



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V – MINISTRO ALCIDES CARNEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BRENDA MARTINS GABÍNIO

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO DIETILCARBAMAZINA PARA
LIBERAÇÃO HEPATO-ESPECÍFICA E AVALIAÇÃO EM MODELO DE
INFLAMAÇÃO HEPÁTICA AGUDA**

**JOÃO PESSOA
2017**

BRENDA MARTINS GABÍNIO

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO DIETILCARBAMAZINA PARA
LIBERAÇÃO HEPATO-ESPECÍFICA E AVALIAÇÃO EM MODELO DE
INFLAMAÇÃO HEPÁTICA AGUDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira.

**JOÃO PESSOA
2017**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

G113p Gabínio, Brennda Martins
Produção de nanopartículas contendo Dietilcarbamazina para liberação hepato-específica e avaliação em modelo de inflamação hepática aguda [manuscrito] / Brennda Martins Gabínio. - 2017.
41 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2017.

"Orientação: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Hepatite. 2. Anti-inflamatório. 3. Nanobiotecnologia. I.
Título.

21. ed. CDD 616.9

BRENNDA MARTINS GABÍNIO

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO DIETILCARBAMAZINA PARA
LIBERAÇÃO HEPATO-ESPECÍFICA E AVALIAÇÃO EM MODELO DE INFLAMAÇÃO
HEPÁTICA AGUDA

Artigo apresentado ao Programa de Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

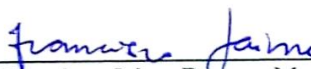
Área de concentração: Nanobiotecnologia.

Aprovada em: 16/08/2019.

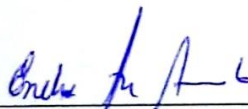
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Enelise Marcelle Amado
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus pais, Enir Martins e Alexander Gabinio pela dedicação, companheirismo e amizade, e ao meu companheiro, Danny Oliveira, por acreditar nos meus sonhos e por ter sido fundamental para mim durante a realização desse trabalho, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Elquio Eleamen Oliveira, por ter me aceitado como orientanda e por todo o conhecimento em mim depositado, dedicação e compreensão.

Ao professor Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior e a pesquisadora, Christina Alves Peixoto, da Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pelo apoio durante todo o desenvolvimento de minha pesquisa.

Ao Laboratório de Peneiras Moleculares – UFRN, por disponibilizar o difratômetro para as análises de difratometria de raio X.

Aos doutorandos, Bruna Dantas, Gabriel Rodrigues e Silvana Cartaxo, pelo auxílio nas análises de toxicologia e caracterização do sistema e por toda dedicação.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas da UEPB, que contribuíram ao longo de quarenta e oito meses, por meio das disciplinas e debates, para o meu desenvolvimento enquanto aluna e crescimento enquanto bióloga.

Aos colegas do LSVM, por todo conhecimento compartilhado e companheirismo.

Aos colegas de classe pelos momentos de amizade e apoio.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“No mundo nanométrico, algumas forças que são importantes para o mundo macroscópico são minimizadas. Como, por exemplo, o movimento Browniano é mais significativo que a gravidade (ZORZI et al, 2015) ”.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	08
MATERIAIS E MÉTODOS	12
<i>Produção de nanopartículas</i>	12
<i>Caracterização do sistema nanoparticulado</i>	13
<i>Tamanho de partícula, Potencial Zeta e Índice de polidispersão</i>	13
<i>Análise morfológica</i>	13
<i>Espectroscopia na região do infravermelho</i>	13
<i>Difratometria de pós por Raio X (DRX)</i>	13
<i>Curva de calibração</i>	14
<i>Cinética de liberação</i>	14
<i>Teste de toxicidade</i>	14
<i>Cultura de células</i>	14
<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	15
<i>Avaliação em modelos de inflamação hepática</i>	15
<i>Animais</i>	15
<i>Soluções de DEC</i>	15
<i>Grupos experimentais</i>	16
<i>Determinações bioquímicas</i>	16
<i>Histopatologia</i>	16
<i>Medição do óxido nítrico</i>	17
<i>Atividade da glutathione redutase hepática</i>	18
<i>Western Blot</i>	18
<i>Análise Estatística</i>	18
RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
<i>Produção de nanopartículas</i>	19
<i>Caracterização do sistema nanoparticulado</i>	19
<i>Tamanho de partícula, potencial Zeta e índice de polidispersão</i>	19
<i>Análise morfológica</i>	20
<i>Espectroscopia na região do infravermelho</i>	20
<i>Difratometria de pós por Raio X (DRX)</i>	22
<i>Curva de calibração</i>	23
<i>Cinética de liberação</i>	23
<i>Teste de toxicidade</i>	25
<i>Avaliação em modelo de inflamação hepática aguda</i>	27
<i>Perfil lipídico e níveis de transaminases</i>	27
<i>Histologia</i>	28

