



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**APOPTOSE EM MACRÓFAGOS INDUZIDA POR NANOCÁPSULAS
COM NÚCLEO LIPÍDICO (LNC) CARREGADAS COM DICLOFENACO**

AGUYDA RAYANY CAVALCANTE BARBOSA

**MANAUS – AMAZONAS
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**APOPTOSE EM MACRÓFAGOS INDUZIDA POR NANOCÁPSULAS COM NÚCLEO
LIPÍDICO (LNC) CARREGADAS COM DICLOFENACO**

AGUYDA RAYANY CAVALCANTE BARBOSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – ICB – UFAM, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof.º Dr. Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes

Coorientador: Prof.º Dr. Pritesh Jaychand Lalwani

**MANAUS – AMAZONAS
2016**

AGUYDA RAYANY CAVALCANTE BARBOSA

**APOPTOSE EM MACRÓFAGOS INDUZIDA POR NANOCÁPSULAS COM NÚCLEO
LIPÍDICO (LNC) CARREGADAS COM DICLOFENACO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – ICB – UFAM, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dra. Alessandra Pontillo, Membro externo
Universidade de São Paulo /SP

Dr. Emerson Silva Lima, Membro externo
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B238a Barbosa, Aguyda Rayany Cavalcante
Apoptose em Macrófagos Induzida por Nanocápsulas com
Núcleo Lipídico (LNC) Carregadas com Diclofenaco / Aguyda
Rayany Cavalcante Barbosa. 2016
61 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Coorientadora: Pritesh Jaychand Lalwani
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Diclofenaco. 2. Nanocápsula. 3. Macrófago. 4. Apoptose. 5.
Inflamação. I. Lopes, Antonio Luiz Ribeiro Boechat II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais **Ruy Silva Barbosa** e **Antonia Maria Cavalcante** por todo o incentivo, apoio e amor incondicional. Aos meus irmãos **Aghatta, Aquyla** e **Ruy Júnior** pela paciência, ajuda e companheirismo. Obrigada por serem meu alicerce.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar a força e coragem para continuar nessa jornada mesmo com tantos obstáculos.

Ao meu orientador Professor Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes pelo conhecimento transmitido ao longo desses anos, pela paciência e pela dedicação.

Ao meu Coorientador Professor Dr. Pritesh Jaychand Lalwani, por me inspira a cada dia tentar ser melhor, pela paciência e dedicação nos meses de experimento.

Ao programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, em especial as coordenadoras, professora Dra. Adriana Malheiros e a Professora Dra. Aya Sadahiro.

Aos grandes mestres que ministraram as disciplinas, pois tiveram a bondade de nos transmitir um pouco de seu vasto conhecimento, em especial uma pessoa que acho que nem imagina o quanto mudou minha vida, Dra. Aya Sadahiro, que nos deu o prazer de termos aulas magníficas e de conhecer uma grande profissional e pessoa, a quem admiro e levarei sempre comigo, exemplo de sabedoria.

Aos secretários Ana Paula e Edson Brazão, que estiveram presentes conosco desde o início dessa jornada nos ajudando sempre que possível.

A Professora Dra. Ana Paula Rodrigues Menezes Bastos, que me abriu as portas para imunologia, me mostrando o quanto tudo podia ser mágico. Acreditou em mim e me ensinou muito como professora, amiga e até mãe na vida científica. Me acompanhou no estágio a docência, e a cada dia minha admiração e respeito só aumentam.

Aos meus companheiros de mestrado, pois formamos uma turma muito pequena, porém laços que jamais serão quebrados.

A dois grandes mestres, Professora Dra. Alessandra Pontillo e Professor Dr. Carlos Antério Sorgi, que tive a oportunidade de viajar e aprender bastante com esses excelentes profissionais.

Ao professor Dr. Emerson Silva Lima e Professora Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos que nos cedeu seus laboratórios para a realização de alguns experimentos.

As queridas Marcia de Jesus e Leilane Bentes por me ajudarem e me ensinar em técnicas utilizadas.

As irmãs de pesquisa Adriane Batalha e Camila Soares, sempre me apoiaram e estiveram presentes nessa longa jornada.

Aos colegas do Laboratório, Nadielle, Juliana, Fábio, Renato, em especial Maria e Bárbara, que com toda certeza amenizaram os momentos mais difíceis, com suas brincadeiras, alegrias ou até a falta de animação ao dar um bom dia.

A Universidade Federal do Amazonas - UFAM

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), que me concedeu bolsa.

A plataforma Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) Manaus/AM, pois nos auxiliaram na Citometria.

Ao Yury Chaves, técnico do equipamento pela paciência e ajuda na leitura das amostras.

Aos meus pais, Ruy Silva Barbosa e Antonia Maria Cavalcante pelo amor, carinho, dedicação e apoiaram que dedicaram a mim, me dando forças para seguir meus sonhos, mesmo que para isso tivéssemos que sair de casar e criar asas para o mundo.

Aos meus irmãos, Aghatta, Aquyla e Ruy Junior, que acreditaram em mim e estiveram ao meu lado sempre que precisei de um apoio para levantar e seguir caminhado nessa estrada que escolhi.

As meus amigos Péricles Abrel e Anne Marjorie, que viraram irmãos, pessoas incríveis com que contei desde o início dessa jornada, obrigada pelos conselhos, companheirismos e amizade.

A minha amiga Rafaella Oliveira, menina que ganhou meu coração no início do mestrado me oferecendo sua amizade e seu companheirismo, obrigada pelas noites viradas, pelos choros compartilhados, pela força nos momentos mais difíceis e principalmente por sempre me dar força, me ajudando acreditar que tudo daria certo mesmo com todas as dificuldades.

As minhas amigas Siuhelen Rocha e Grasielle Camacho que estão comigo desde minha chegada a Manaus em 2010, sempre me apoiaram e me ajudando a suportar a dor pela distância de casa. Se transformando em verdadeiras irmãs.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, Nadja, Walter, Allyson, André, Yury, Regina que ajudaram a tornar as coisas mais fáceis.

RESUMO

O Diclofenaco é uma droga anti-inflamatória não esteroide (AINE), utilizada no tratamento de afecções inflamatórias musculoesqueléticas, incluindo as doenças autoimunes como a Artrite Reumatoide (AR). Na sinovite crônica da AR os macrófagos exercem papel central na inflamação e a indução de apoptose destas células pode vir a representar um papel central no tratamento. Neste trabalho, utilizou-se de uma formulação de diclofenaco carregada em nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC-DIC), avaliando-se o papel desta formulação na indução de apoptose em macrófagos. A LNC foi formada a partir de um núcleo organogel, revestido com uma parede polimérica poly(ϵ -caprolactona) e estabilizada com polyssorbato 80, obtendo diâmetro D[4,3] de 243nm para DIC e 319nm para LNC-DIC. Dessa forma foram utilizadas as formulações Diclofenaco (DIC), LNC-DIC e apenas LNC em macrófagos humanos (THP-1) e Murinos (J774). A IC₅₀% para toxicidade em macrófagos para as formulações foi 646 μ M para DIC e 144,5 μ M para LNC-DIC em THP-1 e 251,7 μ M para DIC e 24,35 μ M para LNC-DIC em J774. A formulação LNC-DIC reduziu acentuadamente o potencial de membrana mitocondrial em relação a DIC (-44,65 $\pm$ 3,36 e 21,79 $\pm$ 2,19, $p < 0,0001$, respectivamente) em THP-1, além de J774 (-5,65 $\pm$ 0,88 e -26,59 $\pm$ 7,21, $p < 0,0001$). Também houve maior produção de ROS intracelular para LNC-DIC em relação a DIC na linhagem THP-1 (27,24 $\pm$ 0,90 e 36,88 $\pm$ 2,49, $p = 0,0002$). A formulação LNC-DIC aumentou o percentual de células com caspase-3 ativa comparada à DIC (53,08 $\pm$ 6,23 e 81,70 $\pm$ 9,09, $p = 0,0007$) e a atividade de caspase-3 nas concentrações estudadas. Além disso, LNC-DIC induziu maior percentual de células Anexina V+ comparada a DIC (6,26 $\pm$ 0,34 e 12,68 $\pm$ 0,22, $p = 0,0001$). Quando avaliado o índice de dano ao DNA pelo ensaio cometa, não houve diferença entre as formulações testadas DIC e LNC-DIC (44,24 $\pm$ 2,65 e 53,33 $\pm$ 4,16, $p = 0,586$). Tomados em conjunto, esses resultados demonstram que a formulação nanoencapsulada LNC-DIC tem ação indutora de apoptose, de forma independente do dano ao DNA, possivelmente relacionada a produção de ROS intracelular e/ou estresse do retículo endoplasmático, abrindo assim a possibilidade de um tratamento eficaz e barato para a AR, através do uso de Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregado com Diclofenaco.

Palavra Chave: Diclofenaco, Nanocápsulas, Macrófago, Apoptose, Inflamação, ROS.

ABSTRACT

Diclofenac is a nonsteroidal anti-inflammatory drug, used to treat inflammatory muscle skeletal diseases, including the autoimmune diseases as Rheumatoid Arthritis (RA). In chronic synovitis of Rheumatoid Arthritis the macrophages play a central role in inflammation and the induction of apoptosis in those cells can represent a central paper in the treatment. For this work was used a formula of Diclofenac carried in nanocapsules of lipid core (LNC-DIC), validating the paper of this formula in apoptosis induction in macrophages. The LNC was formed parting from a organogel core, coated with a polymeric poly (ϵ -caprolactona) wall and stabilized with Polyssorbato 80, obtaining a diameter D [4,3] of 243nm for DIC and 319nm for LNC-DIC. By that way were used the formulas Diclofenac (DIC), LNC-DIC and only LNC in human macrophages (THP-1) and murines (J774). The IC₅₀% for toxicity in macrophages for the formulations was 646 μ M for DIC, 144,5 μ M for LNC-DIC in THP-1, 251,7 μ M for DIC and 24,35 μ M for LNC-DIC in J774. The formula LNC-DIC reduced strongly the mitochondrial membrane potential related to DIC (-44,65 $\pm$ 3,36 e 21,79 $\pm$ 2,19, $p < 0,0001$, respectively) in THP-1, besides the J774 (-5,65 $\pm$ 0,88 e -26,59 $\pm$ 7,21, $p < 0,0001$). There was also a ROS intracellular bigger production when compared with DIC in THP-1 lineage (27,24 $\pm$ 0,90 e 36,88 $\pm$ 2,49, $p = 0,0002$). The LNC-DIC formulation increased the percentage of cells with activated caspasa 3 when compared with DIC (53,08 $\pm$ 6,23 e 81,70 $\pm$ 9,09, $p = 0,0007$) and the caspasa 3 activity in the studied concentration. Besides this, LNC-DIC induced higher percentage of Annexin V+ cells compared to DIC (6,26 $\pm$ 0,34 e 12,68 $\pm$ 0,22, $p = 0,0001$). When was validated the DNA damage index using comet test, there was not any difference between the tested DIC and LNC-DIC (44,24 $\pm$ 2,65 e 53,33 $\pm$ 4,16, $p = 0,586$). Taking together, those results show that nanoencapsulated formulation LNC-DIC has an apoptosis inductor action, independent of DNA damage. Possibly related to intracellular ROS production and endoplasmic reticule stress, opening the possibilities for a functional and ship treatment for RA, through the use of nanocapsules of lipid core carried with Diclofenac.

Key Words: Diclofenac, Nano capsules, Macrophages, Apoptosis, Inflammation, ROS.

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1:	Membrana sinovial inflamada na Artrite Reumatoide. CEA – células endoteliais ativadas com aumento de permeabilidade. FibS – Fibroblastos sinoviais. MØS – Macrófagos Sinoviais. MS – Membrana sinovial. ES – Espaço sinovial. CA – Capsula sinovial. A figura representa o direcionamento passivo de nanopartículas (NP) através do endotélio ativado.	27
FIGURA 2:	Sistema Carreador Nanoparticulados – Lipossoma.	28
FIGURA 3:	Representação esquemática de Nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: A: fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; B: fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; C: fármaco que pode estar retido ou adsorvido na matriz polimérica das nanoesferas.	28
FIGURA 4:	Classificação de cometas em Níveis de danos	38
FIGURA 5:	Teste de viabilidade celular e determinação IC50% pelo método de MTT em células J774 numa concentração de 1×10^5 /poço, foi utilizado-se meio e DMSO como controle negativo, Staurosporine 2,5µM controle positivo. O experimento foi feito em dois tempos (A = 24 horas e B = 48 horas) com quatro concentrações (1µM, 10µM, 100µM e 1000µM). A: Com 24 horas houve diferença significativa entre as formulações, IC50% de DIC 306,6µM ($r^2=0,84$) e LNC-DIC 118µM ($r^2=0,94$). B: 48 horas houve uma diminuição no IC50% de ambas as formulações, DIC 251,7µM ($r^2=0,94$) e LNC-DIC 24,35µM ($r^2=0,94$).	40
FIGURA 6:	Teste de viabilidade celular e determinação IC50% pelo método de MTT em células THP-1 numa concentração de 1×10^5 /poço, utilizou-se meio e DMSO como controle negativo, Stau. 2,5µM controle positivo. O experimento foi feito em dois tempos (A = 24 horas e B = 48 horas) com quatro concentrações (1µM, 10µM, 100µM e 1000µM). A: Em 24 horas houve diferença significativa entre as formulações, IC50% de DIC 877,2µM ($r^2=0,87$) e LNC-DIC 460,4µM ($r^2=0,88$). B: 48 horas houve uma diminuição no IC50% de ambas as formulações, DIC 646,2µM ($r^2=0,63$) e LNC-DIC 144,5µM ($r^2=0,30$).	41
FIGURA 7:	Percentual de Potencial de Membrana Mitocondrial por DiOC ₆ , as células foram plaqueadas numa concentração de 1×10^5 /poço e foram tratadas com LNC, LNC-DIC e DIC em concentrações distintas. A: Células J774 tratadas por 24 horas com ambas as formulações, em concentrações de 65µM (-1,51±2,42, -15,38±1,88; $p=0,0005$ (***) e 130µM (-5,65±0,88, -26,59±7,21; $p<0,0001$ (****)). A LNC quando comparada ao controle negativo teve diferente significativa. ($p<0,0001$ (****)). B: Células THP-1 tratadas por 48 horas com ambas as formulações, em concentrações de 75µM (23,71±2,98, -40,47±4,31; $p<0,0001$ (****)) e 150µM (21,79±2,19, -44,65±3,36; $p<0,0001$ (****)). Não houve diferença significativa entre controle negativo e LNC ($p=0,054$).	42
FIGURA 8:	Percentual de produção de ROS intracelular para células J774 e THP-1, as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 /poço e tratadas com LNC, LNC-DIC e DIC. A: Células J774 tratadas por 24 horas quando comparadas na mesma concentração nas diferentes formulações não apresentaram resultados significativos, 65µM (49,55±11,83, 42,77±6,47; $p=0,987$) e 130µM (54,40±18,44, 52,80±8,11; $p=0,997$), houve diferença estatística em três grupos quando comparados com controle negativo: DIC 130µM ($p=0,037$ (*), LNC ($p=0,022$ (*)) e LNC-DIC 130µM ($p=0,043$ (*)). B: Células THP-1 tratadas por 48 horas apresentaram diferença	43

	estatística quando comparadas nas mesmas concentrações em ambas formulações, 75µM (14,14±2,69, 30,33±3,90; $p<0,0001$ (****) e 150µM (27,24±0,90, 36,88±2,49; $p=0,0002$ (***)).	
FIGURA 9:	Determinação de <i>gates</i> para atividade de caspase-3 por citometria. A: Distribuição da população de células THP-1 quando suas características morfológicas de tamanho e granulosidade, estando em destaque a população selecionada para avaliação. B: Histograma representativo do deslocamento dos controles quando a atividade de Caspase-3, onde o pico cinza são células sem marcação (S.M), a linha pontilhada é o controle negativo e a linha continua é o controle positivo (Stau. 5µM). C: Percentual de células com caspase-3 ativa no controle negativo. D: Percentual de células com caspase-3 ativa no controle positivo (Stau. 5µM).	44
FIGURA 10:	Percentual de células THP-1 com caspase-3 ativa. Foi avaliada a atividade da proteína após 48 horas de tratamento com ambas formulações em duas concentrações (75µM e 150µM). A: Aumento significativo de células com caspase-3 ativa quando comparada ambas formulações, 75µM (40,85±4,37, 84,80±6,16; $p<0,0001$ (****) e 150µM (53,08±6,23, 81,70±9,09; $p=0,0007$ (***) LNC quando comparado com controle negativo, apresentou resultados significativo ($p=0,0012$). B: Intensidade media de fluorescência das células analisadas.	45
FIGURA 11:	Seleção de <i>gates</i> dos controles para Anexina V+ por citometria. A: Histograma representativo do deslocamento dos controles quando a presença de Anexina V, onde o pico cinza são células S.M, a linha pontilhada é o controle negativo e a linha continua é o controle positivo (Stau. 5µM), o gráfico representa o percentual de Anexina V + nos grupos controles. B: Percentual de células Anexina V+ no controle negativo. C: Percentual de células Anexina V+ ativa no controle positivo (Stau. 5µM).	46
FIGURA 12:	Células THP-1 Anexina V+ determinadas por citometria de fluxo após tratamento com ambas formulações em duas concentrações (75µM e 150µM) por 48 horas. A: Histograma representativo do deslocamento de ambas formulações testadas na concentração de 75µM, o gráfico representa o percentual de células Anexina V+, demonstrando diferença significativa entres as formulações (5,72±0,16, 15,87±0,52; $p<0,0001$ (****). B: Histograma representativo do deslocamento de ambas formulações testadas na concentração de 150µM, o gráfico representa o percentual de células Anexina V+, demonstrando diferença significativa entres as formulações (6,26±0,34, 12,68±0,22; $p<0,0001$ (****).	47
FIGURA 13:	Índice de Dano em células THP-1 após 48 horas de tratamento com ambas formulações. Ao compara DIC/LNC-DIC nas mesmas concentrações, não houve resultado significativo 75µM ($p=0,9984$) e 150µM ($p=0,5860$). Ambas formulações tiveram resultados significativos nas duas concentrações quando comparados com controle negativo ($p<0,0001$).	48
FIGURA 14:	Percentual de níveis de danos em células THP-1, após 48 de tratamento. O único grupo que apresentou danos significativo de nível 4 foi o controle positivo (DOXO), os grupos tratados com as formulações apresentaram aumento no dano de nível 1, tendo o grupo LNC-DIC 150µM uma tendência ao dano de nível 2, LNC não apresentou dano significativo quanto comparado ao controle negativo.	48
FIGURA 15:	Avaliação de período do tratamento das formulações sobre danos ao DNA. A: grupo controle negativo, tratado com meio. Onde se observou a predominância de cometas de nível 0 e 1. B: Controle	49

da nanoformulação (LNC), cometa de nível 0 e 1. **C**: Controle negativo (DOXO), cometa de nível 4. **D e E**: Tratamento com DIC (**D** 75µM e **E** 150µM), cometa de nível 1. **F e G**: Tratamento com LNC-DIC (**F** 75µM e **G** 150µM), cometa de nível 1, com tendência para o nível 2 na maior concentração (**G**).

