis hematológicos como desvio à esquerda, foram confeccionadas lâminas com esfregaço sanguíneo e feita a leitura em aumento de 40X em microscópio óptico Olympus BX50.

#### **4.14 Análises estatísticas**

Para estabelecer o número de animais por grupo de tratamento foram conduzidas análises estatísticas para determinação do tamanho da amostra, a um nível de significância de  $p < 0,05$ .

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. A comparação entre os dois grupos foi feita utilizando-se os testes: ANOVA e Teste t de Student. Todos os resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$  utilizando-se o programa GraphPadPrism 5.0.

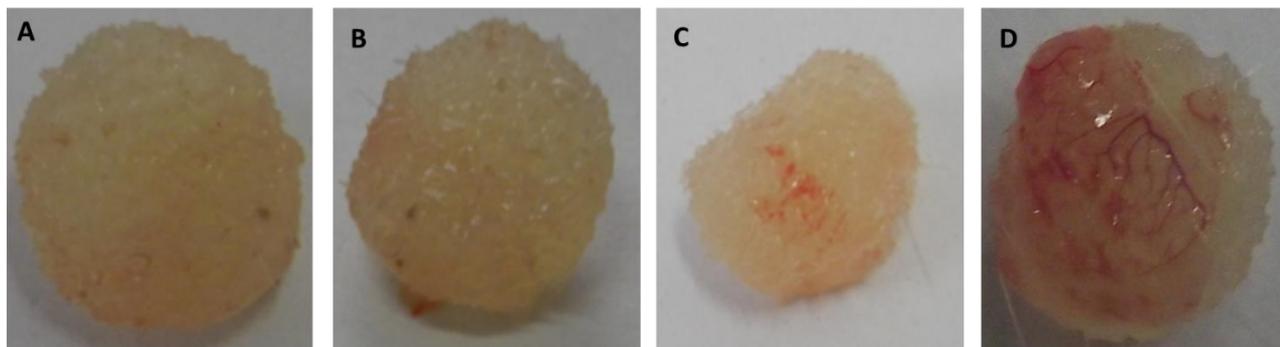
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo propôs-se avaliar a eficácia do sistema de liberação controlada a base de poli( $\epsilon$ -caprolactona) incorporado de MTX e sua ação sobre a cinética inflamatória.

É sabido que implantes de matrizes poliméricas de esponjas de poliéster-poliuretano são capazes de induzir a migração e a proliferação celular de forma local e temporal. Esse modelo de implante também permite analisar uma gama de mediadores químicos da inflamação, fatores de crescimento bem como o perfil e a dinâmica da migração celular com posterior reparo tecidual no interior da matriz esponjosa (FERREIRA *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2009). Desta forma, o modelo experimental murino de inflamação e angiogênese mostrou-se compatível com os objetivos propostos neste trabalho tendo sido capaz de elucidar importantes aspectos da cinética de liberação do sistema polimérico PCL- MTX e seus efeitos na resposta inflamatória.

Trabalhos recentes de PEREIRA *et al.*, 2013 têm demonstrado que o sistema polimérico de PCL possibilitou a liberação de quantidades do fármaco de forma controlada e sustentada tendo sido capaz de promover uma redução significativa das células tumorais em ensaios *in vitro*. Também Puga *et al.*, (2011) avaliando a liberação controlada *in vitro* de ciprofoxacino através das matrizes poliméricas de PCL associados com poloxamina, obtiveram resultados satisfatórios em cultivos com *Staphylococcus aureus*. Porém, embora vários estudos demonstrem a eficácia deste tipo de sistema de liberação, não encontramos na literatura trabalhos que correlacionassem a ação *in vivo* desse modelo de dispensação de fármaco.

A implantação de matrizes sintéticas induz uma reação inflamatória, do tipo corpo estranho, com conseqüente formação de tecido de granulação rico em novos vasos sanguíneos, representando um microambiente apropriado para o estudo da angiogênese inflamatória (ANDRADE *et al.*, 1987; MENDES *et al.*, 2009). Nossos resultados demonstraram que as matrizes esponjosas inseridas na região dorsal do tecido subcutâneo dos animais foram bem toleradas. Essa característica foi comprovada pela ausência de sinais de infecção e/ou rejeição durante todo período do experimento. Além disso, a quantidade de tecido de granulação rico em vasos sanguíneos aderido aos implantes foi gradativamente maior e proporcional ao período de permanência da esponja no tecido subcutâneo do animal (FIGURA 7).



**Figura 7: Cinética da deposição de matriz extra celular e neoformação vascular nos implantes de esponja ao longo do experimento.** As alterações vasculares mais expressivas ocorreram no oitavo dia de implantação. (A) esponja 4 dias pós-implante; (B) esponja 5 dias pós-implante (C) esponja 6 dias pós-implante e (D) esponja 8 dias pós-implante.

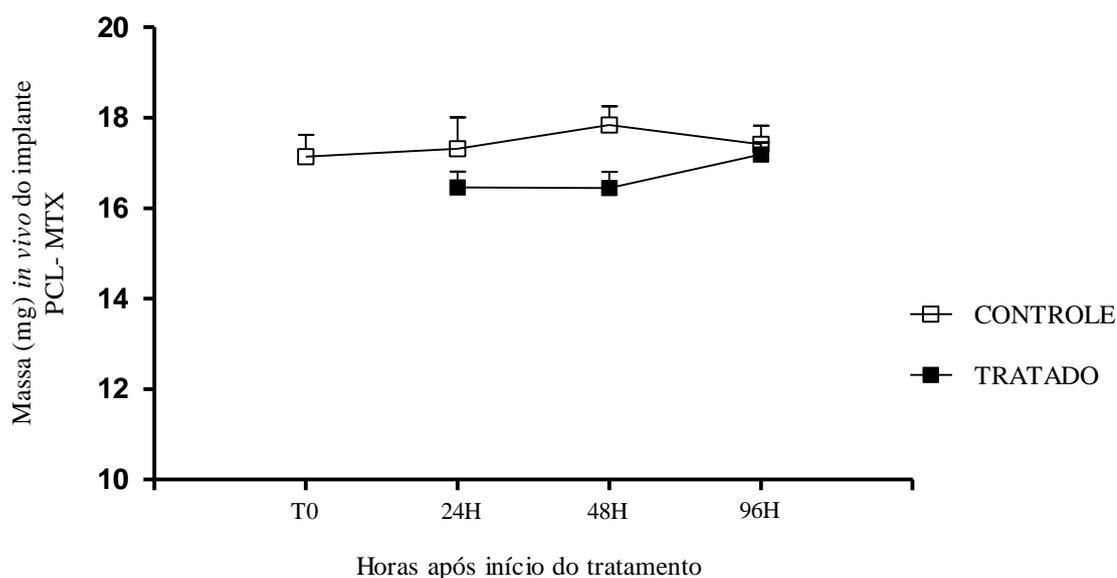
### **5.1 Estudo da estabilidade dos polímeros de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e ensaios de liberação do metotrexato *in vivo***

Com o objetivo de avaliar a estabilidade da matriz de PCL *in vivo* e, conseqüentemente, os efeitos de uma possível degradação da estrutura frente a liberação do fármaco, foi feita uma avaliação da variação de massa do sistema de PCL após sua implantação e retirada nos animais.

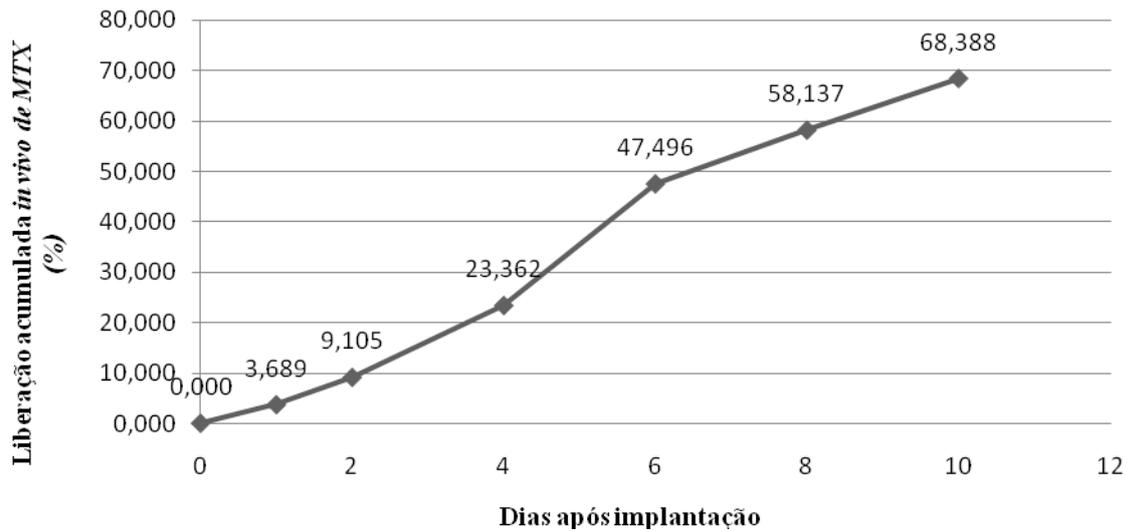
Nossos resultados não evidenciaram sinais de degradação ou qualquer outro tipo de alteração significativa, tendo os polímeros mantidos sua massa inicial constante ao longo de todo tempo experimental (0, 24, 48 e 96 horas de implantação). Estudos anteriores de estabilidade realizados por BERGSMA, (1995) e PEREIRA, (2013) evidenciaram que o início dos processos de biodegradação ocorre no período de dois anos dentro do organismo (GRAF.1). Apesar de nossos ensaios terem sido realizados em tempos diferentes aos realizados por esses autores, eles demonstraram que apesar da intensa fagocitose ocorrida no interior da matriz esponjosa e tecidos adjacentes induzida pela presença dos implantes de esponja, o processo inflamatório não interferiu na estrutura do polímero.

Após verificada a estabilidade do sistema de PCL, estes foram submetidos a um estudo *in vivo* para análise da cinética de liberação do MTX. Os ensaios foram realizados nos tempos de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inserção dos sistemas poliméricos. O conteúdo de MTX remanescente nos implantes removidos foi determinado por meio de ensaios colorimétricos da medida da absorvância da solução à 307 nm (GRAF.2).

As análises demonstraram que as matrizes de PCL contendo MTX apresentaram uma liberação sustentada da droga no tecido subcutâneo dos animais ao longo de 10 dias do período experimental. Aproximadamente, 69 % da droga foi lixiviada por difusão através da matriz polimérica do implante de maneira controlada e sustentada (GRAF.1). No entanto, nossos resultados de ensaios de liberação *in vivo* divergiram dos resultados *in vitro* obtidos por PEREIRA, *et al* (2013). Enquanto naqueles, nos dez primeiros dias, quase 70% da droga já havia sido liberada, neste cerca de 30% do fármaco havia sido lixiviado para o solvente no mesmo período. Provavelmente, as diferenças entre o ambiente fisiológico (teste *in vivo*) e meio simulado (teste *in vitro*) explique a falta de correlação para o perfil de liberação de MTX encontrado em cada experimento (PINTO *et al*, 2011).