<i>Expressão de marcadores inflamatórios</i>	30
<i>Níveis de óxido nítrico</i>	33
<i>Atividade da glutathione redutase</i>	34
CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	37
ANEXO	41

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO DIETILCARBAMAZINA PARA LIBERAÇÃO HEPATO-ESPECÍFICA E AVALIAÇÃO EM MODELO DE INFLAMAÇÃO HEPÁTICA AGUDA

Brennda Martins Gabínio*

RESUMO

Estudos anteriores demonstraram que a dietilcarbamazina (DEC) é um potente anti-inflamatório graças à sua atuação sobre a atividade da glutatona, citocinas e enzimas inflamatórias. Porém, devido as características físico-químicas deste fármaco, para uma melhor absorção e permanência no organismo, é necessário um vetor, neste caso um nanocarreador, produzido pelo método de múltipla emulsão. O presente trabalho teve como objetivo a produção de nanopartículas contendo DEC para liberação hepato-específica, caracterizando o sistema nanoparticulado e avaliação em modelo de inflamação hepática aguda em camundongos C57Bl/6. Os resultados encontrados revelaram nanopartículas com tamanho médio variando entre 298,7 nm a 364,4 nm. Mostraram ainda que o fármaco se encontrou disperso molecularmente e com aumento no tempo de liberação para as amostras nanoencapsuladas. O tratamento com nanopartículas de 2,5mg/ml de DEC apresentou uma ação anti-inflamatória superior à dose tradicional de DEC (50 mg/kg), restaurando a morfologia do fígado, melhorando parâmetros sorológicos e reduzindo a expressão de marcadores inflamatórios. Portanto, alcançamos uma formulação satisfatória com efeito anti-inflamatório significativo em células do fígado, além da redução na dose e no tempo de tratamento, o que representa uma formulação promissora para o tratamento de distúrbios inflamatórios.

Palavras-Chave: Hepatite. Anti-inflamatório. Nanobiotecnologia.

INTRODUÇÃO

Hepatite é uma inflamação que ocorre no fígado, caracterizada por necrose difusa ou irregular. Pode ter diversas origens, tais como: erros no sistema autoimune ou metabólico, infecções virais ou bacterianas, alterações decorrentes da dieta hiperlipídica e do consumo excessivo de substâncias tóxicas. (KARNSAKUL & SCHWARZ, 2017; RUTHERFORD, 2016; SARTAKHTI, 2012).

A hepatite pode se manifestar de forma crônica ou aguda. O estado crônico ocorre de forma mais lenta e com sintomas menos perceptíveis, destruindo os hepatócitos gradativamente. Quanto ao seu estado agudo, os sintomas são bastante variáveis, a depender

* Aluna de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – Campus V.
Email: brennda_martins@hotmail.com

do estado imunológico do paciente. Frequentemente esta inflamação revela-se com o quadro clínico similar ao de uma gripe apresentando mal-estar, febre, náuseas e dores, em quadros mais intensos pode ocorrer o amarelamento da pele e dos olhos. Os tratamentos existentes são limitados e diferenciados, a depender da etiologia e/ou persistência do estímulo. Quando as medidas terapêuticas não são eficientes, os pacientes podem evoluir para uma cirrose levando a falência hepática (JORGE, 2011; SHELOCK, 2002).

O fígado é o principal órgão para o metabolismo de drogas e produtos químicos, conseqüentemente, é o órgão alvo para grande parte destes produtos. Diversas terapias específicas para patologias do fígado têm sido desenvolvidas com sucesso. Os tratamentos que reduzem a inflamação pelo bloqueio do fator de necrose tumoral (TNF- α), são os mais conhecidos. A compreensão dos mecanismos de uma hepatopatia ainda é bastante indefinida, o que torna o transplante de fígado o tratamento mais eficaz para pacientes com insuficiência hepática (AKRIVIADIS et al, 2000; BOETTICHER et al., 2008; LEE, 2011; NAVEAU et al, 2004; ROCKEY, 2008).