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Composição das nanocápsulas de núcleo lipídico	33
TABELA 2:	Diâmetro médio de volume D[4,3].	39
TABELA 3:	Teor do fármaco nas formulações	39

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1:	Estudos com toxicidade celular do Diclofenaco em diferentes linhagens celulares	26
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIC	Critério Informativo de Akaike
AINÉ	Anti-inflamatórios Não Esteroides
AR	Artrite Reumatoide
CA	Capsula Articular
cDNA	DNA complementar
CEA	Células Endoteliais Ativadas
CGs	Glicocorticoides
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX	Ciclooxigenase
DCF	Diclorofluoresceína
DCFDA	2' 7'- Acetato Diclorofluoresceína
DIC	Diclofenaco
DIC-LNC	Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregada com Diclofenaco
DiOC ⁶ (3)	Iodeto de 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMCD	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOXO	Doxorrubicina
ES	Espaço Sinovial
Fc	Fragmento Cristalino
FibS	Fibroblastos Sinoviais
FSC	Medida do tamanho relativo da célula
IC ₅₀ %	Concentração inibitória 50%
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon-γ
LMP	Agarose baixo ponto de fusão
LNC	Nanocápsulas de Núcleo Lipídico
MIF	Intensidade média de fluorescência
MØS	Macrófagos Sinoviais
MS	Membrana Sinovial
MTT	{Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico]}
MTX	Metotrexato
NMP	Agarose ponto de fusão normal
NP	Nanopartícula
oxDCF	Diclorofluoresceína oxidada
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Proteína C Reativa
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PEG	Poly (etilenoglicol)
PGs	Prostaglandinas
PMA	Forbol 12-miristato-13-acetato
RF	Fatores Reumatóides
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
S.M	Sem Marcação
Stau	Staurosporine
SSC	Granulosidade ou Complexidade das células
Th1	T <i>helper</i> 1
THP-1	Células humanas de Leucemia Monócítica
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UP	Úlcera Péptica
VHC	Velocidade de Hemossedimentação

$\Delta\psi_m$

Potencial de Membrana Mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Artrite Reumatoide.....	20
2.2 Fisiopatologia da Artrite Reumatoide.....	21
2.3 Morte celular e sinovite crônica na Artrite Reumatoide.....	22
2.4 Macrófago na Artrite Reumatoide	23
2.5 Diagnóstico e Tratamento	24
2.6 Importância do Diclofenaco no Tratamento da Artrite Reumatoide	25
2.7 Sistema de Liberação Controlada (“Drug Delivery Systems”)	28
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Delineamento do estudo (fluxograma).....	33
4.2 Preparo das formulações de Nanocápsulas de Núcleo Lipídico (LNC) ..	34
4.3 Linhagens celulares de Macrófagos	34
4.4 Teste de viabilidade Celular (MTT)	35
4.5 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	36
4.6 Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$) ...	36
4.7 Efeito das nanoformulações na marcação das células com Anexina V ..	37
4.8 Atividade de Caspase-3.....	37
4.9 Ensaio Para Detecção de Danos no DNA (Cometa Alcalino).....	38
4.10 Análise Estatística	39
5. RESULTADOS	40
5.1 Caracterização das Nanopartículas	40
5.2 Teste de viabilidade celular utilizando duas linhas de macrófagos.....	40
5.3 Produção de ROS intracelular após tratamento com Nanoformulações.	42
5.4 Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	43
5.5 Atividade de Caspase-3.....	44
5.6 Células Apoptóticas Anexina V positivas	46
5.7 Ensaio do Cometa (Versão Alcalina).....	48
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO	54
8. REFERENCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença Inflamatória crônica incapacitante, pois pode resultar em prejuízos nas funções, incluindo dor musculoesquelética, rigidez nas articulações, perda da amplitude de movimentos, fraqueza muscular e lesões articulares. A incapacidade causa limitações nas atividades e restrições na participação do indivíduo (CONCEIÇÃO, J. S. *et al.*, 2015).

A AR uma doença autoimune de grande prevalência acometendo 1% da população mundial, com altos custos de tratamento e grande impacto social, afeta mais mulheres do que homens que aumenta com a idade, na América Latina é estimada em de 0,4% (CONCEIÇÃO, C. S. D. *et al.*, 2015; ROGERS *et al.*, 2015).

Estudos anteriores demonstraram que macrófagos sinoviais são resistentes à apoptose na sinovite crônica da AR com baixa expressão da proteína antiapoptótica FLIP (CATRINA *et al.*, 2005). Alguns autores tem discutido que a apoptose de células sinoviais pode representar uma importante ferramenta terapêutica na AR (FIRESTEIN; YEO; ZVAIFLER, 1995; LIU; POPE, 2003; POPE, 2002a).

Para o tratamento da AR são utilizados Anti-inflamatórios não Esteroides (AINE) (MOTA *et al.*, 2012). O Diclofenaco (DIC) é um AINE de maior prescrição em todo o mundo. Segundo GELLER *et al.* (2012) o DIC está entre os 10 medicamentos mais comercializados no mundo, sendo utilizado por mais de um bilhão de pacientes. É indicado para tratamento de dor e inflamação, em uma ampla gama de doenças e condições, incluindo distúrbios osteomuscular, articular e periarticulares, além de outras condições dolorosas e inflamatórias (cólicas renais, gota aguda, dismenorreia, etc). (GELLER *et al.*, 2012).

Porém de acordo com MOTA *et al.* (2013), o DIC possui muitos efeitos colaterais, principalmente para pacientes de AR, que utilizam o medicamento por longo período como coadjuvante ao tratamento imunossupressor. Os AINE são medicamentos que apresentam risco aumentado de efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal e cardiovasculares (GELLER *et al.*, 2012). Portanto, como poderíamos utilizar esses medicamentos diminuindo seus efeitos colaterais e melhorando sua eficiência em reduzir a inflamação?

Sistemas coloidais poliméricos têm sido propostos como vetores de fármacos no sentido de modificar a sua farmacocinética, incluindo alterações no seu perfil de distribuição tissular, podendo ainda aumentar a biodisponibilidade de muitas substâncias

ativas (SCHAFFAZICK et al., 2002), aumentando sua eficácia terapêutica e diminuir seus efeitos colaterais.

A nanotecnologia na área da ciência da saúde tem sido focada no desenvolvimento de novos produtos para terapêutica e diagnóstico. Tendo recebido atenção considerável ao longo dos últimos 30 anos pelo seu Sistema de distribuição de drogas (OLIVEIRA et al., 2012a).

Fármacos em sistema “*Drug Delivery*” nanoparticulados são capazes de concentrar-se nos tecidos inflamados em função de sua distribuição manométrica, capazes de transpor apenas o endotélio inflamado (MORALES, 2009). Considerando que as nanocápsulas de núcleo lipídico permitem maior concentração das drogas nos sítios inflamatório, bem como maior concentração intracelular e menor número de efeitos colaterais, pretende-se avaliar neste trabalho se o DIC carregado em nanocápsulas de núcleo lipídico, tem maior capacidade indutora de apoptose em macrófagos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Artrite Reumatoide

A AR é uma doença crônica inflamatória autoimune caracterizada por hiperplasia sinovial, recrutamento de células inflamatórias e deposição intra-articular de fibrina, acarretando a destruição da arquitetura articular e consequentemente a secreção de proteases de células sinoviais (GOES; COELHO; OLIVEIRA, 2014). A inflamação se apresenta como sinovite clínica promovendo destruição articular e causando dor crônica nas articulações, aumento de volume e rigidez, além de sintomas sistêmicos como cansaço, perda de peso e anemia, entre outros (OLIVEIRA et al., 2014).

De acordo com FERNANDES et al. (2011) a AR leva a deformidade e a incapacidade, em virtude de erosões ósseas e da cartilagem articular. A maioria dos pacientes apresentam um curso clínico instável, com período de melhoras e exacerbações. A doença inicia-se entre 20-60 anos com pico de incidência aos 45 anos. Frequentemente, os pacientes afetados desenvolvem incapacidade para realizar suas atividades, tanto da vida diária como profissional, acometendo adultos em fase produtiva é uma doença de importância socioeconômica, já que 50% dos pacientes são considerados incapazes para o trabalho após 10 anos de doença, assim tendo impacto significativo para a sociedade (FERNANDES et al., 2011; LOUZADA-JUNIOR et al., 2007).

Além disso, pacientes com AR apresentam alta probabilidade de apresentar comorbidades como insuficiência cardíaca, doença pulmonar crônica, demência, doença ulcerosa péptica. É interessante notar que mais da metade das mortes prematuras em pessoas com AR decorrem de doenças cardiovasculares (AVIÑA-ZUBIETA et al., 2008; PINCUS; SOKKA; WOLFE, 2001).

A doença possui distribuição universal, acometendo todas as raças, sendo mais frequentes em mulheres do que em homem na proporção 3:1 (FERNANDES et al., 2011). Entretanto, um estudo realizado no Amazonas mostrou que esta proporção é bem maior no Estado, ficando em torno de 9:1 (BOECHAT, 2010). Esta condição acomete cerca de 0,5%-1% da população mundial adulta, tendo sua prevalência aproximada de 0,46% na população brasileira (FILIPPIN et al., 2008).

O diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença, ajudando assim a prevenir incapacidade funcional e lesão articular irreversível, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (LOUZADA-

JUNIOR et al., 2007). Porém no Brasil assim como nos países desenvolvidos, os custos relacionados à AR são elevados. Os gastos com os pacientes assumem maior repercussão nos países em desenvolvimento, nos quais os recursos financeiros para a saúde são menos robustos (MOTA et al., 2011).

2.2 Fisiopatologia da Artrite Reumatoide

O evento inicial da doença é o processo inflamatório principalmente na membrana sinovial com infiltrado celular (BRENOL et al., 2007), ocorrendo uma resposta celular e humoral que contribui para o desenvolvimento da sinovite, ou inflamação da membrana sinovial. Assim causando hiperplasia da sinóvia, devido migração de Linfócitos T e B, Plasmócitos, Células Dendríticas, macrófagos assim como de fibroblastos sinoviais que produzem citocinas pró-inflamatórias, causando a ativação de outras células (VIEIRA, 2014).

A ativação de células T dependentes de antígenos, desencadeia uma resposta Imunológica essencialmente do tipo T *helper* 1 (Th1). Levando a múltiplos efeitos, tais como: ativação e proliferação de células endoteliais e sinoviais, recrutamento e ativação de células pró-inflamatórias, secreção de citocinas e proteases a partir de macrófagos e células sinoviais e a produção de autoanticorpos (BRENOL et al., 2007; MARQUES et al., 2010).

A formação de complexos imunes formados por autoanticorpos dirigidos contra auto antígenos como peptídeos citrulinados, ativam macrófagos através de receptores Fc gama (Fatores Reumatoides e autoanticorpos antiproteínas citrulinadas), conduzindo assim à liberação de citocinas tais como: Interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-15, Interferon- γ (INF- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF). Algumas dessas citocinas tem a capacidade de ativar células residentes para produção de enzimas proteolíticas (colagenases e metaloproteinases), que mediam a destruição da cartilagem (VIEIRA, 2014). A perda progressiva de cartilagem, leva a redução do espaço articular – este evento é responsável pela deformidades articulares e perda de função articular.

O local inflamado pode adquirir uma estrutura similar ao de tecidos linfoides terciários, com predomínio de linfócitos T^{CD4+}. A hiperplasia das células sinoviais, o infiltrado linfocítico e a neoangiogênese levam à formação do “*pannus*” (tecido sinovial proliferado), que atinge o osso subcutâneo e, em seguida, a cartilagem articular, com distribuição progressiva (BRENOL et al., 2007). Segundo FILIPPIN et al (2008) o *pannus* cresce de modo semelhante a tumores benignos e invade a cartilagem, ativa as células

locais, que ajudam na degradação dessa cartilagem e do osso, resultando numa destruição e conseguinte erosão.

2.3 Morte celular e sinovite crônica na Artrite Reumatoide

O processo de morte celular pode ser classificado de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas, sendo as principais: Apoptose, Autofagia, Necrose, Senescência e Piroptose (GRIVICICH et al., 2007). Insultos metabólicos, tóxicos e inflamatórios resultam em lesões celulares, e a principal característica destes insultos é a ativação de morte, que normalmente é por apoptose e / ou necrose (GUICCIARDI et al., 2013).

A morte celular por necrose causa ruptura da membrana celular de modo que o material intracelular é liberado para o meio extracelular, causando assim resposta inflamatórias, devido a ativação de células do sistema imunológico, podendo promover o crescimento de tumores no local da inflamação (OUYANG et al., 2012). Já a morte programa, também conhecida como apoptose se caracteriza pela formação de corpos apoptóticos, encolhimento celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e fragmentação do DNA cromossômico. Possui duas vias de ativação: extrínsecas (receptores de morte) e a intrínseca (mitocondrial) (SU et al., 2015). A apoptose mitocondrial pode ser ativada por vários estímulos intracelulares, tais como, danos ao DNA, privação de fator de crescimento, estresse oxidativo. A junção de pro-caspase-9, Fator de ativação de proteases apoptóticas (APAF-1) e citocromo-c forma o apoptossomo, que torna a caspase-9 ativa e consequentemente as caspases-7 e 3 (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

A apoptose de células sinoviais na AR foi inicialmente estudada em 1995, quando pesquisadores mostraram que a indução de apoptose na membrana sinovial pode regular a produção de citocinas inflamatórias, sugerindo que este mecanismo representa uma importante ferramenta terapêutica para AR. A redução experimental da população de macrófagos promove melhora da artrite induzida pelo colágeno em camundongos DBA1/J. O mecanismo de resistências das células sinoviais à apoptose não é completamente esclarecido, porém acredita-se que a alta expressão da proteína antiapoptótica FLIP tenha um papel central neste fenômeno. Por estas razões, vários autores têm considerado a indução de apoptose em macrófagos sinoviais uma importante estratégia para terapias futuras. Tomados em conjunto, estas informações

evidencia o potencial de pesquisa para novas terapias que promovam apoptose de macrófagos não só para AR como para o câncer. Assim sendo, o presente trabalho avaliou experimentalmente o efeito indutor de apoptose deste sistema carreador inovador – as LNC – carregadas com DIC sobre duas linhagens de macrófagos.

2.4 Macrófago na Artrite Reumatoide

Os macrófagos são numerosos na membrana sinovial (MS), sendo uma das principais células residentes na articulação inflamada, essas células participam de muitos eventos da inflamação, tais como, secreção de citocinas pró-inflamatórias, estimulação e recrutamento de leucócitos, proliferação de fibroblastos e secreção de proteases. Sua posição em toda a camada de revestimento e sub-revestimento na junção cartilagem-pannus, facilita seu papel mediando a destruição da cartilagem (KENNEDY et al., 2011).