**Gráfico 1: Massa dos implantes poliméricos (PCL) *In vivo*.** Implantes removidos na região subcutânea de camundongos após 0, 24, 48 e 96 horas de implantação. Os resultados representam média e desvio padrão grupos de 6-8 animais para cada ponto. As comparações entre os grupos foram feitas por teste t de Student com ( $p < 0.05$ ). Nossos resultados não demonstraram diferença entre grupo controle e grupo tratado.



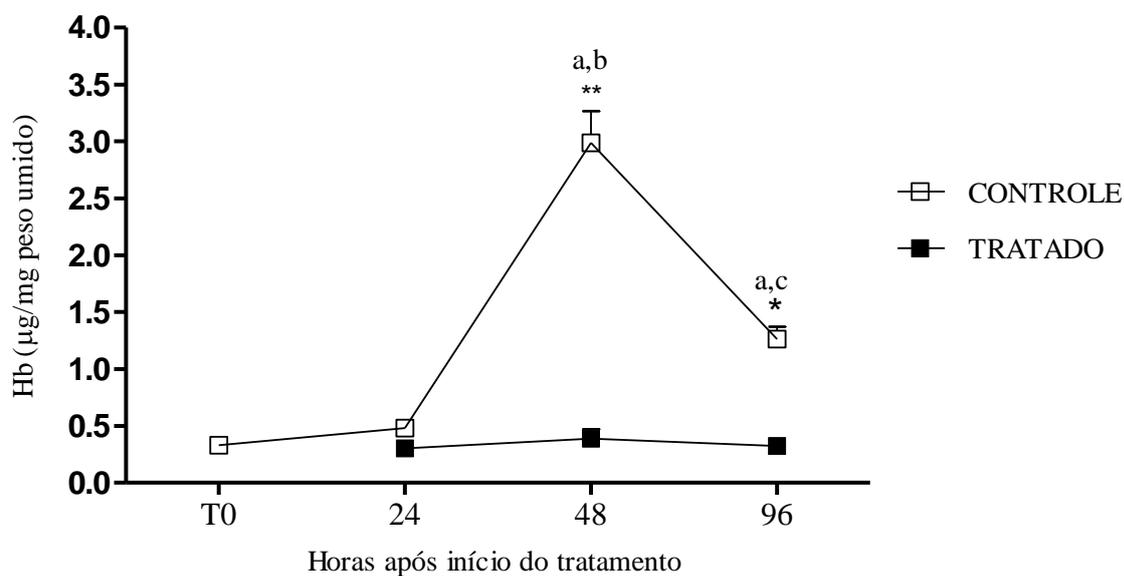
**Gráfico 2. Liberação acumulada de MTX (%) *in vivo*.** O ensaio de liberação *in vivo* do metotrexato a partir dos sistemas poliméricos realizado nos tempos de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inserção dos implantes na região subcutânea de camundongos Balb/c. Os resultados representam média de 5-6 animais por ponto.

## 5.2 Avaliação da angiogênese induzida por implantes de esponjas.

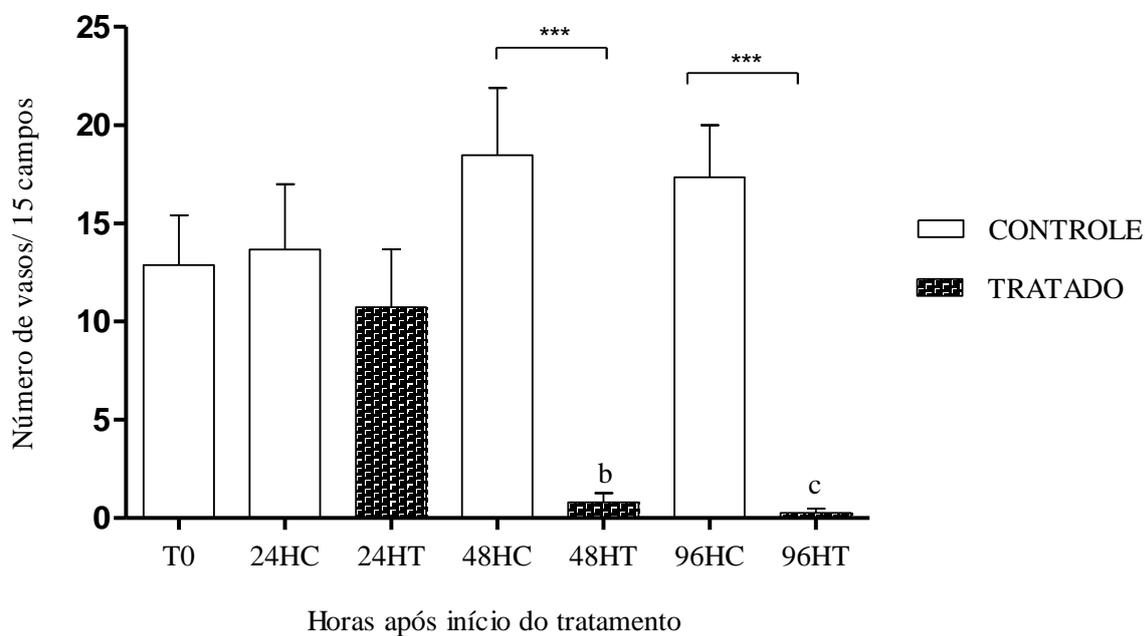
A fim de se verificar o efeito do sistema PCL/MTX na proliferação vascular, avaliou-se o conteúdo de hemoglobina (Hb) das esponjas implantadas como um índice indireto da formação de novos vasos sanguíneos (gráfico 3A). Como índice direto, realizou-se a contagem do número de vasos presentes na matriz esponjosa por meio da análise morfométrica (gráfico 3B). Dessa forma tais análises foram utilizadas para se estabelecer uma correlação do índice de neovascularização nessas matrizes poliméricas (PASSANITI *et al.* 1992; HU *et al.*, 1995. MENDES *et al.*, 2009).

Nossos dados evidenciaram que o sistema PCL-MTX na dose de 2 mg foi capaz de promover uma redução de, aproximadamente 85% dos níveis de HB no grupo tratado em relação ao grupo controle nos tempos de 48 e 96 horas pós-implante (GRAF.3A). Essa diferença também foi evidenciada pela análise morfométrica dos implantes que mostrou um número de vasos significativamente menor, cerca de 90%, no grupo tratado em comparação ao grupo controle também para os tempos de 48 e 96 horas (GRAF.3B). Nossos achados estão de acordo com os resultados obtidos por ARROYO *et al.*, 2010 que também avaliaram a neoformação vascular e a deposição de matriz extra celular frente aos mecanismos biológicos indutores da inflamação presentes na artrite reumatóide e na arterosclerose.

(A)



(B)



### Gráficos 3 – Determinação de HB nos implantes (3A) e contagem do número de vasos (3B).

Os valores representados são as médias e desvio padrão ( $\pm$ SEM) de grupos de 8-10 animais de cada ponto. Os resultados foram analisados pelo Teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ). (\*) indica diferença entre grupos tratados e controle submetidos a um mesmo período de tratamento; (a) indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo zero; (b) indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo de 24 horas controle; (c) indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo de 48 horas controle;

#### 5.4 Avaliação do infiltrado inflamatório nos implantes de esponja

A implantação de matrizes sintéticas induz uma reação inflamatória, do tipo corpo estranho, com conseqüente formação de tecido de granulação rico em novos vasos sanguíneos, representando um microambiente apropriado para o estudo da angiogênese inflamatória (ANDRADE *et al*, 1987; MENDES *et al*, 2009).

Neste trabalho a análise do infiltrado inflamatório presente no tecido fibrovascular produzido no interior das esponjas, foi realizada por meio de ensaios que correlacionaram a atividade enzimática com número destas células no local da lesão, sendo esse parâmetro amplamente aceito como um dos marcadores indiretos do processo inflamatório (KOBBE *et al*, 2012). A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) presente em grânulos azurófilos de neutrófilos pode ser utilizada como um método indireto para analisar a presença de neutrófilos no foco inflamatório (ARAÚJO *et al*, 2011; MOURA *et al*, 2011).