A Dietilcarbamazina (DEC) é um derivado da piperazina com nome químico 1-dietilcarbamil-4-metilpiperazina que pode ser preparada na forma de sais de cloridrato, citrato e fosfato (Figura 1). Santiago-Stevenson e colaboradores (1947), demonstraram sua ação na filariose linfática, causada pela *Wuchereria bancrofti*, que hoje é tratada com Dietilcarbamazina e Ivermectina ou em associação com Albendazol. A partir de 1950, a DEC foi distribuída como sal de citrato por inúmeras companhias farmacêuticas, direcionada para o tratamento de filariose linfática. É um pó branco, muito solúvel em água, estável, mesmo em condições de umidade e temperaturas muito elevadas, e resiste, inclusive, à autoclavagem. (BAHMANI et al., 2014; DREYER & NORÕES, 1997).

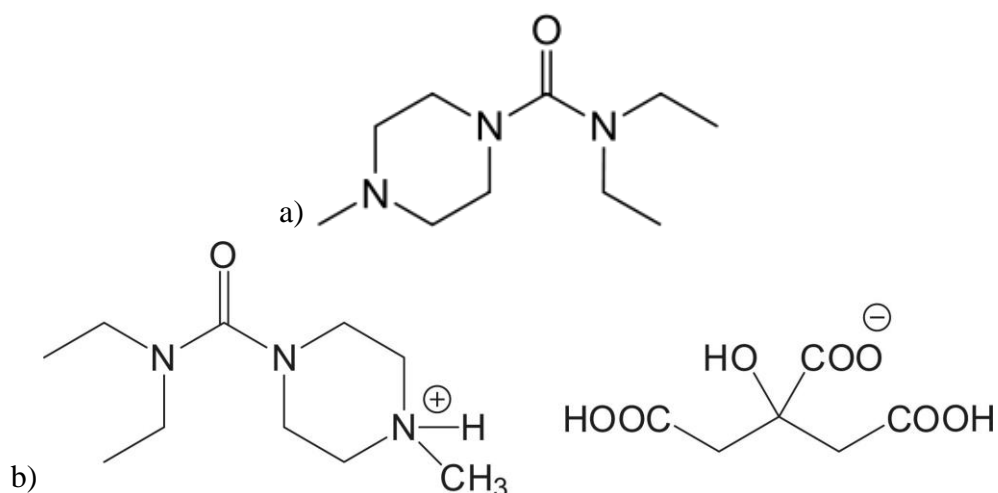


Figura 1 - a) Estrutura molecular da DEC e b) Estrutura molecular do Citrato da DEC (Silva, 2010; Rolim, 2012)

Nos últimos anos, diversos estudos vêm descrevendo outras atividades farmacológicas para a DEC. Ensaios clínicos concluíram que a DEC pode ser razoavelmente eficaz em condições asmáticas e pode agir como um potente inibidor de leucotrienos e da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2). Além disso, demonstrou-se que esta droga pode interferir nas vias da ciclo-oxigenase e lipoxigenase, reduzindo a produção de eicosanoides e também apresenta um efeito antifibrótico e pró-apoptótico, podendo demonstrar um efeito anti-inflamatório. (DA SILVA et al, 2014; EL, 2017; FRAGOSO, 2017).

Rocha (2012), concluiu que, após testes *in vivo* em camundongos (com indução de consumo alcoólico), que a hepatite crônica, nestes indivíduos, está associada com a hiperprodução de citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença hepática alcoólica (DHA). Animais desnutridos e com a inflamação induzida, foram submetidos ao tratamento com a DEC, mostrando que o acúmulo de lipídeos foi impedido e promoveu-se uma redução nos danos causados devido à má nutrição, bem como, a preservação de organelas e da membrana composta de hepatócitos evidenciando um efeito protetor pela DEC. Além disso, o grupo tratado com a droga mostrou uma redução significativa das lesões morfológicas.

Nos últimos anos, surgiram diversos sistemas para a administração de fármacos. Com o tamanho compreendido entre 10 nm a 1000 nm, as nanopartículas são capazes de melhorar a farmacocinética e a biodisponibilidade do fármaco, a estabilidade e como consequência favorecer o efeito clínico; além disso, minimizar a toxicidade do princípio ativo (GONG &

CHEN, 2016; SALTÃO & VEIGA, 2001; SCHAFFAZICK et al, 2003). Essa tecnologia permite a manipulação das propriedades físico-químicas e biológicas do material e uma maior eficiência e segurança na entrega farmacológica. (HARISA & ALANAZI, 2014).