Em adição a esse papel atribuído a esse tipo celular, descobriu-se que os monócitos/macrófagos são a origem da erosão óssea patológica na AR, pois apresentam excessiva diferenciação em osteoclastos, agravando ainda mais os danos causados pela doença (DAVIGNON et al., 2012).

Com base nesses achados sobre os macrófagos sinoviais (MØS) na AR, LI; HSU; MOUNTZ (2012) propõem que a causa central da AR é os fatores que inicialmente, levam a um aumento subclínica de macrófagos patogênicos, causando desequilíbrio local onde uma retroalimentação patogênica é mantida. Assim estas células passaram a ser estudadas durante a doença, observando seu respectivo aumento no número de células durante a doença ativa e sua redução significativa após tratamento eficaz (UDALOVA; MANTOVANI; FELDMANN, 2016).

Portanto, a supressão inicial dos macrófagos pode ser uma das abordagens terapêutica mais importante na AR, colocando essa célula como alvo terapêutico por apresentam correlação entre infiltração de MØS e progressão radiológica, eficácia no tratamento da doença após regulação negativa do sistema fagócito mononuclear e eficácia com terapias dirigidas a citocinas produzidas predominantemente por macrófagos (KINNE et al., 2000).

As terapias direcionadas aos macrófagos podem ser, realizadas por bloqueio dos fatores que promovem o desenvolvimento de macrófagos inflamatórios ou visando diretamente macrófagos patogênicos com agentes indutor de apoptose, assim

restabelecendo o equilíbrio funcional no ambiente inflamatório (LI; HSU; MOUNTZ, 2012).

2.5 Diagnóstico e Tratamento

A AR, mesmo sendo uma patologia tratada em ambulatórios, é uma doença de longa duração e alto custo no seu gerenciamento e monitoramento, fazendo o custo do tratamento um importante componente dos provedores de cuidado da saúde (MONTEIRO; ZANINI, 2008). Os custos relacionados à doença são elevados, que decorre tanto de fatores diretos (gastos com diversos medicamentos, alguns de alto custo) ou indiretos (perda de produtividade pessoal, pagamento de aposentadoria por invalidez, etc) (MOTA et al., 2012).

A Sociedade Brasileira de Reumatologia, através de sua Comissão de Artrite Reumatoide, sintetiza recomendações para o manejo da AR no Brasil, com enfoque no diagnóstico e avaliação inicial da doença (MOTA et al., 2011). O diagnóstico da AR é estabelecido considerando-se achados clínicos e exames complementares. Nenhum teste isolado, seja laboratorial, de imagem ou histopatológico, confirma o diagnóstico (MOTA et al., 2013).

No estágio inicial da doença é difícil realizar um diagnóstico, pois as queixas iniciais são graduais e súbitas, e os sintomas podem diminuir, assim retardando uma procura médica pelos pacientes (CHECHI, CASTRO e SANTOS, 2011).

Os médicos normalmente solicitam provas de atividade inflamatória (Velocidade de Hemossedimentação - VHS e Proteína C Reativa - PCR), fator reumatoide (presente em 80% dos pacientes, não excluindo e nem identificando a doença), análise de líquido sinovial, exames radiológicos e no exame físico (CHECHI, CASTRO e SANTOS, 2011). Contudo a *American College of Rheumatology* definiu critérios para o diagnóstico da AR, tais como: rigidez matinal; artrite em três ou mais áreas articulares; artrite nas articulações da mão; artrite sistêmica por pelo menos seis semanas; nódulos reumatoides; Fator reumatoide sérico; alterações radiológicas, sendo necessário a presença de quatro critérios para classificar um pacientes (BADER, 2012).

É inegável que a compreensão da fisiopatogênica da AR, de seus métodos diagnósticos e do manejo terapêutico sofreram consideráveis avanços nos últimos anos, destacando-se a importância dada ao período inicial da doença, a chamada AR inicial (primeiros 12 meses de sintomas da doença) reconhecidamente uma “janela de oportunidades terapêutica” (MOTA et al., 2013).

Os pacientes diagnosticados com AR devem iniciar o tratamento o mais previamente possível, com o objetivo de reduzir a atividade inflamatória da doença e até mesmo a remissão dos sintomas (ALMEIDA; ALMEIDA; BERTOLO, 2014). Tratamentos farmacológicos são a principal terapia para pacientes com AR ativa, objetivando induzir a remissão clínica e inibir a progressão de danos articulares estruturais e funcionais (BADER, 2012).

O tratamento inclui drogas AINE e Glicocorticoides (CGs) em baixa dosagem ou intra-articular e, principalmente, DMCD e agentes imunobiológicos (GOELDNER et al., 2011). O objetivo de controlar e prevenir a lesão articular, diminuindo a perda de função articular e diminuir a dor, melhorando a qualidade de vida dos pacientes, pois a remissão completa raramente é alcançada (LAURINDO et al., 2004). Portanto, as DMCD são o núcleo do tratamento porque retardam a progressão da doença e taxa de progressão radiográfica (GABRIEL; TUGWELL; DRUMMOND, 2002; MONTEIRO; ZANINI, 2008). Entretanto existe um nicho de pacientes que, mesmo com associações de DMCD convencionais não apresentam boas respostas, precisando assim de outros medicamentos para melhorar os sintomas (BERTOLO et al., 2014).

Isso fez o tratamento para doenças reumatológicas mudar bastante nos últimos 10 a 15 anos, com as terapias chamadas Imunobiológicos, sendo denominadas assim por ser moléculas orgânicas de alto peso molecular de origem biológica, em geral, os substratos utilizados são as imunoglobulinas ou anticorpos. Porém uma maior eficácia e com maior especificidade justifica o custo alto (BERTOLO et al., 2014).

No controle da dor e de processo inflamatório articular, são usados os AINE em doses baixas de CGs. Estes podem ser utilizados de forma intermitente, particularmente em pacientes com doenças de difícil controle ou enquanto se aguarda a ação das DMCD, considerando que são drogas de ação lenta (LAURINDO et al., 2004).

2.6 Importância do Diclofenaco no Tratamento da Artrite Reumatoide

A AR foi originalmente tratada com AINE, como a aspirina e outros salicilados, os quais atuam como anti-inflamatórios inibindo a atividade das enzimas Ciclooxigenase (COX) e, conseqüentemente, reduzem a produção de eicosanoides pro-inflamatórios mediadores importantes da resposta inflamatória aguda e crônica. Apesar de sua pouca efetividade, no que diz respeito à redução do dano radiológico, continuam a ser utilizados no tratamento da AR para alívio dos sintomas da inflamação, mas em

associação com DMCD e imunobiológicos (MOTTRAM, 2003). Entretanto, o uso prolongado destas medicações está associado à complicações cardiovasculares e gastrointestinais, assim como perda progressiva de função renal (POUNTOS et al., 2011). Diversos mecanismos são propostos para explicar a toxicidade digestiva dos AINE (MULLER et al., 2004).

O uso dos medicamentos AINE aumenta o risco de Úlcera Péptica (UP) e erosões gastroduodenais, que têm como complicações a hemorragia digestiva e a morte. O risco de complicações gastrintestinais é de 4 a 5 vezes menor na população que não consome AINE (CHARRUA, 2010).

Segundo BITTENCOURT (2011), outros estudos concluíram que o risco de hepatotoxicidade induzida por AINE é muito pequena, sendo a incidência de lesão no fígado de 1,7 por 100.000 indivíduos expostos, sendo sua taxa maior em pessoas acima de 75 anos. Entretanto, quando considerados apenas os AINE aprovados e em uso no mercado, o DIC é a droga associada ao maior risco de dano hepático (BITTENCOURT, 2011). Além disso, outros autores observaram o aumento de risco cardiovascular associados ao Rofecoxib e DIC, destacando-se que mesmo pessoas saudáveis têm risco maior de doenças cardiovasculares quando tomam AINE em particular o DIC (SCHJERNING OLSEN et al., 2013).

De acordo com KATZUNG (2007) , todos os AINE podem ser encontrados no líquido sinovial após administração repetida. Os fármacos com meia-vida curta permanecem nas articulações por mais tempo do que o previsto por sua meia-vida, enquanto os fármacos com meia-vida mais longas desaparecem do líquido sinovial em uma faixa proporcional à sua meia-vida. O DIC é um AINE com a meia vida de apenas 1,1 h, sendo bastante utilizado na AR por concentra-se na membrana sinovial.

O DIC é derivado do ácido fenilacético, o acetato de 3-(2,6 dicloroanilino)-fenil, sendo normalmente encontrado como sais de sódio e potássio (MINETTO, 2009). É uma droga AINE muito usada na terapia clínica, porque inibe a COX, enzima envolvida na síntese de eicosanoides pro-inflamatórios, relacionados à inflamação (ALBANO et al., 2013), portanto, largamente prescrito para o tratamento coadjuvante da AR, da osteoartrite, de lesões musculoesqueléticas e analgesia pós-cirúrgica (EMAMI; GHASSAMI; TALARI, 2007). Entretanto, o uso do DIC tem sido restringido no presente em razão de sua toxicidade hepática, gástrica, renal e cardiovascular (MCGETTIGAN; HENRY, 2013). Por este motivo, o desenvolvimento de formulações com melhor índice terapêutico tais como nanopartícula de DIC baseadas em PGLA e LNCs tem obtido

grande interesse na literatura (COOPER; HARIRFOROOSH, 2014; OLIVEIRA et al., 2012b).

A toxicidade do DIC é bastante estudada em ensaios celulares *in vitro*. Encontramos na literaturas diversos trabalhos com diferentes linhagens células (Quadro 1), onde demonstrou-se o efeitos apoptóticos do fármaco sobre linhagens distintas (AMANULLAH et al., 2016; CECERE et al., 2010; FREDRIKSSON et al., 2011; GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003a; HASSAN et al., 2014; INOUE et al., 2004; VALLE et al., 2013; YAMAZAKI et al., 2006). Porém nenhum estudo foi encontrado avaliando a toxicidade sobre macrófagos. Acredita-se que a toxicidade do DIC esteja relacionada à produção intracelular de ROS (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003b), redução do potencial de membrana mitocondrial com indução de apoptose e fragmentação do DNA (HICKEY et al., 2001). Entretanto, evidencia recente mostrou que o DIC causa disfunção no sistema intracelular do proteassoma, causando estresse citoplasmático e apoptose pela via mitocondrial, sendo a fragmentação do DNA um epifenômeno da apoptose (AMANULLAH et al., 2016)

O macrófago apresenta um papel importante em diversas doenças metabólicas, estando relacionado à fisiopatologia da AR como fonte de citocinas próinflamatórias na membrana sinovial (CHAWLA; NGUYEN; GOH, 2011; POPE, 2002b), assim aumentando nosso interesse nessa tipo celular.

Linhagem	Autor
HepG2 (Cancro do fígado humano)	(FREDRIKSSON et al., 2011; GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003a)
HL-60 (Leucemia promielocítica humano)	(INOUE et al., 2004)
SH-SY5Y (Neuroblastoma humano)	(CECERE et al., 2010; YAMAZAKI et al., 2006)
Células de Adenocarcinoma de Ovário Humano - HEY (<i>In vivo</i> – xenoenxerto)	(VALLE et al., 2013)
DLBCL (Linfoma de células do manto humano)	(HASSAN et al., 2014)
A549 (Células epiteliais basais de adenocarcinoma alveolar humano)	(AMANULLAH et al., 2016)

Quadro 1 – Estudos com toxicidade celular *in vitro* induzida por diclofenaco em diferentes linhagens celulares e células derivadas de tecidos

2.7 Sistema de Liberação Controlada (“Drug Delivery Systems”)

Sistemas carreadores nanoparticulados permitem carregamento e encapsulação de fármacos sem modificação, como acontece para conjugados polímero-drogas. As partículas coloidais podem variar em tamanho de 10nm a 1µm, mas tipicamente apresentam tamanho entre 20 e 300nm, minimizando a captura pelo sistema reticulo-endotelial, porém permitindo o direcionamento passivo para tecidos inflamados, onde há aumento da permeabilidade vascular (Figura 1). Lipossomas, micelas, nanopartículas metálicas, além de nanopartículas poliméricas, constituem-se nos sistemas carreadores de drogas mais comuns (JAIN, 2008).

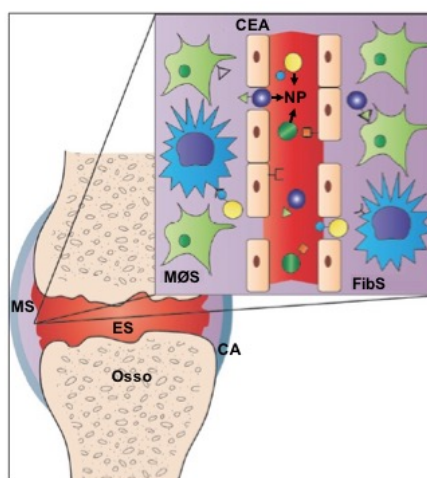


Figura 1. Membrana sinovial inflamada na Artrite Reumatoide. CEA – células endoteliais ativadas com aumento de permeabilidade. FibS – Fibroblastos sinoviais. MØS – Macrófagos Sinoviais. MS – Membrana sinovial. ES – Espaço sinovial. CA – Capsula sinovial. A figura representa o direcionamento passivo de nanopartículas (NP) através do endotélio ativado (Adaptado de BADER R. A., 2012)

Os lipossomas são vesículas formadas por uma bicamada de fosfolipídeos com núcleo aquoso (Figura 2). Consequentemente, os lipossomas são usados para encapsulamento tanto de drogas com caráter hidrofóbico, como de caráter hidrofílico, na dupla camada lipídica ou no centro aquoso, respectivamente (JAIN, 2008). Embora os lipossomas convencionais sejam rapidamente capturados pelo sistema reticuloendotelial, a incorporação de polímeros como Poly (etilenoglicol) (PEG) permite incrementar o tempo das partículas na circulação. Como consequência, os lipossomas têm sido amplamente estudados com intuito de melhorar a farmacologia das drogas utilizadas em reumatologia (BADER, 2012).

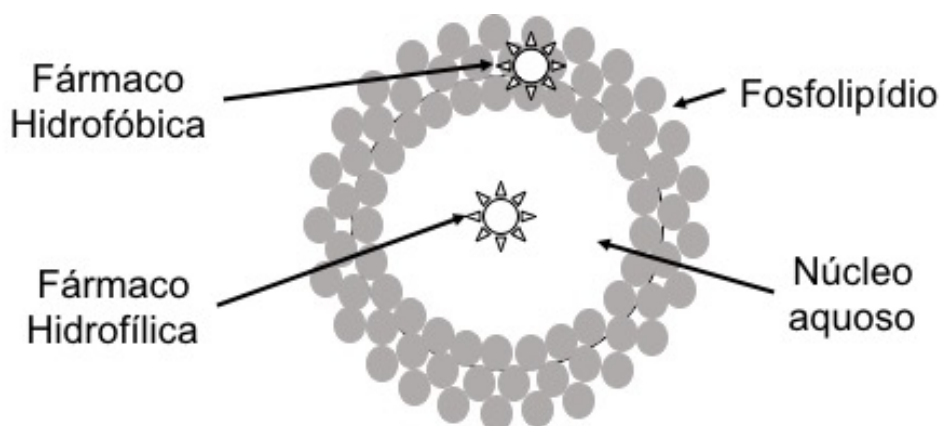


Figura 2. Sistema Carreador Nanoparticulados – Lipossoma.

As nanopartículas (inclui nanocápsula e as nanoesferas) são diferenciadas por sua composição e organização estrutural (Figura 2). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à sua parede polimérica. Já as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco fica retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003).

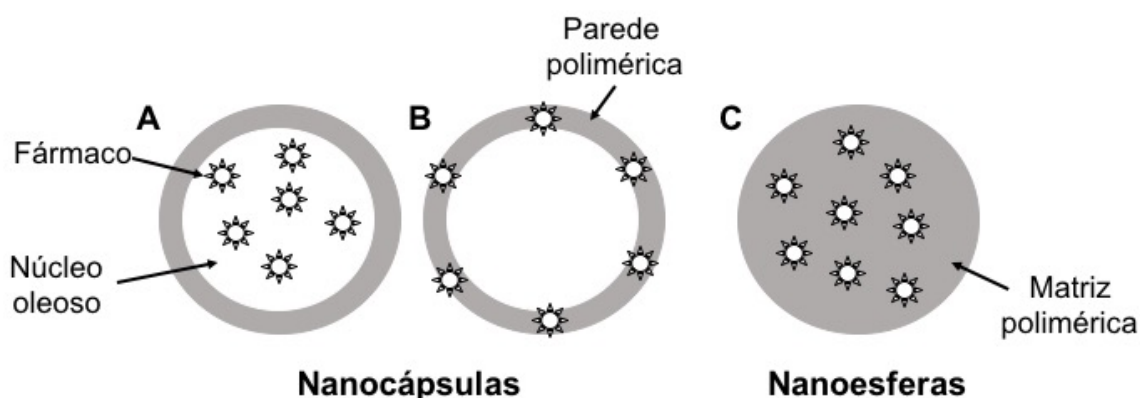


Figura 3: Representação esquemática de Nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: **A:** fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; **B:** fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; **C:** fármaco que pode estar retido ou adsorvido na matriz polimérica das nanoesferas.