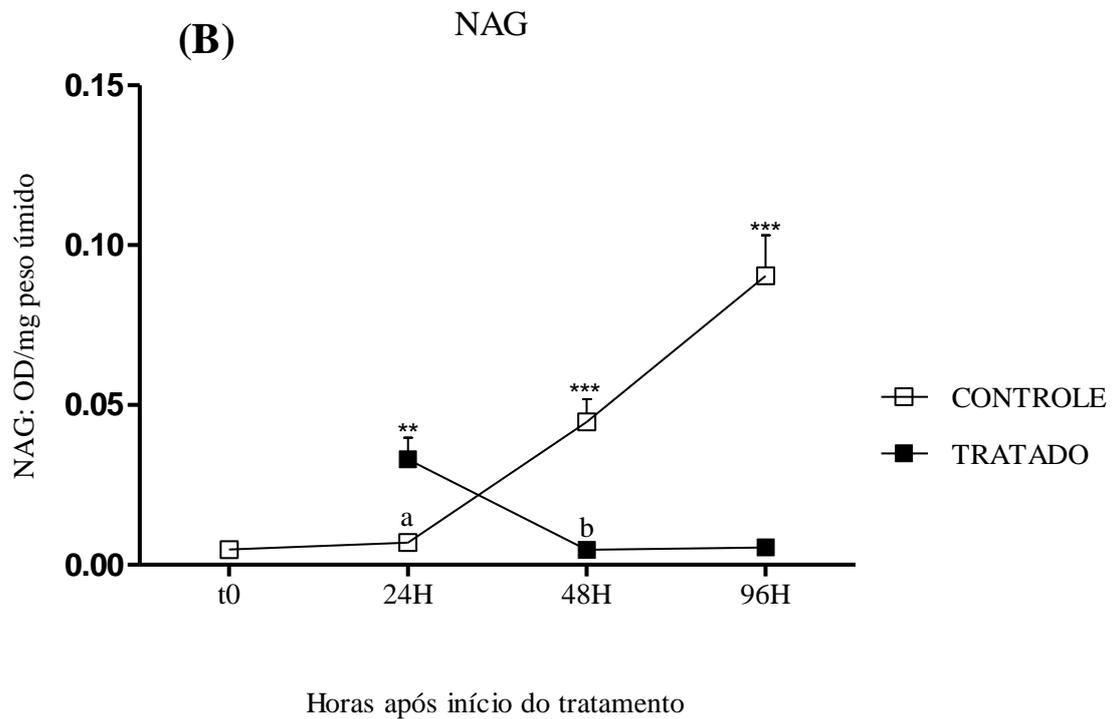
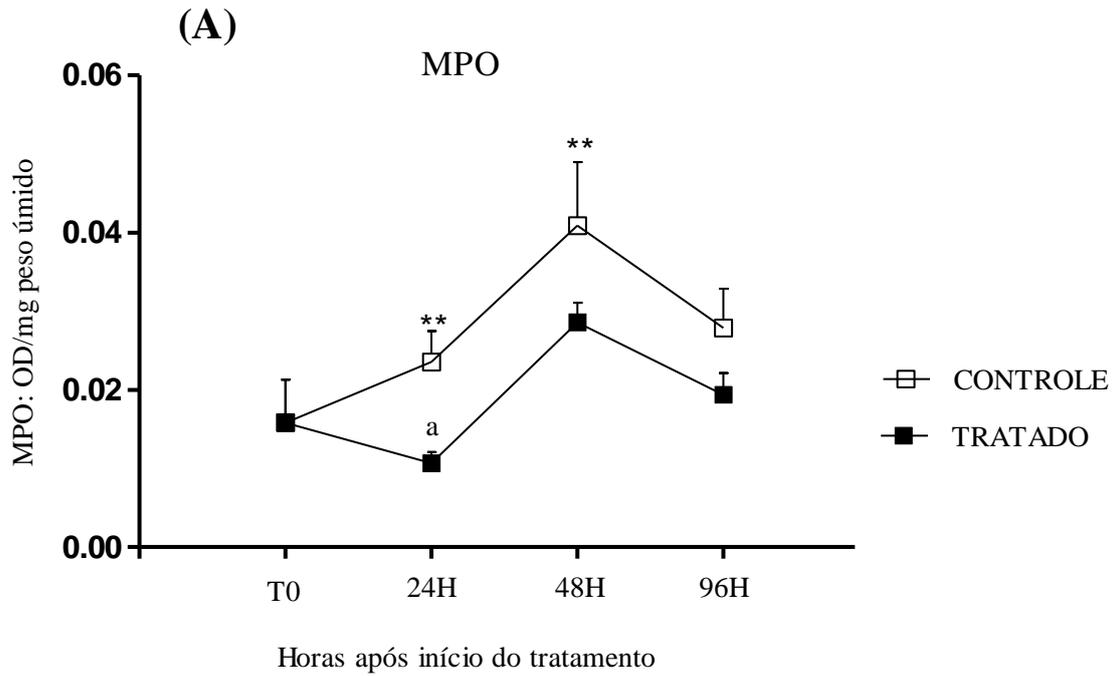
Uma segunda classe de enzimas, a acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) presente em macrófagos ativadas pode ter sua atividade avaliada e os resultados obtidos correlacionados com o número de macrófagos no local da inflamação. Essas técnicas utilizadas em nosso trabalho foram importantes para analisar o efeito local do MTX liberado dos implantes poliméricos de PCL e demonstraram que a presença da esponja induziu a formação, em ambos os grupos, de um estroma fibrovascular com massa e infiltrado celular que diferiu significativamente em intensidade e quantidade.

Nossos resultados evidenciaram diferenças estatísticas na quantidade de neutrófilos (medido pelo ensaio do MPO) entre os grupos tratado e controle nos tempos de 24 e 48 horas pós-implantes, indicando a ação predominante deste tipo celular na fase aguda da inflamação. Este perfil confirma o padrão do processo inflamatório observado em diversos estudos experimentais *in vivo* que constataram que os primeiros tipos celulares a chegar ao tecido lesionado são os neutrófilos (TIDBALL, 2005) (GRAF.4A).

Já o recrutamento de macrófagos (avaliado pelo ensaio de NAG) sofreu significativa alteração em decorrência da ação do MTX (GRAF.4B). Após 24 horas de tratamento, a dosagem dessa enzima indicou que a ativação dessa população celular foi reduzida no grupo tratado de forma crescente após 48 e 96 horas de tratamento. Estudos realizados por nosso grupo evidenciaram que a modulação sobre essas células de defesa ocorre não de forma sistêmica como mencionado por XAVIER (2010), mas sim local, provavelmente desencadeada por meio da ação de citocinas pró-

inflamatórias presentes no local. O sistema polimérico avaliado foi capaz de promover a liberação de MTX em doses terapêuticas de forma seletiva e sustentada no foco inflamatório (GRÁFICO.4B).

Nossos resultados estão de acordo com os de MOURA *et al*, 2011 que avaliou o efeito do extrato aquoso de propolis na resposta inflamatória utilizando o mesmo modelo experimental. Esses achados evidenciaram dois aspectos importantes relacionados ao uso deste tipo de modelo experimental: a) sua capacidade de gerar um ambiente propício para avaliar diferentes compostos com propriedades anti-inflamatória e anti-angiogênica; b) a aplicabilidade deste modelo em avaliar diferentes sistemas de liberação controlada de fármaco em um ambiente compartimentalizado *in vivo* (GRÁFICO.4)



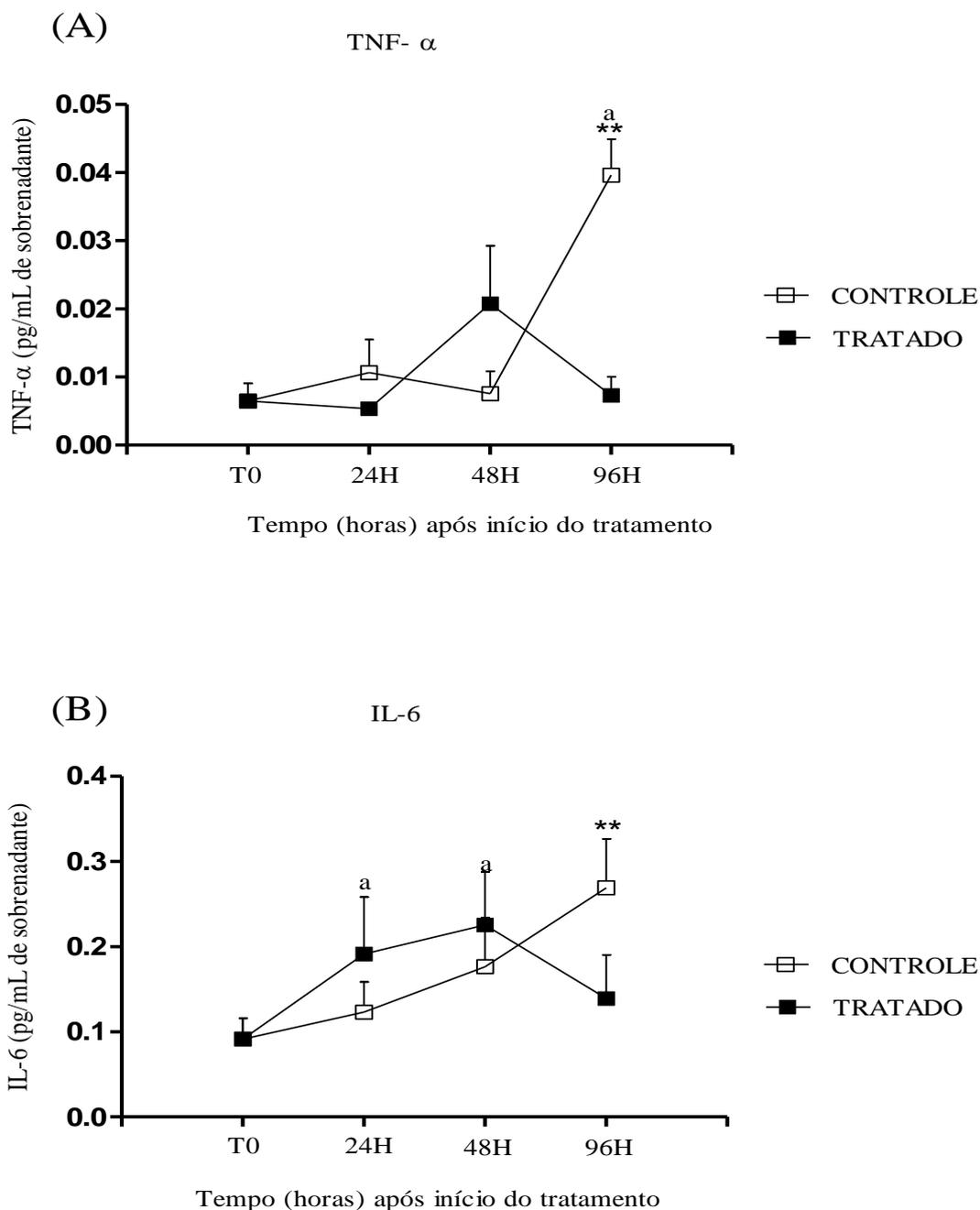
**Gráfico 4: Cinética do influxo de células inflamatórias em implantes de esponjas de camundongos. Atividade de MPO (4-A) e atividade da NAG (4-B) em tempos pré-determinados.** Os valores representados são as médias e desvio padrão ( $\pm$ SEM) de grupos de 8-10 animais de cada ponto. (\*) indica diferença entre grupos tratados e controle submetidos a um mesmo período de tratamento; (a) indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo zero; (b) indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo controle de 24 horas; (c) indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo controle de 48 horas; Teste  $t$  de Student ( $p < 0,05$ ).

### **5.5 Avaliação do perfil de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-2 e IL-17 produzidas no modelo de implante de esponja.**

A modulação do processo inflamatório é influenciada por proteínas sinalizadoras genericamente denominadas de citocinas. Essas moléculas, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ , por exemplo, atuam por meio da ativação de células endoteliais e fibroblastos, induzindo a angiogênese, ativação e recrutamento de neutrófilos e macrófagos fazendo com que essas células migrem em direção ao foco da lesão e atuem no sentido de eliminar o agente agressor (FERREIRA *et al.*, 2012; KOH & DIPIETRO, 2011). O TNF- $\alpha$ , especificamente, também pode induzir a angiogênese, ao estimular a produção de mRNA, de IL-8, do fator de crescimento endotelial vascular (VEFG) e do fator de crescimento fibroblástico (FGF) em células endoteliais (BANNO *et al.*, 2004; CHAKRAVARTY *et al.*, 2011). Sendo assim, tais mediadores inflamatórios tornam-se importantes na avaliação do perfil e da cinética inflamatória em diferentes contextos.

Nossos resultados demonstraram que os níveis TNF- $\alpha$  e IL-6 (citocinas pró- inflamatória) no sobrenadante da esponjas não diferiram nos tempos de 24 e 48 horas. Entretanto, no tempo de 96h houve redução significativa dos níveis destas citocinas no grupo tratado quando comparado ao grupo controle (GRAF. 5A e B). A redução dos níveis desta citocina refletiu diretamente numa menor deposição de colágeno, migração de células inflamatórias e neoformação vascular, confirmando a importância dessas moléculas na modulação desses eventos biológicos. Além disso, a dosagem dessas citocinas foi importante para demonstrar atividade anti-inflamatória e anti-angiogênica do composto MTX associado ao sistema PCL de liberação controlada (GRAF. 5A e 5B). Os dados obtidos estão de acordo com os trabalhos realizados por VAN EDE (1998) que avaliou a ação do MTX sobre a inibição da produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 na artrite reumatoide e demonstrou a capacidade da droga em modular as concentrações plasmáticas destes compostos ao longo do tratamento.

Para as demais citocinas supracitadas no título, não foram detectados níveis significativos em nenhum dos tempos avaliados pelo método de análise utilizado.



**Gráfico 5: Análise do perfil de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 em implantes de esponja.**

Dosagem de citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  (5A) e IL-6 (5B) pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA). As análises foram realizadas em sobrenadante de esponja previamente implantadas na região dorsal de camundongos Balb/c e retiradas em diferentes tempos (24, 48 e 96 horas) após início do tratamento. Os valores representados são as médias e desvio padrão ( $\pm$ SEM) de grupos de 8-10 animais de cada ponto. (\*) indica diferença entre grupos tratados e controle submetidos a um mesmo período de tratamento; (a) indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo zero; (b); Teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ).

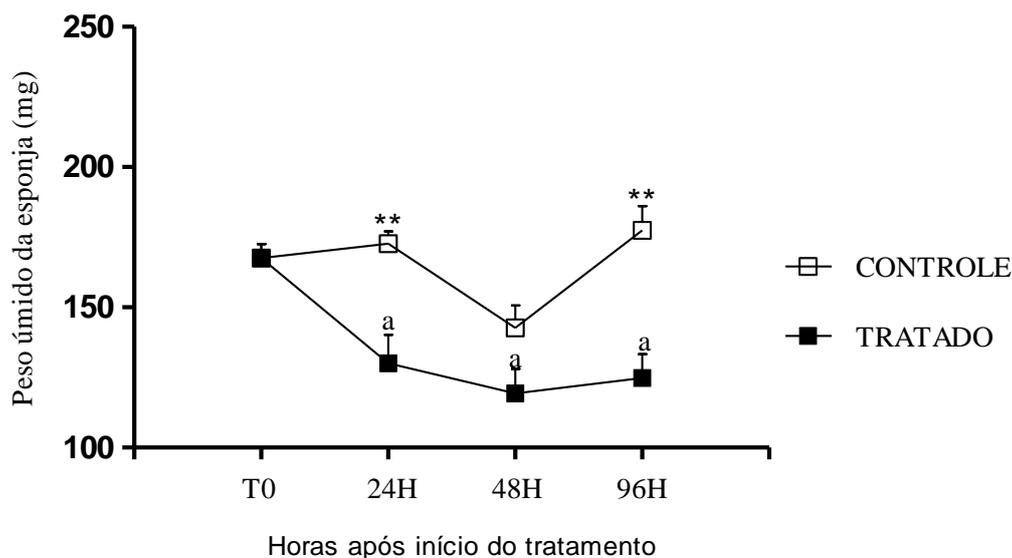
## 5.6 Avaliação dos componentes fibrovasculares nos implantes de esponja

A técnica de implantação de disco de esponja induz a formação de um estroma fibrovascular que ocupa os poros da matriz esponjosa, preenchendo os implantes com células inflamatórias, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas (MOURA, 2011). Nesse sentido, o grau de deposição de colágeno após a lesão determina o resultado do equilíbrio reparo/regeneração dos tecidos lesionados (JORGENSEN, 2003).

Neste trabalho, o edema, a infiltração celular e a deposição de matriz extracelular nos implantes foram avaliados quantitativamente a partir do peso úmido das esponjas e da análise quantitativa do conteúdo de colágeno presente nos implantes.

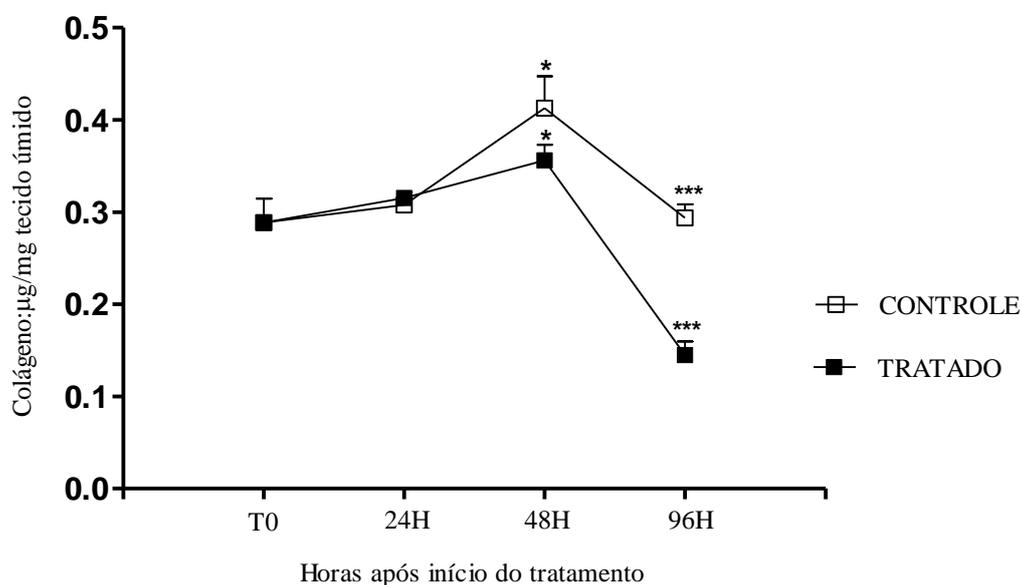
Nossos resultados demonstraram que o peso úmido dos implantes dos animais do grupo controle apresentou uma massa significativamente maior que o grupo tratado em todos os tempos do experimento, sendo este parâmetro mais acentuado no período de 96 horas após o início do tratamento. No tempo de 24 horas (GRAF.6) foi observada uma diferença significativa da massa dos implantes do grupo controle e tratado porém, essa discrepância não foi observada para o mesmo intervalo de tempo quanto a deposição de colágeno (GRAF.7). Essa aparente incoerência é explicada pelo fato de que a variação do peso das esponjas nos grupos controles e tratados no tempo de 24 horas não é decorrente do aumento da síntese de colágeno, mas sim em função dos eventos vasculares exsudativos dos capilares adjacentes a esponja. Esse achado, justifica a diferença do peso úmido do grupo controle quando comparado ao grupo tratado, demonstrando que nestes, a resposta inflamatória foi mais acentuada.

Já a cinética da deposição de colágeno foi feita por meio de dosagens do sobrenadante das esponjas, após maceração, através de técnica colorimétrica com picrossírius red. Os resultados demonstraram redução significativa na deposição desta proteína para os grupos tratados em relação ao grupo controle nos tempos de 48 e 96 horas (GRAF.7). No entanto, embora o sistema tenha liberado quantidades suficientes de MTX capazes de suprimir importantes componentes do tecido fibrovascular em períodos maiores de tratamento, a deposição de colágeno no tempo de 24 horas não foi afetada pelo fármaco.



**Gráfico 6: peso úmido das esponjas após a implantação.**

Análise da variação dos pesos úmidos das esponjas nos grupos tratado e controle após 24, 48 e 96 horas de tratamento com grupos de 6-8 animais em cada tempo. No grupo controle o peso dos implantes apresentou-se significativamente maior nos tempos de 24 e 96 horas após início do tratamento. (\*\*) indica diferença entre grupos tratados e controle submetidos a um mesmo período de tratamento; (a) indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo zero; Os valores representados são a média  $\pm$  e.p.m para cada ponto. ANOVA ( $P < 0,05$ ).



**Gráfico 7 : Cinética da deposição de colágeno total nos implantes de esponja .**

Análise da variação do colágeno no sobrenadante pelo método de reação do *picrosirius red*. Os níveis de colágeno nos grupos tratados apresentaram significativa redução em relação ao controle nos tempos de 48 e 96 horas de tratamento. Os valores representados são média ( $\pm$  SEM) de grupos de 6-9 animais para cada ponto. (\*) indica diferença entre grupos tratados e controle submetidos a um mesmo período de tratamento; Teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ).

Teste *t* de Student. ( $P < 0,05$ ).

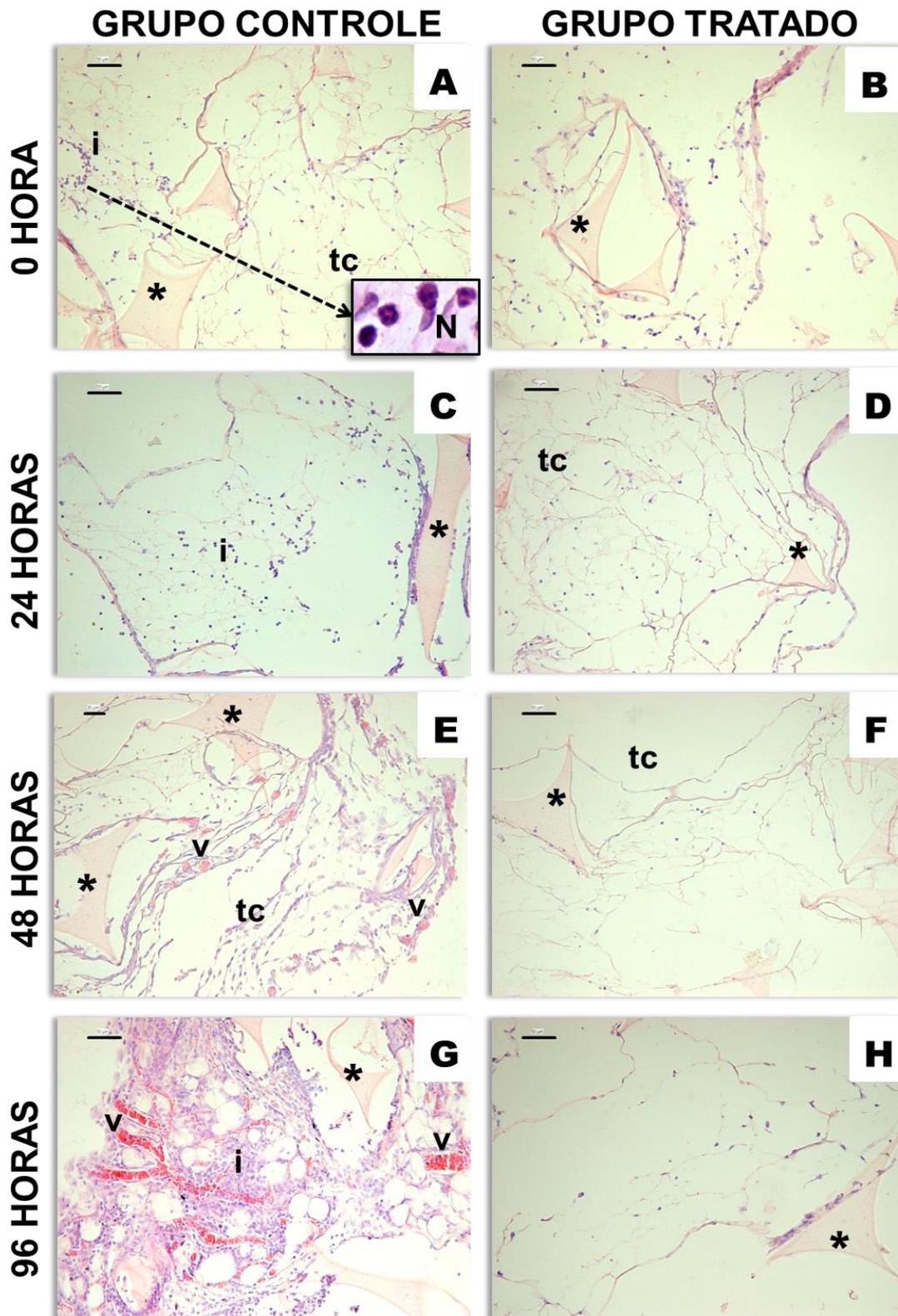
### 5.7 Avaliação histológica da angiogênese inflamatória