Várias preparações têm sido propostas como sistemas Drug Delivery para o câncer e, mais recentemente, o uso desses sistemas tem crescido incrivelmente em pesquisa na tentativa de melhorar os aspectos farmacológicos de Drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) na Artrite Reumatoide. Diversas formulações como lipossomas, nanopartículas, micelas, conjugados droga-macromolécula, tem sido usados para aumentar a estabilidade das drogas na circulação, bem como sua acumulação, passiva ou ativa, nos sítios de inflamação (BADER, 2012). Bader (2012) demonstrou que

isto tem aumentando tanto a especificidade como a eficácia terapêutica, em modelos experimentais, mas também em estudos com humanos têm mostrado a eficiência desta abordagem.

Os trabalhos pioneiros de (WILLIAMS et al., 1986) e (WILLIAMS et al., 1987) tiveram papel importante no desenvolvimento de sistemas nanoparticulados em reumatologia, porque demonstraram que lipossomas marcados com tecnécio podem acumular-se na membrana sinovial depois da administração endovenosa, abrindo a perspectiva do uso destes sistemas para melhorar a farmacologia de DMCD usados em reumatologia (POLETO et al., 2012). Posteriormente, demonstrou-se que o metotrexato (MTX) – importante DMCD para tratamento da AR – na forma lipossomal, preparado por conjugação com ácido carboxílico- γ , foi capaz de reduzir significativamente a inflamação estabelecida na membrana sinovial, com redução de sua toxicidade (WILLIAMS et al., 1994).

Outras iniciativas com sistemas carreadores de MTX foram tentadas, como o Phosphogliv – micelas lipídicas carregadas com MTX (ZYKOVA et al., 2008). Outro sistema proposto foi o conjugado MTX-albumina (WUNDER et al., 2003). Em razão da pouca lipossolubilidade do MTX, sistemas lipídicos, em geral não atingem concentração maior que 20-50% da droga na fase sólida, o que limitou os estudos com o MTX (OLIVEIRA et al., 2012a).

Na última década, um novo sistema drug-delivery contendo um núcleo organogel formado por uma dispersão de monoestearato de sorbitano em triglicerídeos de cadeia média, revestido por uma parede polimérica de poly(ϵ -caprolactona) (PCL) e estabilizado com micelas de polysorbato 80 (FIEL et al., 2013; JÄGER et al., 2009; POLETO et al., 2015; VENTURINI et al., 2011), tendo sido denominado nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC). As LNC tem sido utilizada como sistema carreador de fármacos com resultados promissores. A indometacina carregada em LNC demonstrou-se antitumoral para glioblastoma (BERNARDI et al., 2013), redução da artrite induzida por adjuvante e da hemorragia digestiva relacionada à indometacina (BERNARDI et al., 2009), e inibição da doença de Alzheimer experimental por reduzir atividade inflamatória induzida pela proteína amiloide (BERNARDI et al., 2012). A formulação dietyl ester de metotrexate e tretinoína apresentou atividade antitumoral mesmo em células de câncer resistentes à quimioterapia (SCHULTZE et al., 2014; YURGEL et al., 2014).

As LNC têm grande estabilidade nos fluidos corporais e, em razão da sua escala nanométrica, concentram-se nos tecidos inflamados e razão da alta permeabilidade do tecido endotelial inflamado. Além disso, são avidamente fagocitadas por macrófagos,

promovendo a concentração do fármaco encapsulado nos espaços subcelulares (POLETTTO et al., 2012). **Também foram desenvolvidas formulações propondo a modificação da molécula de MTX e DIC com esterificação, conseguindo a concentração de 60-90% de concentração dos fármacos na fase sólida (OLIVEIRA et al., 2012b).** Portanto, um dos usos potenciais das LNC é a sua associação com fármacos AINE, como o DIC com objetivo de melhorar seu perfil farmacológico (SCHAFFAZICK et al., 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

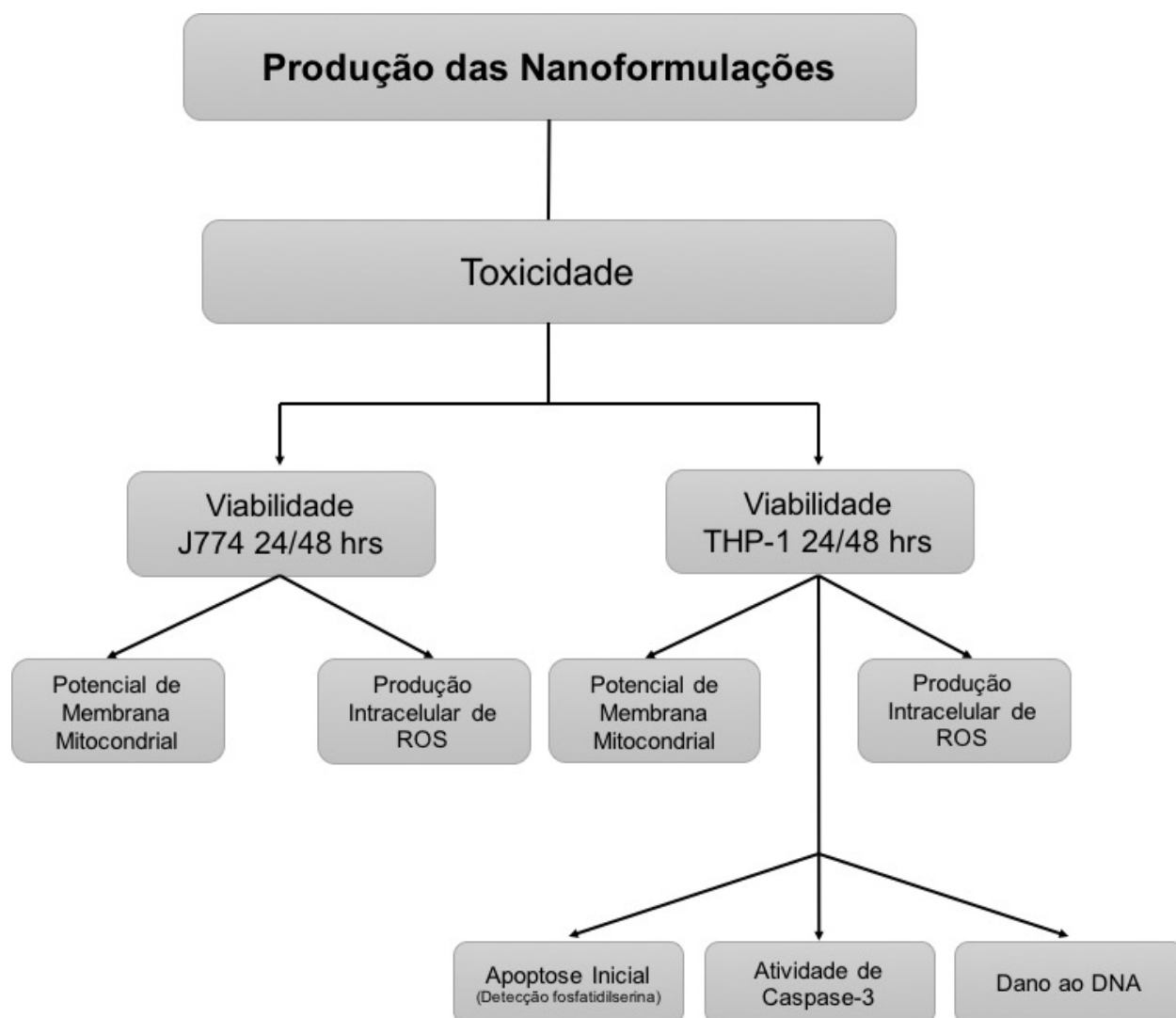
Avaliar o efeito apoptótico de Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregadas com Diclofenaco sobre Macrófagos em cultura.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade celular in vitro das formulações nanoencapsuladas;
- Avaliar o efeito das formulações sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio;
- Avaliar os efeitos das nanocápsulas sobre o potencial de membrana mitocondrial e danos moleculares ao DNA;
- Avaliar o efeito das formulações na morte celular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo (fluxograma)



4.2 Preparo das formulações de Nanocápsulas de Núcleo Lipídico (LNC)

As LNC contendo DIC foram cedidas pelo grupo de pesquisa das Professoras Dra. Adriana Raffin Pohlmann, do Instituto de Química e da Dra. Silvia Stanisçuaski Guterres, da Faculdade de Farmácia, ambas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As formulações foram produzidas por precipitação do polímero pré-formado (BOECHAT et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2012a) a composição descrita na Tabela 1, e evaporadas à pressão reduzida até o volume final indicado. Para este trabalho, a quantificação de fármacos nas formulações foi procedida como controle de qualidade.

Tabela 1: Composição das nanocápsulas de núcleo lipídico.

Matéria-prima	LNC	LNC-DIC
Poli(ε)copolactano	0,100g	0,100g
Monoestearato de sorbitano	0,038g	0,038g
Triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico	0,160g	0,160g
Diclofenaco ácido	-----	0,010g
Acetona	27mL	27mL
Polissorbato 80	0,077g	0,077g
Água ultrapura	53mL	53mL
Volume final após evaporação	10mL	10mL

Foi utilizada a técnica de difração de laser (teoria Mie de espalhamento de luz), para análise de distribuição de tamanho das partículas das formulações produzidas. A determinação do teor do DIC ácido na formulação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo os métodos descritos por OLIVEIRA et al., (2012).

4.3 Linhagens celulares de Macrófagos

4.3.1 Linhagem J774

A linhagem celular de macrófagos murinos Balb/c J774 foi doado pelo Dr. Carlos Antério Sorgi, pesquisador na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. As células foram cultivadas em atmosfera úmida, a 37°C, contendo 5% de CO₂, em meio Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco®,

Life Technologies, EUA) suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, Life Technologies, EUA), 2mM de L-glutamina, penicilina/estreptomicina a 1% (Gibco®, Life Technologies, EUA). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 100.000 células/poço e incubada por 2 horas para aderência.

4.3.2 Linhagem THP-1

A linhagem celular de monócitos humanos THP-1 foram cultivadas em atmosfera úmida, a 37°C, contendo 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies, EUA) suplementados com 10% de SFB (Gibco®, Life Technologies, EUA), (1%) 2mM de L-glutamina, penicilina/estreptomicina a 1% (Gibco®, Life Technologies, EUA). Para induzir a diferenciação dos monócitos em células aderentes, macrófagos, as células foram ressuspensas em meio fresco contendo forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) a 200ng/mL. As células foram plaqueadas em placas de 24, 48 e 96 poços, a uma densidade de 1.000.000, 300.000 e 100.000 células/poço respectivamente e incubadas por 48 horas. Os macrófagos foram lavados com meio fresco e deixado em repouso durante 2 dias, com troca de meio diariamente.

4.4 Teste de viabilidade Celular (MTT)

O método de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma, Brasil) foi realizado conforme metodologia descrita por KORZENIEWSKI; CALLEWAERT (1983) modificada, fornecendo assim uma medida quantitativa das células com número metabólico de mitocôndrias ativas. Esse método se baseia na redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT, por enzimas mitocondriais resultando em cristais de formazana, cuja absorbância pode ser determinada por medição espectrofotométrica.

Células THP-1 e J774 foram tratadas com 1, 10, 100 e 1000µM de DIC e LNC-DIC durante 24 e 48 h. Os controles foram tratados com Dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,1% ou nanocápsulas descarregado com a droga. Após o período de tratamento, o meio contendo as titulações foram removidos e as células foram lavadas duas vezes com 100µL de Tampão Fosfato-Salino (PBS) 1X. Após a remoção do PBS, adicionou-se 90µL de meio de cultura RPMI ou DMEM e 10µL de MTT (5mg/mL) nos poços. As células foram incubadas durante 3h e a solução foi, em seguida, removida. Adicionou 100µL de

DMSO e a placa foi deixada por 20 minutos sobre agitação, para total dissolução dos cristais de formazana.

A leitura foi feita em leitor de ELIZA, com absorvância de 560nm. Sendo linearmente proporcional ao número de células vivas. A viabilidade celular foi calculada usando a equação: Viabilidade celular em % = $(\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 100 / \text{Abs}_{\text{controle}})$, onde a $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a Absorvância de células tratadas com as formulações de estudo e $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorvância das células controle (células apenas com meio).

4.5 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Os níveis de ROS intracelular foram analisados através da sonda fluorescente 2'7'-Acetato Diclorofluoresceína (DCFDA, Sigma, Brasil) (NICHOLSON et al., 2016). Após os tratamentos das células J774 e THP-1 com as formulações, por 24 e 48 horas, respectivamente, DCFDA (25 μ M) foi adicionado às culturas por 45 minutos, a 37°C em 5% de CO₂, ao abrigo da luz. O DCFDA difunde-se pela membrana celular e é hidrolisado por esterases intracelulares, formando a diclorofluoresceína (DCF, não fluorescente), que reage com H₂O₂ intracelular, formando a diclorofluoresceína oxidada (oxDCF, fluorescente). As placas foram raspadas e os níveis de fluorescência foram medidos em leitora (ChameleaoTM V Multitechnology Plate Reader), emissão de 450nm e 535nm.

4.6 Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

O Iodeto de 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3)) (Sigma, Brasil) é um corante lipofílico que permite avaliar o potencial das membranas citoplasmática e mitocondrial gerada pela diferença de concentração de iões no interior e exterior das membranas, método adaptado de VAYSSIERE et al. (1994). Os experimentos foram realizados em duas linhagens de células (J774 e THP-1), após o tratamento com as formulações (24 e 48 horas), as células foram incubadas com DiOC6 (2 μ M) em estufa por 12 minutos. As células foram retiradas da placa (raspagem) e lavadas 3x com 100 μ L de PBS 1X, os níveis de fluorescências foram medidos em leitora ChameleaoTM V Multitechnology Plate Reader, emissão de 450nm e excitação 500nm.

4.7 Efeito das nanoformulações na marcação das células com Anexina V

A detecção de apoptose em células tratadas com nanoformulações foi realizada por marcação celular de Anexina V/APC (DB Pharmingen™). Um marcador muito utilizado na marcação de células apoptóticas (VERMES et al., 1995). A Anexina V possui afinidade pelo fosfolípide de membrana fosfatidilserina que se encontra na parte interna da membrana celular, sendo exposto apenas durante o estágio inicial da apoptose .

As células THP-1 ativadas foram cultivadas em placas de 24 poços, numa densidade de 1×10^6 células/poço, utilizados os seguintes estímulos: Staurosporine (Stau) 5 μ M (Sigma, Brasil) (controle positivo), as formulações em duas concentrações: 75 μ M e 150 μ M e apenas meio nos poços de controle negativo, por 48h. As células foram retiradas da placa e transferidas para tubos de citometria, lavadas duas vezes com PBS 1X gelado e fixadas com paraformaldeído 2% (20 minutos a 4°C). As amostras foram lavadas novamente (2x) e marcadas com Anexina V/APC (3 μ L). As amostras foram incubadas por 45 minutos em estufa a 37°C, ao abrigo da luz. As amostras foram lavadas e analisadas em citometria de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Manaus/AM e analisadas em software FlowJo 8.7.

4.8 Atividade de Caspase-3

A ativação de Caspase-3 desempenha um papel central no processo apoptótico. Para a detecção de ativação da Caspase-3 nas células tratadas com as formulações, foi utilizado o kit de coloração PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit da BD.

O ensaio faz uso de anticorpos anti-caspase-3 ativa conjugada individualmente, com o corante PE, marcador fluorescentes *in situ*. Marcador permeável a células, não apresentando características tóxicas, se ligam à Caspase-3 ativada em células que estão em processo de apoptose. O marcador PE permite sua detecção por citometria de fluxo.

Para o ensaio, foram plaqueadas 1×10^6 células/poço (THP-1) em placa de 24 poços, as células foram tratadas: com meio (controle negativo), Stau. 5 μ M (controle positivo) e as formulações de teste (DIC 75 e 150 μ M, LNC-DIC 75 e 150 μ M e LNC) durante 48 h. Após os tratamentos, as células foram retiradas da placa e transferidas para tubos de citometria, lavadas e marcadas seguindo recomendações do fabricante. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS 1X e analisadas em citometria de fluxo *FACSCanto™ II* (BD Bioscience) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Manaus/AM. Para detecção da proteína ativa nas células foi utilizado o programa *FlowJo* (v8.7).