A análise histológica das esponjas utilizando como técnica de coloração (HE), nos permitiu caracterizar o perfil das células infiltradas, a dinâmica angiogênica e a deposição de tecido fibrovascular no implante, o que nos permitiu analisar a cinética da inflamação ao longo dos tempos estudados (24h, 48h e 96 horas após o implante de PCL-MTX)

As alterações histológicas durante o desenvolvimento do tecido fibrovascular são ilustradas na (FIGURA 8).

No tempo de 24h (5 dias pós-implante de esponja) os implantes do grupo controle mostraram um acúmulo de células inflamatórias maior em comparação com o grupo tratado. O perfil celular era predominantemente de neutrófilos, com escassos macrófagos e fibroblastos. Nos tempos de 48h e 96h (6 e 8 dias pós-implante de esponja), as esponjas apresentavam-se mais vascularizadas e continham muito mais células inflamatórias, células gigantes multinucleadas e fibroblastos no tecido de granulação quando comparadas as esponjas do grupo tratado com PCL-MTX. Diferentemente do grupo controle, o perfil inflamatório-angiogênico foi decrescente ao longo do tempo estudado (FIGURA 8).

A interpretação desses dados, associada aos resultados das dosagens enzimáticas e a de citocinas, sugerem que a quantidade de MTX liberada pelas matrizes poliméricas de PCL agiu de forma eficaz em aspectos importantes da neoformação vascular e da resposta inflamatória local.



**FIGURA 8** Cortes histológicos representativos (4  $\mu$ m, corados com HE) de implantes de esponjas (24, 48 e 96 horas pós implantação). ): Figuras A, C, E e G representam os grupos controles nos tempos de 0, 24, 48 e 96 horas após implante da matriz de PCL puro; Figuras B, D, F e H representam os grupos tratados com metotrexato nos tempos de 0, 24, 48 e 96 horas após implante da matriz de PCL-MTX; V = vaso sanguíneo, TC= tecido conjuntivo; I= infiltrado inflamatório; \*= esponja; N= neutrófilo; O inserto de neutrófilo na figura A é um zoom do aumento de 40X. Barra = 50  $\mu$ m.

## 5.8 Avaliação das funções hepáticas e renais

A análise das funções hepática e renal constituem uma importante mecanismo para avaliar a toxicidade de uma série de fármacos utilizados na terapêutica. O princípio deste monitoramento consiste na avaliação das alterações séricas, decorrentes do uso dessas substâncias ativas e de uma série de enzimas relacionadas com esses órgãos. No caso do fígado, por exemplo, são avaliadas bilirrubinas, proteínas, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase e aminotransferases. Já em relação aos rins, são usados marcadores como ureia e creatinina (MELO *et al*, 2009).

Estudos anteriores têm relatado um elevado número de efeitos adversos em humanos decorrentes do uso prolongado do MTX com doses usuais e semanais que variam de 7,5 a 25 mg por semana. Esses efeitos adversos acometem órgãos importantes como o fígado e estão relacionados com alterações das concentrações enzimáticas séricas deste órgão até alterações estruturais como a cirrose.

Os rins também podem ser acometidos com o uso deste fármaco. Um estudo em pacientes com artrite reumatóide ao longo de seis meses, com doses semanais de 7,5 mg mostrou uma diminuição da clearance de creatinina em 8,6 ml/min e uma diminuição da clearance de MTX de 23,8 ml/min (VAN EDE, 1998; NEVES, 2009).

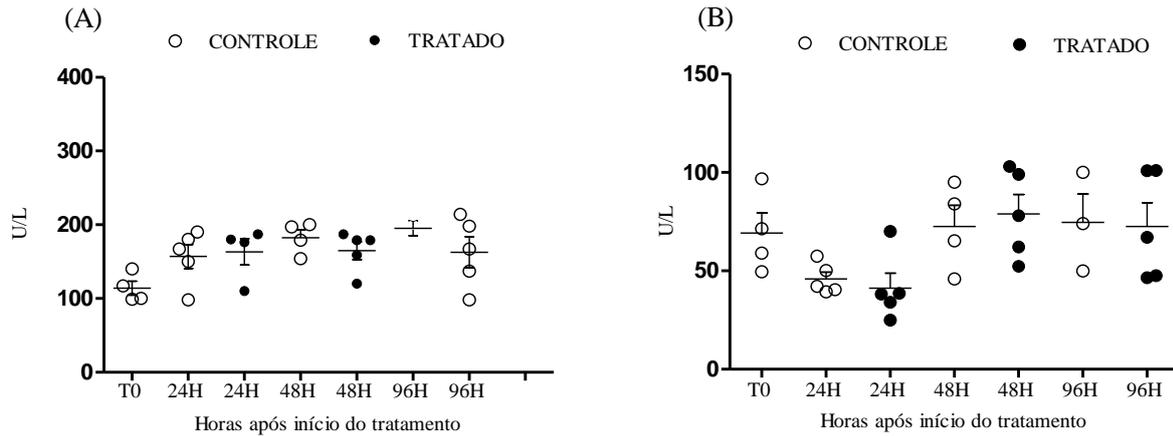
De acordo com a abordagem supra citada, a função hepática pode ser avaliada pela concentração sérica de bilirrubinas, albumina plasmática, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase e aminotransferases. Com base nestas evidências, propomos avaliar o impacto do sistema PCL-MTX na dose de 2mg no fígado e nos rins. Em função do pequeno volume de material biológico obtido para análise (200µL), a avaliação hepática foi realizada através da quantificação dos níveis séricos das transaminases (TGO, TGP). Para a análise dos resultados obtidos, foram adotadas como referência os seguintes valores das concentrações séricas de TGO e TGP:  $125,6 \pm 47,10$ U/L e  $110,8 \pm 30,5$ U/L, respectivamente (TRINDADE *et al*, 2012). Nossos resultados demonstraram que em ambos os grupos (grupo tratado e grupo controle) em todos os dos tempos avaliados os marcadores hepáticos (TGO, TGP) não indicaram qualquer alteração.

Uma outra condição agravante do uso prolongado do MTX está relacionado a sua nefrotoxicidade. Doses elevadas deste fármaco pode levar a precipitação da sua forma inalterada e/ou de seus metabólitos no glomérulo e desencadear uma lesão tubular grave que, por sua vez gerará uma condição de insuficiência renal aguda. Isso explica a necessidade de testes de avaliação periódica da função renal em pacientes que fazem uso desta substância por tempo prolongado

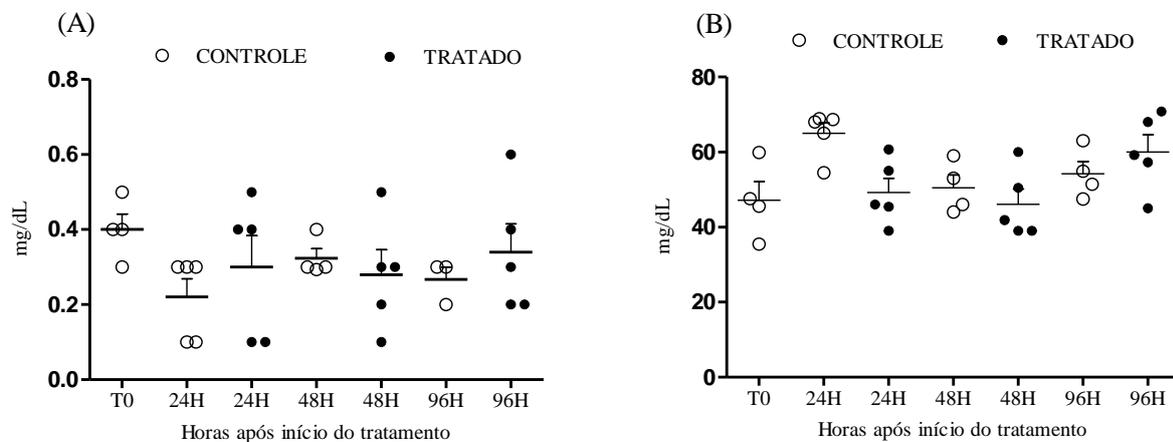
(HOCHBERG *et al*, 2003). Um importante marcador de avaliação renal é a ureia. Este composto é derivado do catabolismo de aminoácidos e proteínas geradas no fígado e é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo, principalmente pela urina, sendo, portanto, também utilizada para monitorar as funções dos rins (Burtis *et al*, 2008). Em camundongos BALB/c, este produto apresenta-se em valores aproximados de  $45,1 \pm 8,6$  mg/dL (TRINDADE *et al*, 2012).

Outro importante marcador da função renal, a creatinina, é excretada na urina dos animais e sua concentração sérica, em camundongos BALB/c, apresenta valores aproximados de  $0,45 \pm 0,07$  mg/dL (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009). Qualquer alteração nos níveis dessa substância indica lesão glomerular grave.

Nossos resultados não demonstraram alterações dos marcadores renais em nenhum dos tempos analisados, utilizando – se de a dose de MTX de 2 mg/ animal (GRAF.9A). Embora essa quantidade de fármaco administrada seja infinitamente grande e suficientemente capaz de desencadear inúmeros danos a um animal com peso em torno de 30 gramas, a ausência de danos nesses órgãos demonstra a capacidade do sistema de PCL de promover uma liberação controlada e sustentada do fármaco (GRAF.8) e (GRAF.9B).



**Gráfico 8: Avaliação bioquímica da função hepática de camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com MTX na dosagem de 2 mg por animal.** Concentração sérica de (TGO) - asparto cetoglutarato aminotransferases(8A) e (TGP) – alanina cetoglutarato aminotransferases (8B). Os resultados estão representados média ( $\pm$  SEM) de grupos de 6-9 animais para cada ponto. Teste *t* de Student ( $p < 0.05$ ). Não houveram diferenças estatísticas observáveis entre os grupos avaliados.



**Gráfico 9: Avaliação bioquímica da função renal de camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com MTX.** Concentração sérica de creatinina (9A) e ureia (9B) nos diferentes órgãos dada por mg/dL. Os resultados representam média ( $\pm$  SEM) de grupos de 3-6 animais para cada tempo. Teste *t* de Student ( $p < 0.05$ ). Não houveram diferenças estatísticas observáveis entre os grupos avaliados

### 5.8.1 Achados histológicos hepáticos renais

O fígado é responsável pela concentração e metabolização da maioria das drogas e toxinas. É exatamente por esse motivo que algumas substâncias podem gerar hepatotoxicidade. Além dos hepatócitos, ductos e canalículos biliares, o endotélio vascular e as células estreladas podem ser afetados. A hepatotoxicidade relacionada às drogas é um evento comum. Está presente em mais de 10% das reações adversas aos medicamentos (MELO *et al*, 2009). A lesão hepática induzida por drogas é responsável por 30% dos casos de hepatite aguda e por mais de 50% dos de icterícias agudas. A classificação da lesão hepática relacionada às drogas é estabelecida de acordo com a apresentação clínica, os achados laboratoriais e histológicos e também pelo mecanismo de toxicidade. De forma similar, o aparelho renal, sendo o responsável pelo processo de filtração e eliminação dos resíduos dos farmacológicos, também é afetado pelos processos citotóxicos podendo o órgão desenvolver desde uma glomerulonefrite tóxica a uma insuficiência renal crônica, principalmente em se tratando de drogas cuja estratégia terapêutica aplicada a longo prazo. (TRINDADE *et al*, 2012).

Com o objetivo de se avaliar o impacto das formulações nos rins e fígado, ambos os tecidos foram coletados em todos os animais (grupo controle e grupo tratado) e submetidos a processamento histológico. Os tecidos foram submetidos à coloração de rotina (Hematoxilina e Eosina) e foram analisados de acordo com o padrão histopatológico exibido.

A morfologia do fígado dos animais em ambos os grupos, demonstrou que não houve qualquer alteração estrutural na organização dos hepatócitos, ductos, vasos ou artérias ou células estreladas. Os hepatócitos apresentavam citoplasma homogêneo, de formato poliédrico sem alterações degenerativas. O núcleo em sua maioria exibia nucléolo evidente sem sinais de formações picnóticas. Não foi observado em nenhum dos animais de ambos os grupos, sinais de necrose ou alterações conjuntivas da matriz extracelular. Em nenhum animal, foi observada a presença de hemorragia ou infiltrado inflamatório. (FIG. 9A)

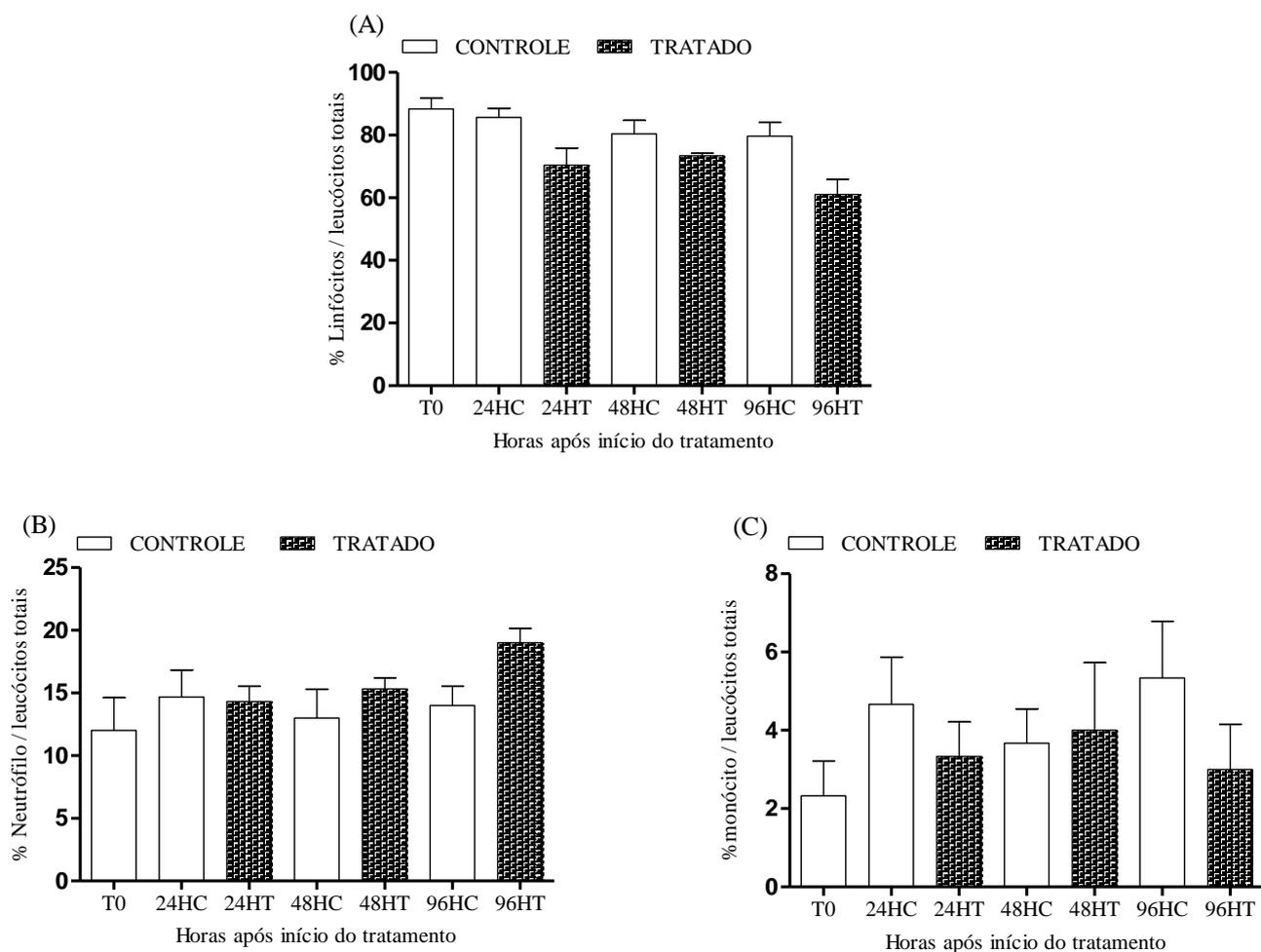
Em relação ao tecido renal, não foram observadas alterações na morfologia glomerular ou glomerulonefrite evidente, bem como a presença de degeneração e/ou cilindros hialinos intratubulares indicativos de nefrotoxicidade em nenhum dos grupos avaliados. (FIG. 9B)



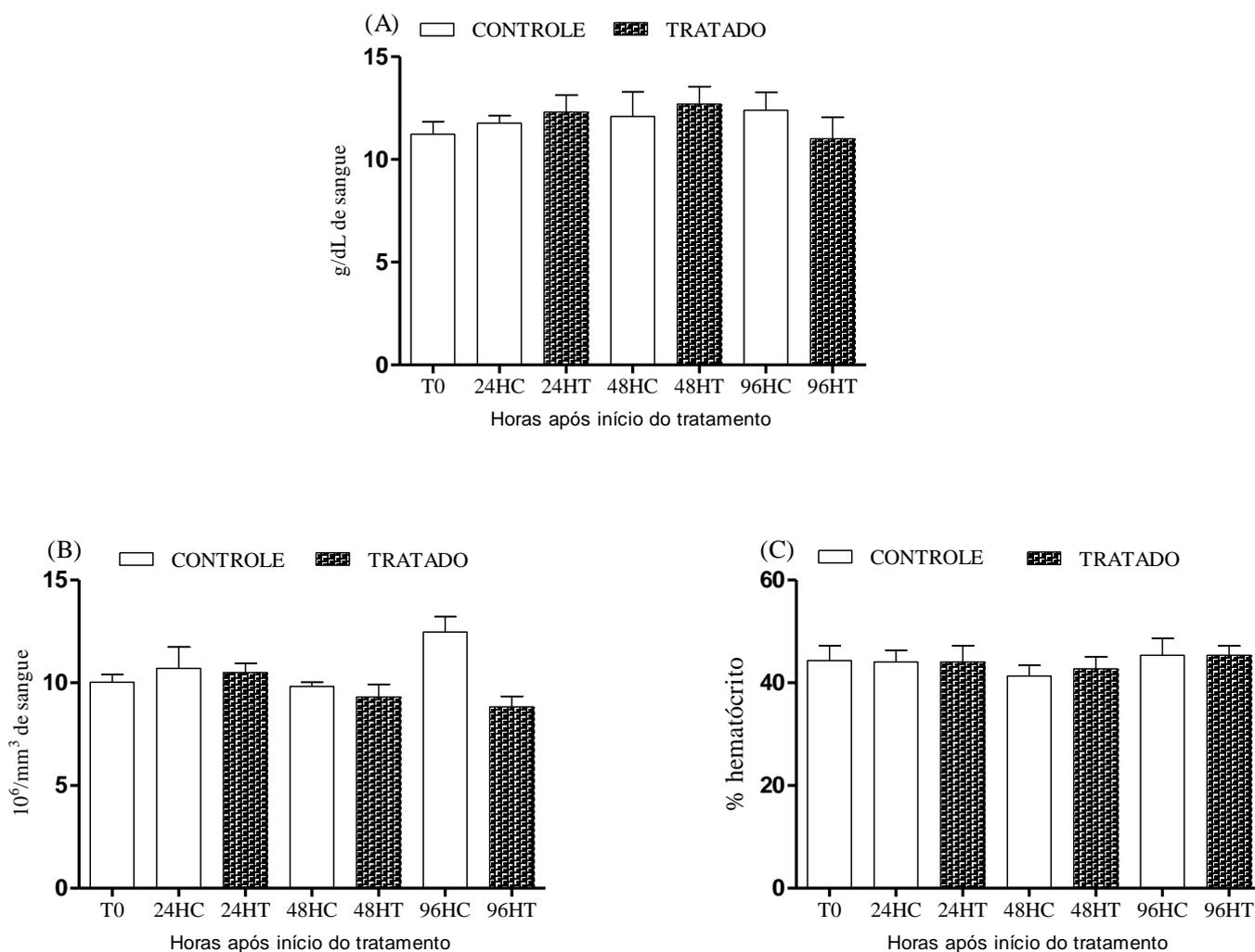
### **5.9 Avaliação da mielotoxicidade decorrente da liberação de MTX através do sistema polimérico de poli( $\epsilon$ -caprolactona).**

É sabido que o uso prolongado de MTX está relacionado com o aparecimento de anemia, leucopenia, pancitopenia, neutropenia e trombocitopenia decorrentes da mielossupressão. Esse efeito sobre a medula é atribuído a ação do fármaco sobre o metabolismo de pirimidina, o qual inibe etapas importantes da síntese de DNA e culmina com a gama de alterações hematológicas já citadas (VAN EDE *et al*, 1998). Trabalhos anteriores de NEVES (2009) demonstraram que existem alguns fatores de risco identificados e relacionados diretamente com o aparecimento da toxicidade medular, tais como: alterações da função renal, idade avançada do paciente, infecção concomitante, ingestão de álcool e deficiência de folato não tratada.