4.9 Ensaio Para Detecção de Danos no DNA (Cometa Alcalino)

O ensaio do teste do cometa, ou ensaio de eletroforese em gel de célula única, é uma técnica para detecção rápida e quantitativa de dano no DNA a partir de células individuais, a técnica corresponde a um ensaio de grande sensibilidade para a detecção de vários tipos de danos no DNA, tais como quebra de fitas duplas ou simples, danos oxidativos e ligações cruzadas.

O experimento com a versão do teste do cometa Alcalino foi feito em pH alcalino conforme metodologia descrita por SINGH et al., (1988) modificada. As células foram plaqueadas em placa de 48 poços, numa densidade de 3×10^5 células por poço, foi tratada com PMA (200ng/mL) por 48 horas e deixada em repouso por dois dias com troca de meio diário (RPMI completo). Após o preparo das placas, as células foram tratadas com as formulações nas concentrações definidas: 75µM e 150µM, Doxorrubicina (DOXO) 63µM (Controle Positivo) e Meio (Controle Negativo) durante 48 h.

As células foram retiradas da placa após o prazo de incubação e centrifugadas, o pellet foi ressuspenso em agarose baixo ponto de fusão (LMP) (Invitrogen) e transferido para lâminas de microscópio pré-coberta com agarose ponto de fusão normal (NMP) (Invitrogen). Após a solidificação, as lâminas ficaram em solução de lise por 1 hora, para ocorrer a desnaturação da parede celular e nuclear, restando o DNA ocupando o espaço que antes seria o núcleo celular. As lâminas foram colocadas em solução de neutralização e deixadas por 15 minutos em temperatura de 4°C.

Após esse período as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese preenchida com solução de eletroforese (Cometa Alcalino) por 20 minutos para permitir o desempacotamento do DNA. A eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 20 minutos, a 20V e com corrente de 300mA. Posteriormente, colocou-se as lâminas em solução de neutralização por 15 minutos, para retirar a alcalinidade, em seguida as lâminas serão secas e fixadas com etanol 100%.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (EQUIPAMENTO), em filtro GFP-L, objetiva de 20x, utilizando 40µL de Sybr Green (Invitrogen, By Life Technologies). Analisou-se um total de 150 células por lâmina (três contagens de 50), a

análise foi feita pelo padrão de escore (que vai de 0-4) (Figura 4) de acordo com tamanho e intensidade da cauda do cometa, que representa o nível de fragmentação de DNA, indicando o grau de lesão sofrido pelas células.

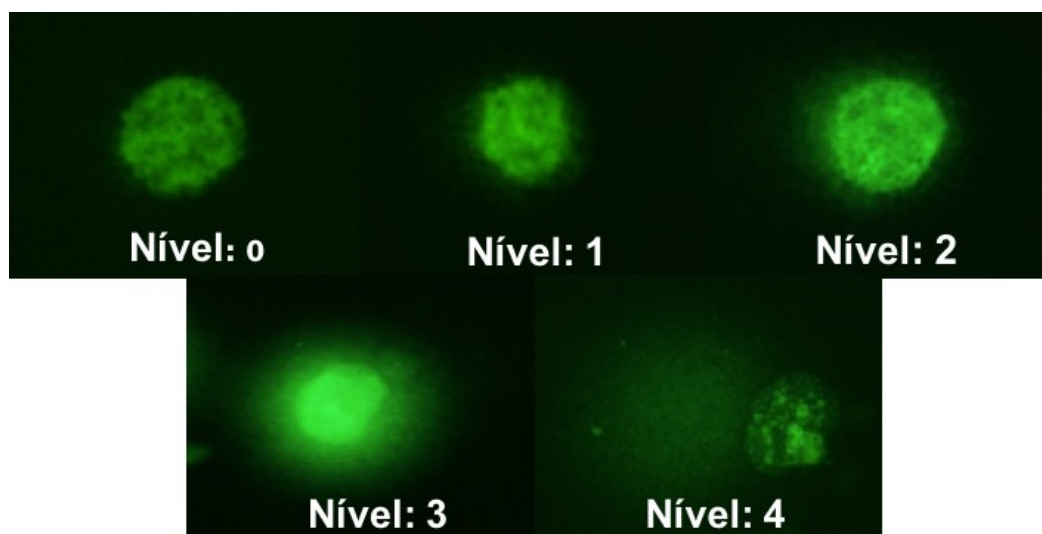


Figura 4: Classificação de cometas em Níveis de danos.

4.10 Análise Estatística

Os dados foram descritos como média e desvio padrão. A Concentração Inibitória 50% (IC50%) para cada formulação foi obtida por regressão não-linear, utilizando-se o teste de D'Agostino & Pearson para avaliar a normalidade das curvas obtidas. Quando duas formulações foram analisadas simultaneamente quanto as IC50%, as curvas foram comparadas com Critério Informativo de Akaike (AIC) e pelo teste da Soma dos Quadrados (teste F). Para comparação de múltiplas médias foi aplicada ANOVA de 1 fator (One-Way ANOVA), com análise post-hoc pelo Teste de Tukey com correção de Bonferroni.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das Nanopartículas

As formulações de LNC E LNC-DIC apresentam-se como um líquido leitoso com diâmetro $D_{4,3}$ (nm), expressos na Tabela 2, com de $D_{4,3} < 319$ para ambas as formulações. O teor de fármaco da formulação LNC-DIC foi de $1,04 \pm 0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$. Para o novo lote de LNC preparadas a determinação de teor dos fármacos foi procedida como método de controle de qualidade.

Tabela 2: Diâmetro médio de volume $D_{4,3}$.

Formulação	Diâmetro $D_{4,3}$ (nm)
LNC-Branca	245
LNC-DIC	319

Para determinação de teor dos fármacos (Tabela 3), foi construída uma curva de calibração, sendo a solução-mãe de DIC (500g/mL) e as diluições subsequentes foram preparadas em acetonitrila. Ambos mostraram-se em distribuição linear no intervalo de 2,5 – 15g/mL ($r^2=0,99$). LNC-DIC: 100 μ L da formulação foi tratada com acetonitrila (B. V. 10mL). Sendo a solução filtrada (Millipore, 0,45 μ m) e analisadas quanto ao teor de fármaco por CLAE.

Tabela 3: Teor do fármaco nas formulações.

Formulação	Teor do Fármaco
LNC-DIC	1,04 mg/mL

5.2 Teste de viabilidade celular utilizando duas linhas de macrófagos

As formulações foram utilizadas no tratamento das duas linhagens de estudo e em seguida submetidas ao ensaio de MTT para avaliar a redução da viabilidade celular em uma curva com quatro concentrações: 1, 10, 100 e 1000 μ M por 24 e 48 horas. Todas as formulações utilizadas apresentaram toxicidade, porém LNC-DIC apresentou maior toxicidade em ambas as linhagens de células (Figura 5, 6). Os valores calculados de IC50% para DIC e LNC-DIC foram, respectivamente, 877,2 μ M ($r^2=0,87$) e 460,4 μ M ($r^2=0,88$) em 24 horas e 646,2 μ M ($r^2=0,63$) e 144,5 μ M ($r^2=0,30$) em 48 horas (Figura 6).

A linha celular J774 se mostrou mais sensível a ambas as drogas testadas (Figura 5), com IC50% em 24 horas calculadas para DIC em 306,6 μM ($r^2=0,84$) e LNC-DIC 118 μM ($r^2=0,93$). Em 48h os valores obtidos para IC50% das formulações sobre J774 foram 251,7 μM ($r^2=0,94$) e 24,35 μM ($r^2=0,94$). Baseados nos valores obtidos para as IC50% das formulações DIC e LNC-DIC, foram utilizadas nos experimentos de apoptose as concentrações de 75 μM e 150 μM para células THP-1 e 65 μM e 130 μM para células J774.

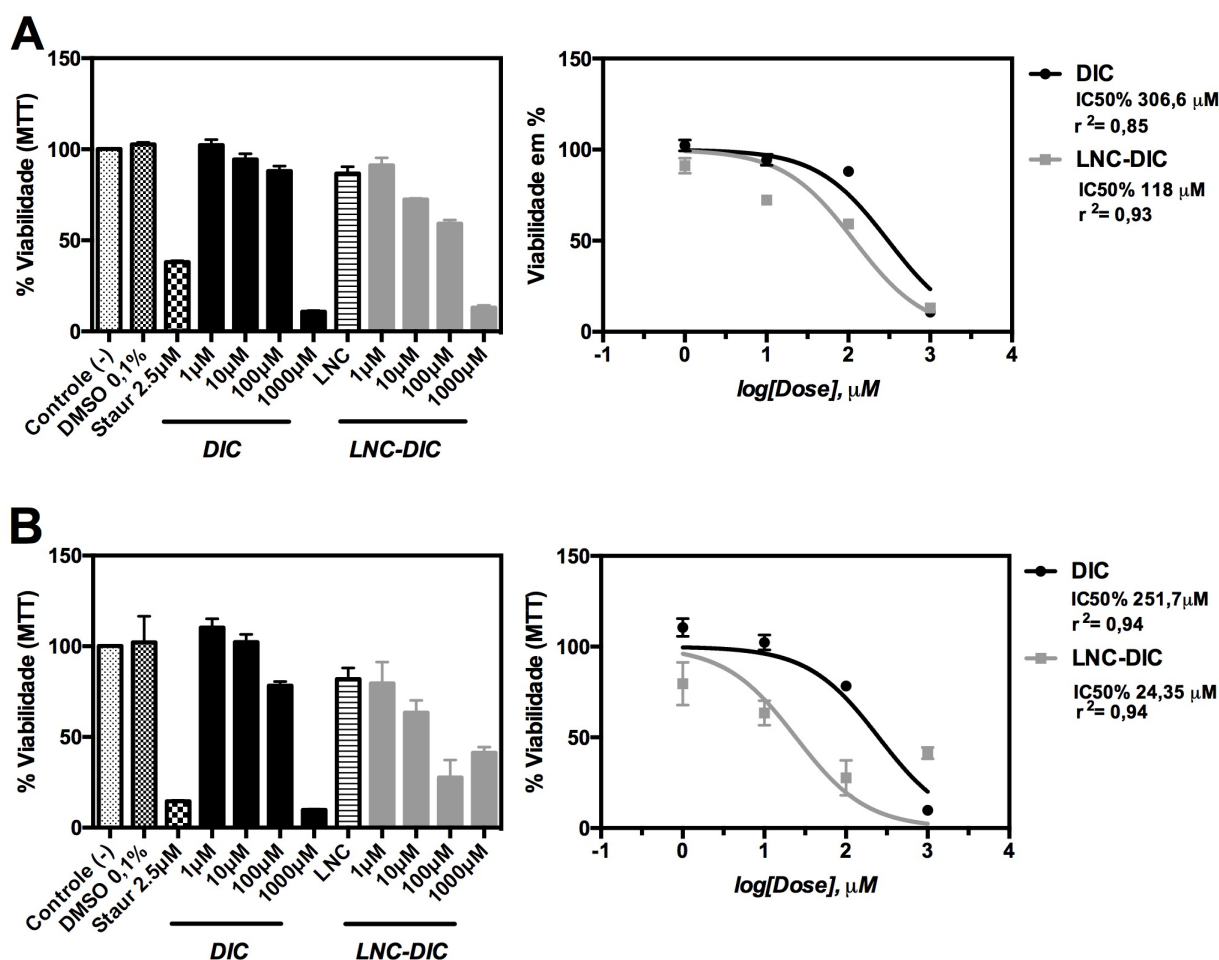


Figura 5: Teste de viabilidade celular e determinação IC50% pelo método de MTT em células J774 numa concentração de 1×10^5 /poço, foi utilizado-se meio e DMSO como controle negativo, Staurosporine 2,5 μM controle positivo. O experimento foi feito em dois tempos (**A**= 24 horas e **B**= 48 horas) com quatro concentrações (1 μM , 10 μM , 100 μM e 1000 μM). **A:** Com 24 horas houve diferença significativa entre as formulações, IC50% de DIC 306,6 μM ($r^2=0,84$) e LNC-DIC 118 μM ($r^2=0,94$). **B:** 48 horas houve uma diminuição no IC50% de ambas as formulações, DIC 251,7 μM ($r^2=0,94$) e LNC-DIC 24,35 μM ($r^2=0,94$).

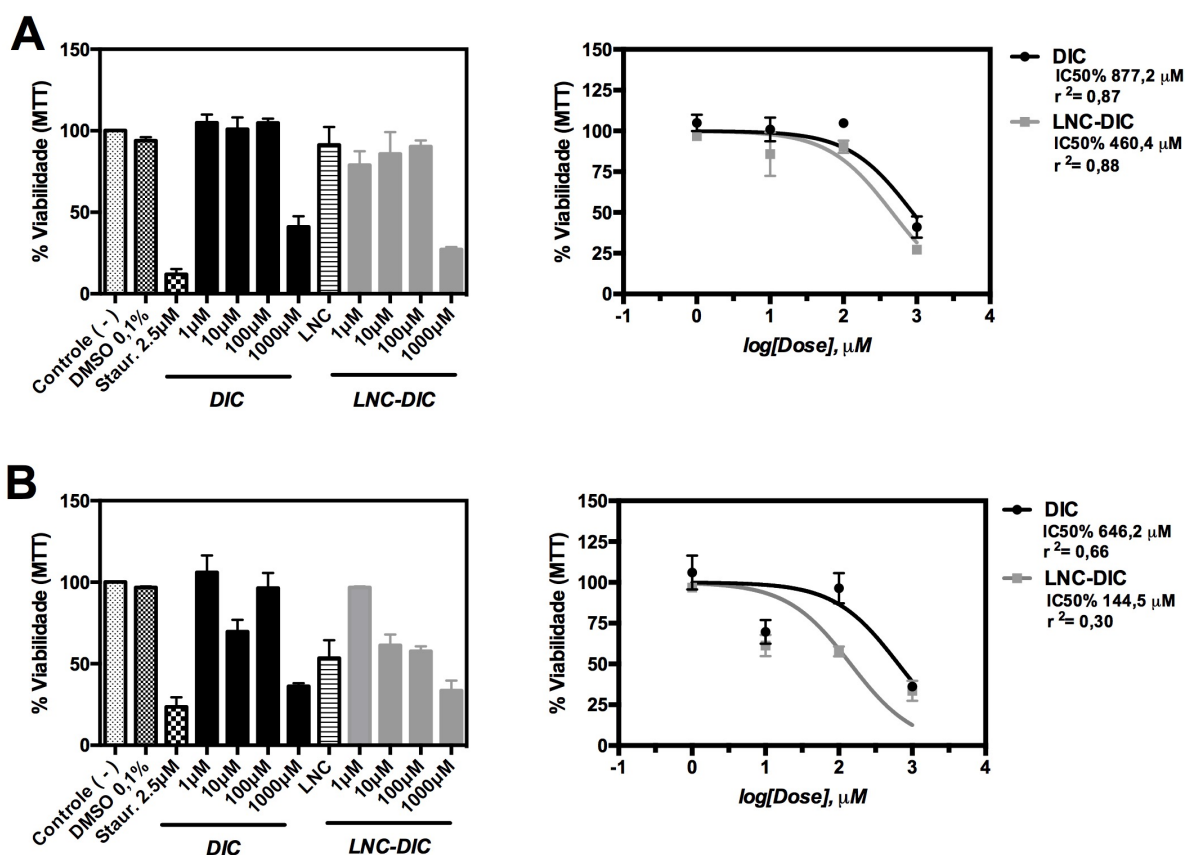


Figura 6: Teste de viabilidade celular e determinação IC50% pelo método de MTT em células THP-1 numa concentração de 1×10^5 /poço, utilizou-se meio e DMSO como controle negativo, Stau. 2,5 μM controle positivo. O experimento foi feito em dois tempos (**A**= 24 horas e **B**= 48 horas) com quatro concentrações (1 μM , 10 μM , 100 μM e 1000 μM). **A:** Em 24 horas houve diferença significativa entre as formulações, IC50% de DIC 877,2 μM ($r^2=0,87$) e LNC-DIC 460,4 μM ($r^2=0,88$). **B:** 48 horas houve uma diminuição no IC50% de ambas as formulações, DIC 646,2 μM ($r^2=0,63$) e LNC-DIC 144,5 μM ($r^2=0,30$).

5.3 Produção de ROS intracelular após tratamento com Nanoformulações

O DIC induz toxicidade aumentando a produção intracelular de ROS (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003b). Por esse motivo foi avaliado a produção intracelular de ROS com DCFDA nas linhagens de macrófagos após 24h e 48h de tratamento. Observa-se na Figura 7 que a formulação LNC-DIC induz maior produção intracelular de ROS em relação a formulação padrão em THP-1 nas concentrações 75 μM ($14,14 \pm 2,69$, $30,33 \pm 3,90$; $p < 0,0001$) e 150 μM ($27,24 \pm 0,90$, $36,88 \pm 2,49$; $p = 0,0002$). Para as células J774 não houve diferença estatística na produção de ROS entre as formulações DIC e LNC-DIC (Figura 7A) quando comparadas nas concentrações 65 μM ($49,55 \pm 11,83$, $42,77 \pm 6,47$; $p = 0,987$) e 130 μM ($54,40 \pm 18,44$, $52,80 \pm 8,11$; $p < 0,997$).

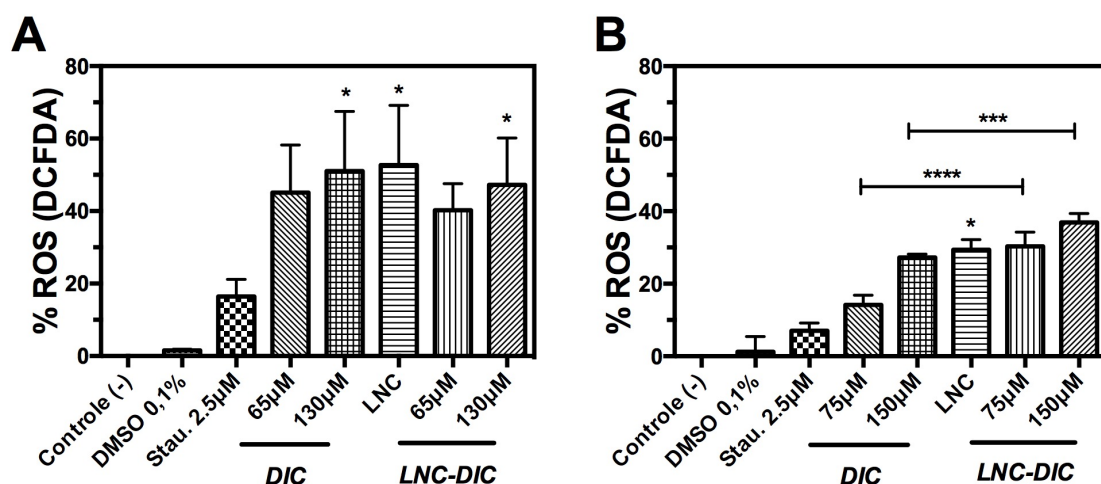


Figura 7: Percentual de produção de ROS intracelular para células J774 e THP-1, as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 /poço e tratadas com LNC, LNC-DIC e DIC. **A:** Células J774 tratadas por 24 horas quando comparadas na mesma concentração nas diferentes formulações não apresentaram resultados significativos, 65µM ($49,55 \pm 11,83$, $42,77 \pm 6,47$; $p=0,987$) e 130µM ($54,40 \pm 18,44$, $52,80 \pm 8,11$; $p=0,997$), houve diferença estatística em três grupos quando comparados com controle negativo: DIC 130µM ($p=0,037$ (*)), LNC ($p=0,022$ (*)) e LNC-DIC 130µM ($p=0,043$ (*)). **B:** Células THP-1 tratadas por 48 horas apresentaram diferença estatística quando comparadas nas mesmas concentrações em ambas formulações, 75µM ($14,14 \pm 2,69$, $30,33 \pm 3,90$; $p<0,0001$ (****)) e 150µM ($27,24 \pm 0,90$, $36,88 \pm 2,49$; $p=0,0002$ (***)), LNC vs C(-) ($p=0,0286$ (*)).

5.4 Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Foi realizada a avaliação do $\Delta\psi_m$ utilizando-se o corante fluorescente DiOC₆ que se liga fortemente à membrana mitocondrial íntegra com perda de fluorescência proporcional a queda de $\Delta\psi_m$. Na Figura 8 observa-se que a formulação LNC-DIC reduziu significativamente o $\Delta\psi_m$ em relação a formulação padrão nas concentrações 75µM ($23,71 \pm 2,98$, $-40,47 \pm 4,31$; $p<0,0001$) e 150µM ($21,79 \pm 2,19$, $-44,65 \pm 3,36$; $p<0,0001$) para células THP-1 e 65µM ($-1,51 \pm 2,42$, $-15,38 \pm 1,88$; $p=0,0005$) e 130µM ($-5,65 \pm 0,88$, $-26,59 \pm 7,21$; $p<0,0001$) para células J774. O tratamento com DIC levou a discreto aumento no $\Delta\psi_m$ das células THP-1 em relação ao controle nas concentrações testadas de 65µM e 130µM (Figura 8B, $p=0,012$, $p=0,031$, respectivamente). Esses resultados demonstram que a formulação LNC-DIC produz maior efeito redutor no $\Delta\psi_m$ em ambas as células, sendo mais acentuado na célula J774 que apresentou maior sensibilidade aos dois tratamentos.

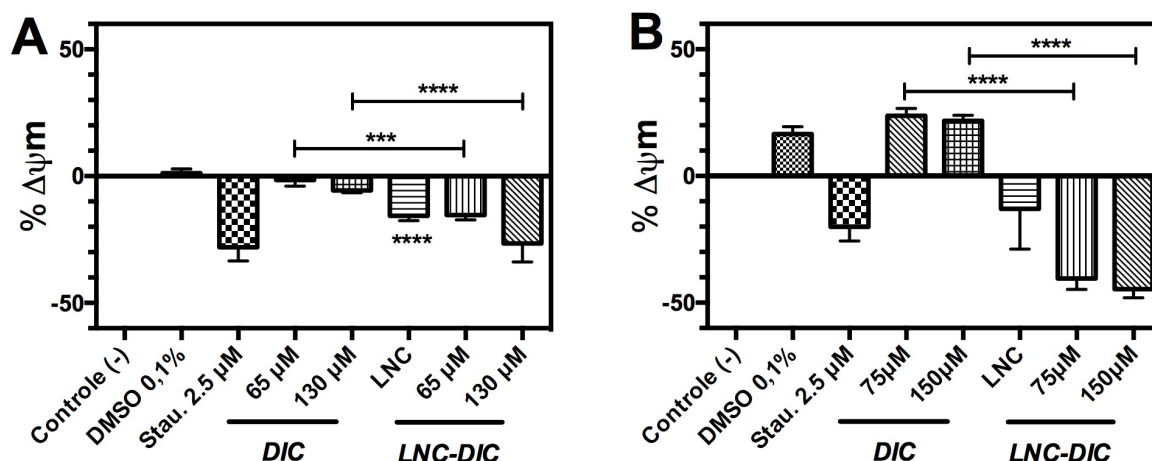


Figura 8: Percentual de Potencial de Membrana Mitocondrial por DiOC₆, as células foram plaqueadas numa concentração de 1×10^5 /poço e foram tratadas com LNC, LNC-DIC e DIC em concentrações distintas. **A:** Células J774 tratadas por 24 horas com ambas as formulações, em concentrações de 65 μM ($-1,51 \pm 2,42$, $-15,38 \pm 1,88$; $p=0,0005$ (***) e 130 μM ($-5,65 \pm 0,88$, $-26,59 \pm 7,21$; $p<0,0001$ (****)). A LNC quando comparada ao controle negativo teve diferença significativa. ($p<0,0001$ (****)). **B:** Células THP-1 tratadas por 48 horas com ambas as formulações, em concentrações de 75 μM ($23,71 \pm 2,98$, $-40,47 \pm 4,31$; $p<0,0001$ (****) e 150 μM ($21,79 \pm 2,19$, $-44,65 \pm 3,36$; $p<0,0001$ (****)). Não houve diferença significativa entre controle negativo e LNC ($p=0,054$).

5.5 Atividade de Caspase-3

A Caspase-3 é uma caspase efetora, sendo ativada para concretizar a morte celular por apoptose. Avaliou-se a presença da proteína ativa nas células tratadas com DIC, LNC, LNC-DIC com citometria de fluxo para células THP-1 em 48 horas. Na Figura 9A está demonstrada a seleção da população celular de interesse com suas características morfológicas de tamanho e granulosidade, enquanto a eficiência dos controles foi analisada através do deslocamento dos picos dos controles utilizados no experimento (Figura 9B). A percentagem de células com caspase-3 ativas foi definida em relação ao controle negativo sem marcação (Figura 9C e 9D).

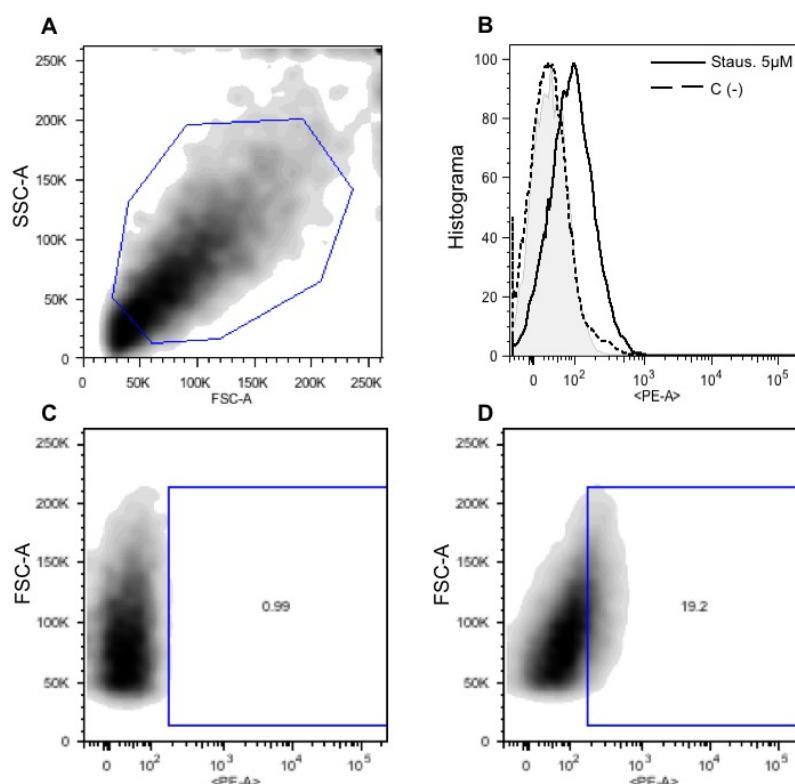


Figura 9: Determinação de *gates* para atividade de caspase-3 por citometria. **A:** Distribuição da população de células THP-1 quando suas características morfológicas de tamanho e granulosidade, estando em destaque a população selecionada para avaliação. **B:** Histograma representativo do deslocamento dos controles quando a atividade de Caspase-3, onde o pico cinza são células sem marcação (S.M), a linha pontilhada é o controle negativo e a linha continua é o controle positivo (Stau. 5µM). **C:** Percentual de células com caspase-3 ativa no controle negativo. **D:** Percentual de células com caspase-3 ativa no controle positivo (Stau. 5µM).

Na Figura 10, pode-se observar que as formulações LNC-DIC aumentaram o percentual de células com caspase-3 ativa nas concentrações 75µM ($40,85 \pm 4,37$, $84,80 \pm 6,16$; $p < 0,0001$) e 150µM ($53,08 \pm 6,23$, $81,70 \pm 9,09$; $p = 0,0007$) para células THP-1. Além disso, a formulação LNC-DIC também aumentou a atividade de caspase-3 nas concentrações estudadas. Portanto, esta evidente por estes resultados que a formulação LNC-DIC induz maior atividade de caspase-3.

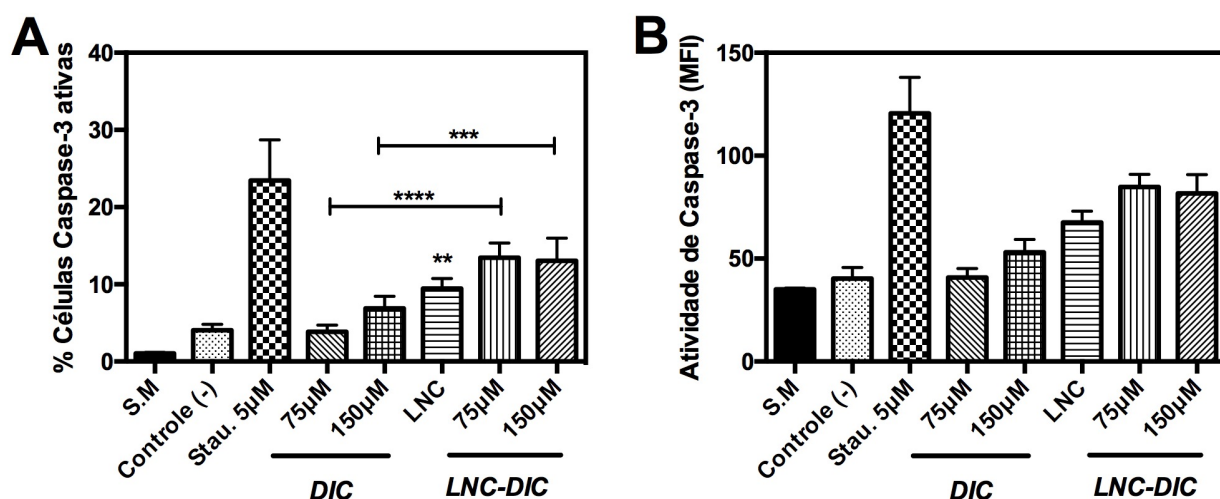


Figura 10: Percentual de células THP-1 com caspase-3 ativa. Foi avaliada a atividade da proteína após 48 horas de tratamento com ambas formulações em duas concentrações (75µM e 150µM). **A:** Aumento significativo de células com caspase-3 ativa quando comparada ambas formulações, 75µM ($40,85 \pm 4,37$, $84,80 \pm 6,16$; $p < 0,0001$ (****)) e 150µM ($53,08 \pm 6,23$, $81,70 \pm 9,09$; $p = 0,0007$ (***)), LNC quando comparado com controle negativo, apresentou resultados significativo ($p = 0,0012$ (**)). **B:** Intensidade media de fluorescência das células analisadas.

5.6 Células Apoptóticas Anexina V positivas

Na Figura 11 são demonstrados a efetividade dos controles negativo e positivo através do deslocamento dos picos dos controles utilizados no experimento. A formulação LNC-DIC induziu maior percentual de células em apoptose Anexina V+ em relação à DIC nas concentrações 75µM ($5,72 \pm 0,16$, $15,87 \pm 0,52$; $p < 0,0001$) e 150µM ($6,26 \pm 0,34$, $12,68 \pm 0,22$; $p < 0,0001$), Figura 12, demonstrando que a formulação nanoencapsulada não apenas aumenta a atividade de caspase-3 como também a quantidade de células em apoptose.

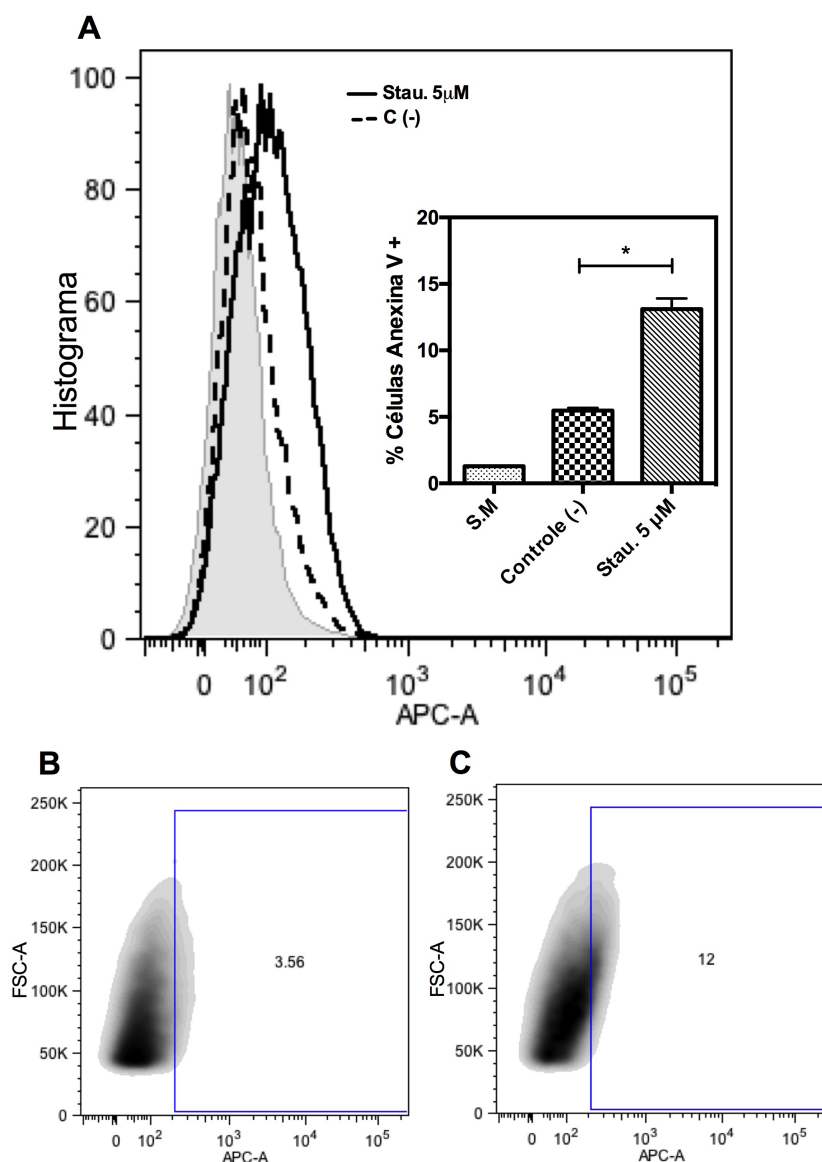


Figura 11: Seleção de *gates* dos controles para Anexina V+ por citometria. **A:** Histograma representativo do deslocamento dos controles quando a presença de Anexina V, onde o pico cinza são células S.M, a linha pontilhada é o controle negativo e a linha continua é o controle positivo (Stau. 5µM), o gráfico representa o percentual de Anexina V + nos grupos controles ($p=0,0286$ (*)). **B:** Percentual de células Anexina V+ no controle negativo. **C:** Percentual de células Anexina V+ ativa no controle positivo (Stau. 5µM).