Com o objetivo de avaliar os efeitos do MTX liberado nas matrizes de PCL sobre a medula óssea, os animais, tiveram o sangue coletado, momentos antes da eutanásia por meio de punção cardíaca conforme item (4.13) e, posteriormente, foram realizados ensaios para avaliação hematológica dos perfis de células brancas e vermelhas do sangue. Os resultados obtidos pela contagem global, não apresentaram diferenças entre os grupos controle e tratados (Gráficos 10 e 11). Nossos resultados indicaram que a redução do infiltrado inflamatório no compartimento da esponja se deu em razão da elevada concentração do MTX local, sem contudo apresentar qualquer efeito sistêmico de supressão medular.



**GRÁFICO 10: Avaliação quantitativa da ação do MTX sobre o conjunto de glóbulos brancos do sangue.** (GRAF.10A): % de linfócitos em relação aos leucócitos totais; (GRAF.10B): % de neutrófilos em relação aos leucócitos totais; (GRAF.10C): % de monócitos em relação aos leucócitos totais; Os resultados estão representados média ( $\pm$  SEM) de grupos de 3-4 animais para cada ponto. Teste *t* de Student ( $p < 0.05$ ). Não houveram diferenças estatísticas observáveis entre os grupos avaliados.



**GRÁFICO 11: Avaliação quantitativa da ação do MTX sobre o conjunto de glóbulos vermelhos do sangue.** (GRAF.11A): g de hemoglobina/dL de sangue; (GRAF.11B):  $10^6$  hemácias/  $\text{mm}^3$  de sangue; (GRAF.11C): % de hematócrito; Os resultados estão representados pormédia ( $\pm$  SEM) de grupos de 3-4 animais para cada ponto. Teste *t* de Student ( $p < 0.05$ ). Não houveram diferenças estatísticas observáveis entre os grupos avaliados.

Conforme relatado anteriormente neste trabalho, os resultados de dosagem de NAG, MPO e as análises histológicas do implante de esponja demonstraram uma redução significativa do infiltrado inflamatório após 48 e 96 horas de tratamento (GRAF. 4A, 4B e FIG.8). Com o objetivo de verificar se essa redução foi decorrente do efeito local do MTX e não da sua ação sobre medula óssea (efeito sistêmico), foi proposta uma análise dos leucócitos totais e da série vermelha do sangue para avaliação dos parâmetros hematológicos sistêmicos. Para a análise dos resultados obtidos, foram adotadas como referência os seguintes percentagens das concentrações plasmáticas dos marcadores avaliados: linfócitos (80,1 +/- 9,2%); neutrófilos (16,9 +/- 6,1%); monócitos (2,3 +/- 1,2%); hemácias (9,0 +/- 0,9) x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>; hemoglobina (13,9 +/- 1,0) g/dL e hematócrito (42,3 +/- 3,9 %) (TRINDADE *et al*, 2012). Nossos resultados não evidenciaram diferença significativa entre os grupos controle e tratado em nenhum dos tempos de estudo propostos.

É sabido que a dose de MTX utilizada na clínica médica é capaz de desenvolver o conjunto de efeitos colaterais convencionais varia entre 15 a 25 mg por semana para um indivíduo de 70 Kg, aproximadamente, e os principais distúrbios decorrentes da mielossupressão aparecem após 7 a 9 dias da administração do fármaco e duram cerca de duas semanas após a interrupção do tratamento (NEVES *et al*, 2009; XAVIER *et al*, 2010). Em nosso trabalho entretanto, a quantidade de 2 mg de MTX empregada em um animal de 30 mg de peso o que corresponderia a uma superdosagem, não foi tóxica para o organismo. Essa afirmação é baseada na ausência de danos hepáticos e renais demonstrados anteriormente o que torna evidente a capacidade do sistema polimérico de PCL em modular a saída de MTX através da sua matriz. Esse efeito modulatório do sistema de liberação refletiu na ausência de alterações hematológicas no grupo tratado e demonstrou que o fármaco liberado possui ação apenas local no foco inflamatório, o que é extremamente interessante para a proposta deste trabalho.

Nossos estudos possibilitaram o entendimento de aspectos importantes da correlação liberação controlada de fármacos versus cinética inflamatória. Estudos utilizando esse sistema em outros modelos experimentais tais como: artrite reumatóide ou neoplasias, poderão elucidar outros aspectos importantes deste sistema de forma a ampliar a sua utilização como estratégia terapêutica mais próxima do ideal.

### 5.10 Resumo de resultados

De modo geral, nossos resultados demonstraram que o sistema polimérico de PCL inserido no tecido subcutâneo na região dorsal de camundongos BALB/c liberou quantidade suficiente de MTX capaz de controlar o processo inflamatório previamente induzido. A quantidade do fármaco que se difundiu pelo sistema provocou redução dos níveis de (HB) e da deposição de colágeno, principalmente colágeno tipo I na matriz esponjosa, condição que refletiu no aumento do peso úmido das esponjas dos grupos não tratados. Além disso, o infiltrado celular presente, constituído basicamente de macrófagos e neutrófilos, apresentou-se reduzido em relação ao grupo controle. Esse perfil de células inflamatórias presentes no sítio da inflamação possui relação íntima com as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 relatadas, as quais apresentaram-se reduzidas no período de 48 e 96 horas de tratamento.

As análises de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade obtidas neste trabalho indicaram que a modulação da liberação de MTX pelo sistema poli( $\epsilon$ -caprolactona) não foram nocivas para esses importantes órgãos, os quais mantiveram sua integridade física e funcional comprovadas respectivamente, pelas análises histológicas e de doseamento enzimático (TABELA1). Adicionalmente, os resultados da avaliação hematológica também não evidenciaram qualquer alteração nos perfis das células brancas e vermelhas do sangue indicando que a quantidade de MTX proveniente da matriz polimérica não apresentou efeitos sistêmicos significativos.

	<b>T0</b>	<b>24 HORAS</b>	<b>48 HORAS</b>	<b>96 HORAS</b>
<b>Hemoglobina</b>	=	=	↓	↓
<b>Número de vasos</b>	=	=	↓	↓
<b>MPO</b>	=	↓	↓	=
<b>NAG</b>	=	↑	↓	↓
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	=	=	=	↓
<b>IL-6</b>	=	=	=	↓
<b>Colágeno</b>	=	=	↓	↓
<b>Peso úmido da esponja</b>	=	↓	=	↓
<b>TGO</b>	---	---	---	---
<b>TGP</b>	---	---	---	---
<b>Ureia</b>	---	---	---	---
<b>Creatinina</b>	---	---	---	---
<b>Leucócitos totais</b>	---	---	---	---
<b>Hemoglobina</b>	---	---	---	---
<b>Hemácias</b>	---	---	---	---
<b>Hematócrito</b>	---	---	---	---

**Tabela 1:** Resumo das alterações vasculares, inflamatórias, fibrogênicas e de toxicidade renal e hepática desencadeadas pelo MTX liberado do sistema de PCL. Os símbolos representam as variações do grupo tratado em relação ao controle. (=) indica igualdade entre os grupos; (↓) indica redução do grupo tratado em relação ao controle; (↑) indica aumento do grupo tratado em relação ao controle, (-) indica ausência de toxicidade.

## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- ✓ O sistema de liberação controlada de poli( $\epsilon$ -caprolactona) demonstrou ser capaz de liberar o fármaco MTX de forma controlada e sustentada para os tempos estudados.
- ✓ O modelo murino de implante subcutâneo de esponjas de poliéster-poliuretano pode ser utilizado como uma plataforma de triagem *in vivo* para futuros fármacos utilizando o sistema de liberação controlada de poli( $\epsilon$ -caprolactona) no contexto da angiogênese inflamatória.
- ✓ O sistema de liberação PCL-MTX foi eficaz na redução dos parâmetros da cinética da angiogênese inflamatória promovida pelo implante de esponja.
- ✓ A concentração de MTX liberada pelo sistema PCL na dose de 2mg exerceu apenas efeito local, sem impacto sistêmico na medula óssea ou efeitos tóxicos renal e hepático.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINI, A., TOSETTI, F., BENELLI, R., NOONAN, D.M. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. **Cancer Research**, V 65(23), p.10637-10641, 2005.
- ANDRADE, S. P., T. P. FAN, *et al.* Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **Br J Exp Pathol**, v.68, n.6, Dec, p.755-66, 1987.
- ARAUJO, F.A., ROCHA, A.A., FERREIRA, M.A.N.D., CAMPOS, P.P., LEMOS, V.S., ANDRADE, S.P. Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, V. 38(4), p.262-268, 2011.
- ARROYO, A.G., IRUELA-ARISPEM, A. Extracellular matrix, inflammation and the angiogenic response. **Cardiovascular Research**, V.86, p. 226-235, 2010.
- BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods Enzymol**, v.162, p.327-34, 1988.
- BALKWILL, F., CHARLES, K.A., MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v. 7,p. 211–217, 2005.
- BANGHAM, A.D. A correlation between surface charge and coagulate action of phospholipids. **Nature**, V.192 p. 1197-1198, 1961.
- BANNO, T., GAZEL, A., BLUMENBERG, M. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. **The Journal of Biological Chemistry**, 279(31), p. 2004.
- BARBATO, F., LA ROTONDA, M.I., MAGLIO, G *et al.* Biodegradable microspheres of novel segmented poly(ether-esteramide)s based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) for the delivery of bioactive compounds. **Biomaterials**, V. 22, p. 1371–8, 2001.
- BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL-2 in model of inflammatory angiogenesis in mice. **Inflammation Research**, 53 (10), p.576-584, 2004.
- BERGSMA, J.E., BRUIJN, W.C., ROZEMA, F.R *et al.* Late degradation tissue response to poly(lactide) bone plates and screws. **Biomaterials**, V. 16, p.25–31, 1995.
- BISCHOFF, J. Cell adhesion and angiogenesis. **J Clin Invest**, v.100, n.11, p.S37-9, 1997.
- BOGLIOLO, L., BRASILEIRO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1472 p. 2006.