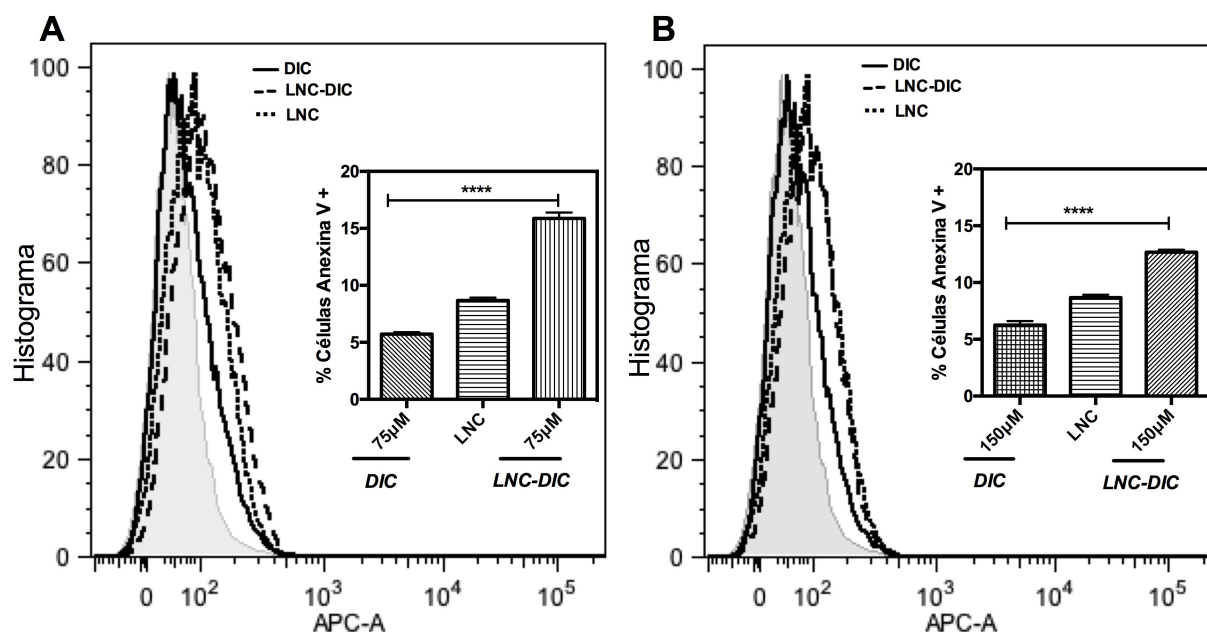


Figura 12: Células THP-1 Annexina V+ determinadas por citometria de fluxo após tratamento com ambas formulações em duas concentrações (75µM e 150µM) por 48 horas. **A:** Histograma representativo do deslocamento de ambas formulações testadas na concentração de 75µM, o gráfico representa o percentual de células Annexina V+, demonstrando diferença significativa entre as formulações (5,72±0,16, 15,87±0,52; $p<0,0001$ (****)). **B:** Histograma representativo do deslocamento de ambas formulações testadas na concentração de 150µM, o gráfico representa o percentual de células Annexina V+, demonstrando diferença significativa entre as formulações (6,26±0,34, 12,68±0,22; $p<0,0001$ (****)).

5.7 Ensaio do Cometa (Versão Alcalina)

Para avaliar se as formulações testadas induzem danos ao DNA das células THP-1 tratadas, foi realizado o ensaio do Cometa. Na Figura 13, observa-se que houve aumento no índice de dano ao DNA nas células tratadas com ambas formulações em relação ao controle negativo ($p>0,0001$). Porém, não houve diferença estatística entre formulações nas concentrações testadas de DIC e LNC-DIC 75µM (50,33±1,59, 45,50±7,76; $p<0,998$) e 150µM (44,00±2,65, 53,33±4,16; $p<0,586$), evidenciando que o dano ao DNA não é fator determinante na diferença de toxicidade entre as formulações. A Figura 14 demonstra o grau de dano ao DNA induzida pelas formulações. A principal forma de documentada de dano ao DNA entre ambas as formulações é dano inicial (nível 1, Figura 14), entretanto a formulação LNC-DIC induz maior percentual de nível 2 de dano ao DNA (Figura 15G) quando comparada ao controle negativo nível 0 (Figura 15A) e DIC nível 1 (Figura 15D e E). O controle positivo DOXO induziu maior dano ao DNA, nível 4 (Figura 15C).

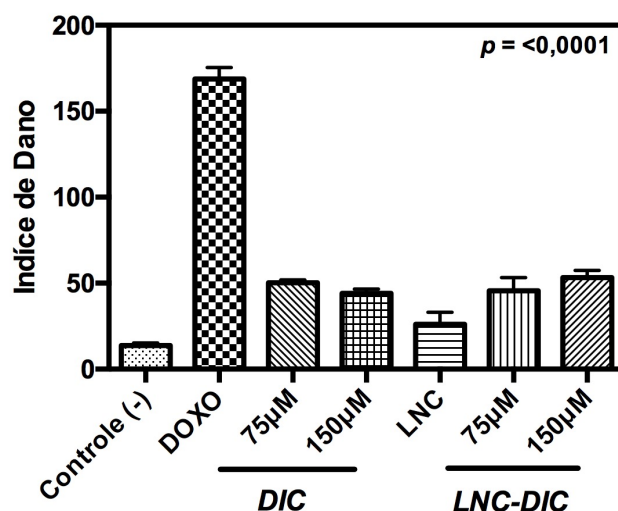


Figura 13: Índice de Dano em células THP-1 após 48 horas de tratamento com ambas formulações. Ao compara DIC/LNC-DIC nas mesmas concentrações, não houve resultado significativo 75µM ($p=0,9984$) e 150µM ($p=0,5860$). Ambas formulações tiveram resultados significativos nas duas concentrações quando comparados com controle negativo ($p<0,0001$).

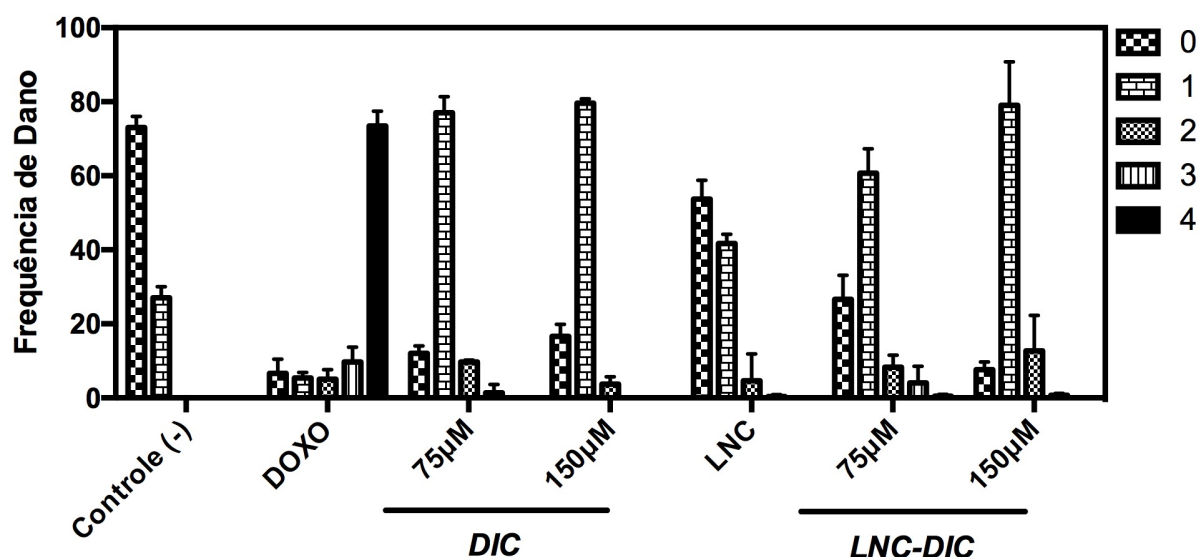


Figura 14: Percentual de níveis de danos em células THP-1, após 48 de tratamento. O único grupo que apresentou danos significativo de nível 4 foi o controle positivo (DOXO), os grupos tratados com as formulações apresentaram aumento no dano de nível 1, tendo o grupo LNC-DIC 150µM uma tendência ao dano de nível 2, LNC não apresentou dano significativo quanto comparado ao controle negativo.

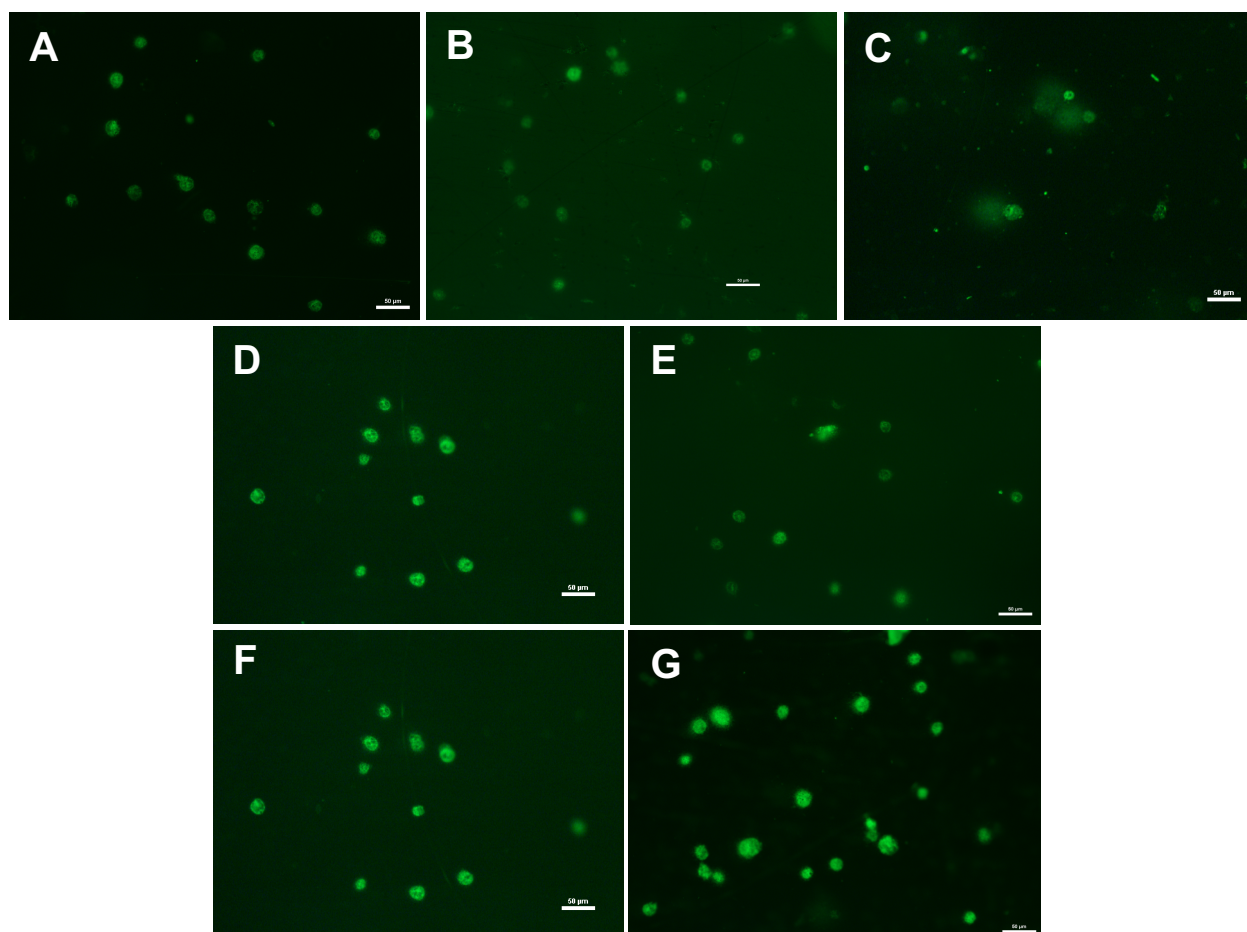


Figura 15: Avaliação de período do tratamento das formulações sobre danos ao DNA. **A:** grupo controle negativo, tratado com meio. Onde se observou a predominância de cometas de nível 0 e 1. **B:** Controle da nanoformulação (LNC), cometa de nível 0 e 1. **C:** Controle negativo (DOXO), cometa de nível 4. **D e E:** Tratamento com DIC (**D** 75µM e **E** 150µM), cometa de nível 1. **F e G:** Tratamento com LNC-DIC (**F** 75µM e **G** 150µM), cometa de nível 1, com tendência para o nível 2 na maior concentração (**G**).

6. DISCUSSÃO

Segundo VAN WALSEM et al., (2015) mais de 1,5 bilhões de pessoas no mundo sofrem de dor crônica, tendo como principal fonte as doenças musculoesqueléticas e articulares. Esse dado nos faz entender porque os AINEs se tornaram um grupo de fármacos largamente utilizados em todo o mundo (FIGUEIREDO; ALVES, 2015).

Os AINEs são importantes no tratamento da AR, sendo o DIC um importante fármaco no tratamento dos sintomas, inibindo a enzima COX, porém conforme relatado, esses medicamentos possuem importantes efeitos colaterais (CHARRUA, 2010). É bem conhecido o fato de que drogas carregadas em nanocarreadores concentram-se principalmente nos sítios inflamatórios, daí porque estão associadas a poucos efeitos colaterais e maior ação terapêutica. Dado o amplo uso do DIC como AINE, deve-se considerar o potencial que sistemas nanocarreadores como LNC carregados com DIC, representando importante avanço no uso de AINE, bem como na redução de seus efeitos colaterais (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Na reumatologia essa ferramenta vem sendo bastante estudada, pois a uma busca incessante na melhor forma de concentra a droga no local desejado. Os nanocarreadores vem sendo uma das principais alternativas em estudo, pois conseguem direcionar a droga até o tecido inflamado, maximizando o efeito da droga com diminuição de efeitos colaterais (BARRATT, 2000; BOECHAT et al., 2015).

Ao compararmos o DIC nas duas formulações testadas, foi observado que LNC-DIC apresentou maior citotoxicidade para ambas as linhagens de macrófagos. LNC-DIC apresentou maior efeito indutor de apoptose. Além disso, houve aumento da produção de ROS intracelular e maior redução do potencial de membrana mitocondrial com DIC-LNC. Atribui-se esses efeitos à maior captação da droga nanoencapsulada pelos macrófagos, com um aumento da liberação da droga e concentração intracelular. Cabe ressaltar que embora as formulações DIC e DIC-LNC tenham aumentado o índice de dano ao DNA, esse efeito não diferiu entre as formulações, evidenciando que a indução de apoptose se deve principalmente aos efeitos descritos anteriormente. Estes resultados são relevantes, uma vez que as nanoformulações demonstraram a habilidade da formulação DIC-LNC induzir apoptose em macrófagos, cuja importância no tratamento da AR foi discutida anteriormente (BADER, 2012; POPE, 2002b).

Vários mecanismos têm sido propostos para a apoptose mediada por DIC, tais como disfunção mitocondrial, retículo endoplasmático, danos ao DNA, via mediada por RNA-proteína, estresse celular e redução da atividade transcricional de NF- κ B

(AMANULLAH et al., 2016). Também são investigadas diferentes processos de danificação da membrana células por diferentes nanomateriais (ELSAESSER; HOWARD, 2012). De acordo com alguns anteriores de toxicidade de DIC, sabe-se que a droga possui efeitos apoptóticos em diferentes linhagens celulares e sistemas completos (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003a; HASSAN et al., 2014; HICKEY et al., 2001; INOUE et al., 2004; VALLE et al., 2013). DIC causa desequilíbrio redox celular, através produção de ROS e consequente perda do $\Delta\psi_m$, dando início a apoptose pela via intrínseca (CECERE et al., 2010). Nossos experimentos mostrou-se significativo na produção de ROS, com perda de $\Delta\psi_m$, demonstrando que o estresse oxidativo causando pelo DIC está relacionado com a cascata de apoptose, como também demonstrou-se no presente trabalho.

Dano ao DNA foi avaliado por meio do teste cometa, onde o DNA é avaliado em célula única, nossos resultados não apresentaram qualquer diferença significativa entre os grupos de DIC/LNC-DIC, porém nos sugerem uma tendência para dano de nível 2 no grupo LNC-DIC 150 μ M, o que corrobora com trabalho realizado para análise de dano ao DNA após tratamento com DIC, demonstrando que a degradação do DNA está diretamente envolvido na cascata de apoptose, sendo uma consequência da ativação da via mitocondrial (HICKEY et al., 2001). Como a concentração utilizada nos experimentos deste trabalho foram em torno da IC50% calculada, é possível que danos maiores ao DNA sejam detectados com concentrações maiores de DIC e DIC-LNC.

Um trabalho recente muda o foco para o início da cascata de apoptose iniciada pelo DIC, provando que o fármaco causa disfunção do proteassoma, promovendo acúmulo de diferentes proteínas defeituosas e ubiquitinadas, cujo acúmulo intracelular causa anormalidades mitocondriais por estresse citoplasmático, o que leva a apoptose pela via intrínseca (AMANULLAH et al., 2016). De qualquer maneira, o encapsulamento de DIC em sistema LNC parece apresentar toxicidade celular por mecanismos semelhantes a formulação tradicional, porém de forma mais acentuada. Estudo conduzido por Bernardi et al. (2013), demonstrou que a indometacina carregada em LNC induz apoptose via a proteína, inativando a proteína Akt e β -catenina e ativação de GSK-3 β . Os resultados do presente estudo sugerem que a produção de ROS com perda de potencial de membrana está, pelo menos em parte, envolvido na apoptose induzida por LNC-DIC. Entretanto, quando as células THP-1 e J774 foram tratadas com quercetina ou rutina, cujo efeito antioxidante é bem descrito, não houve redução de toxicidade celular (dados não mostrados). Portanto, para identificação do mecanismo exato de indução de apoptose, serão necessários estudos adicionais.

É interessante notar que a formulação LNC por si mesma apresentou maior toxicidade celular que DIC, inclusive com aumento de ROS intracelular e perda de potencial de membrana mitocondrial. As LNC podem apresentar citotoxicidade celular promovendo instabilidade de membranas e estresse citoplasmático, dano e fragmentação do DNA, além da produção ROS intracelular. Entretanto, deve ser ressaltado que quando a toxicidade destas formulações é testada *in vivo*, estes efeitos não demonstraram repercussão sistêmica importante quando as LNC são administradas por via parenteral e intradérmica. Disso, depreende-se que as LNC são seguras como sistemas carreadores de drogas.

Mesmo com grandes estudos e gastos exorbitantes em novos tratamentos, correções cirúrgicas e fármacos (DMCD e imunobiológicos) para o tratamento da AR, que ajudam a retardar a progressão da doença, ainda que bloqueando alguns mecanismos inflamatórios bem específicos, as enzimas COX e Lipoxigenase 5 (LO-5), continuam sendo expressas nesses tecidos inflamados, fornecendo assim produtos metabólicos bem conhecidos como Prostaciclina (PGI₂), tromboxanos, Prostaglandinas (PGs) e Leucodrienos (LTs), que contribuem para o processo inflamatório (KOROTKOVA e JAKOBSSON, 2014). É interessante notar que, mesmo em pacientes em tratamento otimizado com DMCD e imunobiológicos, a COX continua sendo expressa na membrana sinovial de pacientes com AR, reforçando a ideia de que as AINE ainda têm ainda podem ter papel no tratamento da AR (KOROTKOVA; JAKOBSSON, 2014). Entretanto, a toxicidade dos AINE ainda representa um óbice importante para o seu uso sistemático em qualquer paciente com condições reumáticas ou inflamatórias (MOTA et al., 2012). Nesse sentido, o direcionamento do DIC à membrana sinovial inflamada quando carregado em LNC, pode representar uma alternativa de tratamento.

7. CONCLUSÃO

1. As formulações de Diclofenaco e Nanocápsulas com núcleo lipídico carregada com Diclofenaco induzem apoptose em linhagens de macrófagos, ativando a via mitocondrial, onde o dano ao DNA é uma consequência da ativação dessa cascata.
2. A linhagem J774 apresentou maior sensibilidade ao Diclofenaco e Nanocápsulas com núcleo lipídico carregada com Diclofenaco, porém as duas linhagens são mais afetadas pelo tratamento com Nanocápsulas com núcleo lipídico branca e Nanocápsulas com núcleo lipídico carregadas com Diclofenaco.
3. A formulação LNC-DIC apresentou maior efeito indutor de apoptose nas linhagens de macrófagos estufadas.

8. REFERENCIAS

- ALBANO, F. et al. Markers of mitochondrial dysfunction during the diclofenac-induced apoptosis in melanoma cell lines. **Biochimie**, v. 95, n. 4, p. 934–945, abr. 2013.
- ALMEIDA, M. DO S. T. M.; ALMEIDA, J. V. M.; BERTOLO, M. B. Características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatoide no Piauí, Brasil – avaliação de 98 pacientes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, n. 5, p. 360–365, set. 2014.
- AMANULLAH, A. et al. Proteasomal Dysfunction Induced by Diclofenac Engenders Apoptosis through Mitochondrial Pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2016.
- AVIÑA-ZUBIETA, J. A. et al. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. **Arthritis Care & Research**, v. 59, n. 12, p. 1690–1697, 15 dez. 2008.
- BADER. **The Development of Targeted Drug Delivery Systems for Rheumatoid Arthritis Treatment**.
- BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163–171, 1 maio 2000.
- BERNARDI, A. et al. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 1104–1111, 1 out. 2009.
- BERNARDI, A. et al. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A β 1-42 in Alzheimer's disease models. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 4927–4942, 2012.
- BERNARDI, A. et al. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and inhibition of survival pathways. **International Journal of Nanomedicine**. Auckland, DOVE Medical Press. Vol. 8 (18 Feb. 2013), p. 711-729, 2013.
- BERTOLO, M. B. et al. Construction of a manual of work processes and techniques from Centro de Dispensação de Medicamentos de Alto Custo (CEDMAC), Hospital de Clínicas, Unicamp. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, n. 3, p. 185–191, jun. 2014.
- BOECHAT, A. L. et al. Methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules are highly effective in the control of inflammation in synovial cells and a chronic arthritis model. **International Journal of Nanomedicine**, p. 6603, out. 2015.
- BOECHAT, A. L. R. LOPES. Influencia de polimorfismos dos genes TNF e PTPN22 sobre a artrite reumatoide e a tuberculose no Amazonas, Brasil. 15 dez. 2010.
- BRENOL, C. V. et al. Rheumatoid arthritis and atherosclerosis. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 5, p. 465–470, out. 2007.

- CATRINA, A. I. et al. Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 1, p. 61–72, 2005.
- CECERE, F. et al. Diclofenac-Induced Apoptosis in the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: Possible Involvement of the Mitochondrial Superoxide Dismutase. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.
- CHARRUA, B. A. Hemorragia digestiva alta associada ao consumo de ácido acetilsalicílico e de anti-inflamatórios não-esteróides em Portugal. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 17, n. 5, p. 196–197, set. 2010.
- CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, Y. P. S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 738–749, 10 out. 2011.
- COOPER, D. L.; HARIRFOROOSH, S. Design and optimization of PLGA-based diclofenac loaded nanoparticles. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87326, 2014.
- DAVIGNON, J.-L. et al. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, p. kes304, 30 nov. 2012.
- ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Biological Interactions of Nanoparticles. v. 64, n. 2, p. 129–137, fev. 2012.
- EMAMI, J.; GHASSAMI, N.; TALARI, R. A rapid and sensitive modified HPLC method for determination of diclofenac in human plasma and its application in pharmacokinetic studies. **ResearchGate**, v. 15, n. 3, p. 132–138, 1 jun. 2007.
- FERNANDES, V. et al. Use of biological therapies in rheumatoid arthritis management: a comparison between the main worldwide and brazilian recommendations. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 225–230, jun. 2011.
- FIEL, L. A. et al. Variable temperature multiple light scattering analysis to determine the enthalpic term of a reversible agglomeration in submicrometric colloidal formulations: a quick quantitative comparison of the relative physical stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 431, p. 93–104, 2013.
- FIGUEIREDO, W.; ALVES, T. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to control acute pain: a systematic review. **Revista Neurociências**, v. 23, n. 03, p. 463–467, 30 set. 2015.
- FILIPPIN, L. I. et al. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. 2008.
- FIRESTEIN, G. S.; YEO, M.; ZVAIFLER, N. J. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 3, p. 1631, 1995.

- FREDRIKSSON, L. et al. Diclofenac inhibits tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor- κ B activation causing synergistic hepatocyte apoptosis. **Hepatology**, v. 53, n. 6, p. 2027–2041, 1 jun. 2011.
- GABRIEL, S. E.; TUGWELL, P.; DRUMMOND, M. Progress towards an OMERACT-ILAR guideline for economic evaluations in rheumatology. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 61, n. 4, p. 370–373, 1 abr. 2002.
- GOELDNER, I. et al. Artrite reumatoide: uma visão atual. **J. bras. patol. med. lab**, v. 47, n. 5, p. 495–503, out. 2011.
- GOES, P.; COELHO, A. C.; OLIVEIRA, C. C. Efeito da Raspagem e Alisamento Radicular em Pacientes com Artrite Reumatoide: Revisão da Literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, v. 24, n. 1, p. 33–40, 30 jun. 2014.
- GÓMEZ-LECHÓN, M. J. et al. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, Twelfth International Workshop on In vitro Toxicology. v. 17, n. 5–6, p. 675–680, out. 2003a.
- GÓMEZ-LECHÓN, M. J. et al. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 11, p. 2155–2167, 1 dez. 2003b.
- GRIVICICH, I. et al. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.
- GUICCIARDI, M. E. et al. Apoptosis and Necrosis in the Liver. In: TERJUNG, R. (Ed.). . **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.
- HASSAN, H. et al. Diclofenac Induces Apoptosis and Suppresses Diffuse Large B-Cell Lymphoma Proliferation Independent of P53 Status. **Blood**, v. 124, n. 21, p. 5485–5485, 6 dez. 2014.
- HICKEY, E. J. et al. Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 139–152, 15 jul. 2001.
- INOUE, A. et al. Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: dependency on reactive oxygen species, akt, bid, cytochrome and caspase pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 8, p. 1290–1299, 15 out. 2004.
- JÄGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130–140, 2009.
- JAIN, K. Drug Delivery Systems - An Overview. In: JAIN, K. (Ed.). . **Drug Delivery Systems**. Methods in Molecular Biology™. [s.l.] Humana Press, 2008. p. 1–50.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia Basica e Clinica**. Disponível em:

- <<https://www.estantevirtual.com.br/b/bertram-g-katzung/farmacologia-basica-e-clinica/565810704>>. Acesso em: 27 set. 2016.
- KENNEDY, A. et al. Macrophages in synovial inflammation. **Inflammation**, v. 2, p. 52, 2011.
- KINNE, R. W. et al. Macrophages in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 2, n. 3, p. 1, 2000.
- KOROTKOVA, M.; JAKOBSSON, P.-J. Persisting eicosanoid pathways in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 4, p. 229–241, 11 fev. 2014.
- KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D. M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 64, n. 3, p. 313–320, 25 nov. 1983.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 99–163, 2007.
- LAURINDO, I. M. M. et al. Artrite reumatóide: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 6, p. 435–442, dez. 2004.
- LI, J.; HSU, H.-C.; MOUNTZ, J. D. Managing Macrophages in Rheumatoid Arthritis by Reform or Removal. **Current rheumatology reports**, v. 14, n. 5, p. 445–454, out. 2012.
- LIU, H.; POPE, R. M. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. **Current opinion in pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 317–322, 2003.
- LOUZADA-JUNIOR, P. et al. Descriptive analysis of the demographical and clinical characteristics of the patients with rheumatoid arthritis in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 2, p. 84–90, abr. 2007.
- MARQUES, C. D. L. et al. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 1, p. 67–80, fev. 2010.
- MCGETTIGAN, P.; HENRY, D. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. **PLoS Med**, v. 10, n. 2, p. e1001388, 2013.
- MINETTO, L. REATORES DE DISCOS ROTATIVOS E TUBULAR HELICOIDAL NA DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA DE DICLOFENACO E CARGA ORGÂNICA DE EFLUENTE HOSPITALAR. 2009.
- MONTEIRO, R. D. C.; ZANINI, A. C. Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatóide. **Rev Bras Ciênc Farm**, v. 44, 2008.
- MOTA, L. M. H. DA et al. 2011 Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 207–219, jun. 2011.
- MOTA, L. M. H. DA et al. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of

- rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 152–174, abr. 2012.
- MOTA, L. M. H. DA et al. Guidelines for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, n. 2, p. 141–157, abr. 2013.
- MOTTRAM, P. L. Past, present and future drug treatment for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, n. 5, p. 350–353, out. 2003.
- MULLER, C. R. et al. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. 2004.
- NICHOLSON, H. et al. Sigma-2 Receptors Play a Role in Cellular Metabolism: Stimulation of Glycolytic Hallmarks by CM764 in Human SK-N-SH Neuroblastoma. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 2, p. 232–243, fev. 2016.
- OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1141–1150, 19 dez. 2012a.
- OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1141–1150, 19 dez. 2012b.
- OLIVEIRA, L. M. DE et al. **Acompanhamento da Capacidade funcional de pacientes com artrite reumatoide por três anos.** Disponível em: <https://www.google.com.br/search?client=safari&rls=en&q=Acompanhamento+da+Capacidade+funcional+de+pacientes+com+artrite+reumatoide+por+tr%C3%AAs+anos.&ie=UTF-8&oe=UTF-8&gfe_rd=cr&ei=LIPkV8yfLc2m8weQub_gCA>. Acesso em: 23 set. 2016.
- OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 1 dez. 2012.
- PINCUS, T.; SOKKA, T.; WOLFE, F. Premature mortality in patients with rheumatoid arthritis: Evolving concepts. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 6, p. 1234–1236, 1 jun. 2001.
- POLETTTO, F. S. et al. Fluorescent-Labeled Poly(ε-caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules: Synthesis, Physicochemical Properties and Macrophage Uptake. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 89–98, 1 jun. 2012.
- POLETTTO, F. S. et al. How sorbitan monostearate can increase drug-loading capacity of lipid-core polymeric nanocapsules. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 827–837, 2015.
- POPE, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 527–535, 2002a.
- POPE, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 527–535, jul. 2002b.

- POUNTOS, I. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. **International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research**, p. 19, jan. 2011.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99–106, 2002.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, out. 2003.
- SCHJERNING OLSEN, A.-M. et al. Cause-Specific Cardiovascular Risk Associated with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs among Myocardial Infarction Patients - A Nationwide Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 30 jan. 2013.
- SCHULTZE, E. et al. Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. **Theme Issue: Nanomedicine**, v. 87, n. 1, p. 55–63, Maio 2014.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1 mar. 1988.
- SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 48, 2015.
- UDALOVA, I. A.; MANTOVANI, A.; FELDMANN, M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 8, p. 472–485, ago. 2016.
- VALLE, B. L. et al. Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs Decrease E2F1 Expression and Inhibit Cell Growth in Ovarian Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 24 abr. 2013.
- VAN WALSEM, A. et al. Relative benefit-risk comparing diclofenac to other traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis: a network meta-analysis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 17, p. 66, 2015.
- VAYSSIERE, J. L. et al. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 24, p. 11752–11756, 22 nov. 1994.
- VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1, p. 200–208, 2011.
- VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, 17 jul. 1995.

- VIEIRA, A. R. F. B cell gene expression in rheumatoid arthritis: effect of immunosuppressive treatment. 2014.
- WILLIAMS, A. S. et al. Prostaglandin and tumor necrosis factor secretion by peritoneal macrophages isolated from normal and arthritic rats treated with liposomal methotrexate. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 32, n. 1, p. 53–58, set. 1994.
- WILLIAMS, B. D. et al. Imaging in rheumatoid arthritis using liposomes labelled with technetium. **British Medical Journal (Clinical research ed.)**, v. 293, n. 6555, p. 1143–1144, 1 nov. 1986.
- WILLIAMS, B. D. et al. Synovial accumulation of technetium labelled liposomes in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 46, n. 4, p. 314–318, abr. 1987.
- WUNDER, A. et al. Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 5, n. Suppl 3, p. 1–1, 12 set. 2003.
- YAMAZAKI, T. et al. Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, suppresses apoptosis induced by endoplasmic reticulum stresses by inhibiting caspase signaling. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 558–567, abr. 2006.
- YURGEL, V. C. et al. Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1583–1591, 25 mar. 2014.
- ZYKOVA, M. G. et al. Antirheumatic activity of methotrexate in phospholipid nanoparticles (Phosphogliv). **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 71–74, 3 abr. 2008.