- BRADSHAW, A.D.; REED, M.J.; CARBON, J.G.; PINNEY, E.; BREKKEN, R.A.; SAGE, H. Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges in SPARC-null mice. **Wound Repair and Regeneration**, 9(6), p.522-530, 2001.
- CAMPOS, P.P., ANDRADE, S.P., MORO, L., FERREIRA, M.A.N.D., VASCONCELOS, A.C. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. **Histology and Histopathology**, V. 21(12), p. 1263-1270, 2006.
- CHAKRAVARTY, A.K.; MAZUMDER, T.; CHATTERJEE, S.N. Anti-inflammatory potential of ethanolic leaf extract of *Eupatorium adenophorum* Spreng. Through alteration in production of TNF- $\alpha$ , ROS and expression of certain genes. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, p1-10, 2011.
- CHU, C. C. Biodegradable polymers: an overview. In: Wnek GE, Bowlin GL, eds. Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. New York: **Informa Healthcare USA**, Inc. 2008.
- CLARKE'S Analysis of Drugs and Poisons, London: **Pharmaceutical Press**. Electronic version, 2006.
- COUSSENS LM, TINKLE CL, HANAHAN D, WERB Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. **Cell**. V. 103, p.481-490, 2000.
- CROSS, A. S., S. SAKARYA *et al.* Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. **J. Biol. Chem**, v.278, n.6, Feb 7, p.4112-20, 2003.
- D'EMANUELE, A.; ATTWOOD, D. Dendrimer-druginteractions, **Advanceddrug delivery reviews**, V. 57. p. 2147-2162, 2005.
- DIEGELMANN, R.F., EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, V.9,p. 283-289, 2004.
- FERREIRA, R.G *et al.* Neutrophil recruitment is inhibited by nicotinamide in experimental pleurisy in mice. **European Journal of Pharmacology**, V.685, p. 198-204, 2012.
- GOLDMAN, ID., MATHERLY LH. The cellular pharmacology of methotrexate. **Pharmacol Ther**, V.28, p. 77-102, 1995.
- GRINDLAY, J. H. E J. M. WAUGH. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. **AMA Arch Surg**, v.63, n.3, Sep, p.288-97., 1951.
- GROSFLAM, J., WEINBLATT, ME. Methotrexate: Mechanism of action, pharmacokinetics, clinical indications and toxicity. **Curr Opin Rheumatol**; V. 3, p.363-8, 1991.
- HARAOUI, B., POPE, J. Treatment of Early Rheumatoid Arthritis: Concepts in Management. **Semin. Arthritis Rheum**. V. 40, p. 371-388, 2011.
- HOCHBERG. M, C., TRACY. J, K., HAWKINS-HOLT. M., FLORES RH. Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab, etanercept and infliximab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. V. 62, 2003.

- HOU J, LI C, CHENG L, *et al.* Study on hydrophilic 5-fluorouracil release from hydrophobic poly( $\epsilon$ -caprolactone) cylindrical implants. **Drug Dev Ind Pharm.** V. 37. P. 1068–75, 2011.
- HU, D.E., HILEY, C.R., SMITHER, R. L., GRESHAM, G.A., FAN, T.P. Correlation of  $^{133}\text{Xe}$  clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. **Laboratory Investigation** V. 72(5), p. 601-610, 1995.
- JACKSON, J. R., SEED, M. P., KIRCHER, C., WILLOUGHBY, D. A., WINKLER, J. D. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. **THE FASEB Journal**, V. 11, p.457-465, 1997.
- JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials** V.21, p.2475–90, 2000.
- JORGENSEN, L.N. Collagen deposition in the subcutaneous tissue during wound healing in humans: a model evaluation. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.115: 1-56, 2003.
- KLARESKOG, L *et al.* Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. **The Lancet**, V. 363, p. 375- 81, 2004.
- KOATZ, V. L. G., Visão geral do processo inflamatório. **Separata da Revista Brasileira de Reumatologia**, p.3-5, 2001.
- KOBBE, P. *et al.* Inhalative IL-10 attenuates pulmonary inflammation following hemorrhagic shock without major alterations of the systemic inflammatory response. **Mediators of Inflammation**, p. 1-6, 2012.
- KOH, T.J., DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Rev. Mol. Med.** V. 13, e23, 2011.
- LAPCHIK VBV, MATTARAIA VGM, KO GM *et al.* **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório.** Rio de Janeiro, Atheneu, 730 p, 2009.
- LEE, S.S., HUGHES, P., ROSS, A. D., ROBINSON, M.R. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. **Pharm Res**, v.27, P. 2043–53, 2010.
- LEIBOVICH, S. J., ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **Am J Pathol**, v.78, n.1, Jan, p.71-100. 1975.
- MANSOOR, S., KUPPERMANN. B, D., KENNEY, M, C., Intraocular sustained-release delivery systems for triamcinolone acetonide. **Pharm. Res.** v. 26, P. 770–84, 2009.
- MATSUURA, M., YAMAZAKI, Y.; SUGIYAMA, M.; KONDO, M.; ORI, H.; NANGO, M.; OKU, N. Polycation liposome-mediated gene transfer *in vivo*. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, V. 1612 (2): p. 136-143, 2003.

- MELO, F. A., MOURA, E. P., RIBEIRO, R. R., ALVES, C. F., CALIARI, M. V., TAFURI, W. L., CALABRESE, K. S., TAFURI, W. L. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Int J Exp Pathol**, v. 90 (5), p. 538-48, 2009
- MENDES, JB *et al.* Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. **Microvascular Research**, V. 78 (3), p. 265-271, 2009.
- MONTENEGRO, M. R., FRANCO, M. **Patologia - Processos gerais**. 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 320 P.
- MOURA, S.A.L., LIMA, L.D., ANDRADE,S.P *et al.* Local drug delivery system: inhibition of inflammatory angiogenesis in a murine sponge model by dexamethasone-loaded polyurethane implants. **J Pharm Sci**, V.100, p. 2886–95, 2011.
- MULLANE, K. M., R. KRAEMER *et al.* Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. **J. Pharmacol. Methods**, v.14, n.3, Nov, p.157-67, 1985.
- NAYAK, B.S., SANDIFOR, S., MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda cetrifolia L.Leaf*. **Evidence- based Complementary and Alternative Medicine**, V.6, p. 351-356, 2009.
- NEVES, C., JORGE. R., BARCELOS. A; A teia de toxicidade do metotrexato. **Acta Reumatol Port**. V.34, p. 11-34, 2009.
- PASSANITI, A *et al.* A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and anti-angiogenesis agents using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor. **Laboratory Investigation**, V. 67(4), p. 519-528, 1992.
- PEREIRA, A.D.F., PEREIRA, L.G.R *et al.* Efficacy of methotrexate-loaded poly(e-caprolactone) implants in Ehrlich solid tumor-bearing mice. **Drug. Deliv**, V. 20, p. 168-79, 2013.
- PHILLIPS, R. J. *et al.* Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, V. 114, p. 438-446, 2004.
- PINTO FCH, SILVA-CUNHA A, PIANETTI GA, *et al.* Montmorillonite clay based polyurethane nanocomposite as local triamcinolone acetate delivery system. **J Nanomater**. V 1, nº11, 2011.
- PUGA, A. M., Hot melt poly(e-caprolactone)/ poloxamine implantable matrices sustained delivery of ciprofloxacin. **Acta Biomaterialia**. p. 1507-1518, 2011.
- PUNCHARD, N.A., WHELAN, C.J., ADCOCK, J. The Journal of Inflammation. **Journal of inflammation**, V.1(1), p. 1-4, 2004.
- SARTORI, T. **Preparação e caracterização de nanopartículas contendo metotrexato e avaliação da estabilidade e viabilidade do tecido corneal após administração tópica ocular**. 128 f. Tese (mestrado em ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia. Universidade Federal

de Santa Catarina, 2007.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of Inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, V.8, p.93-151, 2007.

SHAFFER, C. Nanomedicine transforms drug delivery. **Drug Discovery Today**. Vol.10, p:1581-1582, 2005

SIMPSON, D. M., ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. **J Clin Invest**, v.51, n.8, Aug, p.2009-23. 1972.

SINGER, A. J., CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med*, v.10, n. 341, p.738-46, 1999.

SPROCKEL, O.L., SEN, M., SHIVANAND, P., PRAPAITRAKUL, W. A melt- extrusion process for manufacturing matrix drug delivery systems. **Int J Pharm** 155:191–9, 1997.

TEIXEIRA, A. S., M, V. CALIARI et al. Aminoguanidine prevents impaired healing and deficient angiogenesis in diabetic rats. **Inflammation**, v.23, n.6, Dec, p.569-81, 1999.

TIDBALL, J.G. Inflammatory process in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology Regulation Integrative and Comparative Physiology**, v.288, p. 345-353, 2005.

TIMOTHY. J. K., DIPIETRO, A.L. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Rev. Mol. Med.** Vol. 13, e23, July, 2011.

TRINDADE,A,T,M. Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou, 2012. 147 f. Tese de mestrado / **FIOCRUZ – Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ**, 2012.

VAN EDE, A.E., ROLAND, F.J.M., LAAN, H.J., RONEY, A. D. A. Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: An Update With Focus on Mechanisms Involved in Toxicity. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Vol. 27, Nº 5, p. 277-292, 1998.

VAN-NATTA, F.J., HILL, J.W., CARRUTHERS, W,H. Polymerization and ring formation,  $\epsilon$ -caprolactone and its polymers. **J. Am. Chem. Soc.**, V.56, p. 455–9. 1934.

WEINBLATT, ME., Maier, Al. Longterm experience with low dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. **J Reumathol** ,V. 17, p. 33-38, 1990.

WOODRUFF, M. A., HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer polycaprolactone in the 21st century. **Prog. Polym. Sci.** V. 35, p. 1217–56, 2010.

XAVIER, M. M., **Mnitoramento da toxicidade do metotrexato em esquemas de altas doses no tratamento de osteossarcoma**. 2010. 45f (Tese de mestrado). Departamento de ciências da vida. Universidade do Estado da Bahia, 2010.