Considerando que a DEC é um fármaco já produzido em larga escala e com ampla comercialização ao estudar suas propriedades químicas é possível a aplicação de uma nova finalidade farmacológica, sendo esta, um anti-inflamatório (DREYER & NORÕES,1997; ROCHA, 2012). Considerando também que através do uso da nanotecnologia é possível desenvolver um vetor que será direcionado para atuar em um sítio de ação específico, promovendo a diminuição dos efeitos colaterais e permanência prolongada do princípio ativo, uma vez que a DEC possui meia vida de aproximadamente 5 horas *in vivo* (DREYER & NORÕES,1997; GILL, 2013)

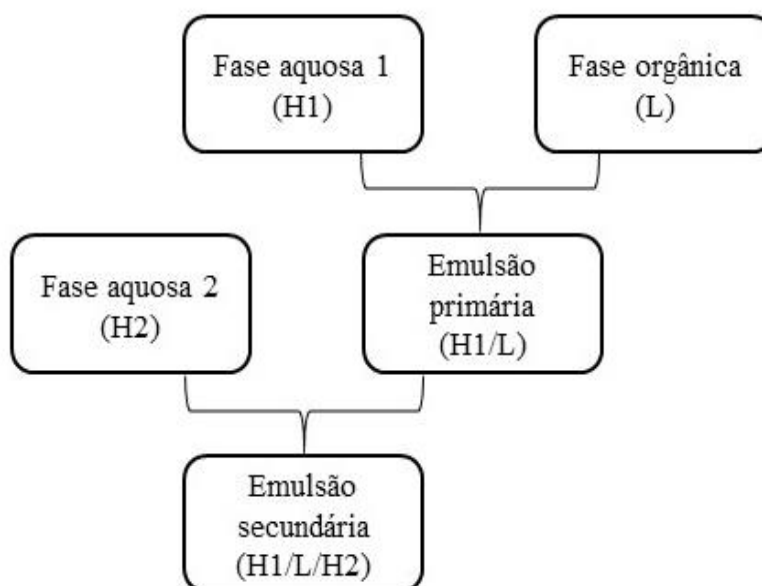
O presente trabalho teve como objetivo a produção de nanopartículas contendo Dietilcarbamazina para liberação hepato-específica, caracterizando o sistema nanoparticulado e avaliação em modelos de inflamação hepática aguda em camundongos C57Bl/6.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção de nanopartículas

Este procedimento foi realizado em três etapas: Preparação da fase aquosa 1 (H1), constituída por água destilada e DEC (Sigma-Aldrich, USA), preparação da fase orgânica (L), constituída por Diclorometano, Poli-ε-(caprolactona) (PCL) e Pluronic F68 e preparação da fase aquosa 2 (H2), constituída por água destilada e Acetato de polivinila (PVA). A formulação e seus usos para tratamento de distúrbios inflamatórios foram reivindicados por nossa patente (BR 10 2017 002700 7), depositada no INPI em abril de 2017.

A formulação final, após evaporação dos solventes pelo evaporador rotativo IKA RV10, continha 10ml que foi obtido por múltipla emulsão no Ultra-Turrax IKA T18 basic, como mostra o Esquema 1.



Esquema 1 – Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas de PCL contendo DEC.

As nanopartículas foram preparadas em três formulações distintas: I. Branca, onde não continha o fármaco (NP B), II. A formulação contendo 1,0mg/ml do fármaco (NP- DEC 10) e III. A formulação contendo 2,5mg/ml do fármaco (NP-DEC 25).

Caracterização do sistema nanoparticulado

Tamanho de partícula, Potencial Zeta e Índice de polidispersão

O tamanho médio e a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das nanopartículas foram analisados usando dispersão dinâmica de luz (DLS) no analisador de partículas Zetanosizer[®] Zs90 (Malvern), do Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID) – UFRN. Obtivemos a carga de superfície eletrostática no mesmo equipamento. A diluição foi de 1:1000, em triplicata. As leituras foram executadas a 25°C, com ângulo de incidência de 90°.

Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), com o microscópio Tecnai G20 (FEI). Foi utilizado o ácido fosfotúngstico 2% (PTA 2%) como contraste negativo. Primeiramente uma gota da suspensão contendo as nanopartículas foi adicionada a grelha de cobre. Após 1 minuto o excesso de amostra foi retirado com auxílio de papel filtro. Logo depois foi adicionada uma gota do PTA 2%. Após 1 minuto foi retirado o excesso do PTA 2% com papel filtro. Foi feito secagem ao ar para então serem observadas no microscópio.

Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro IRPrestige-21 Shimadzu[®] acoplado a um acessório de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Os espectros foram obtidos na faixa de 4000-700 cm^{-1} , com 20 varreduras à temperatura ambiente.

Difratometria de pós por Raio X (DRX)

Os difratogramas foram obtidos em difratômetro da marca BRUKER, modelo PHASER D2. Foi utilizado fonte de radiação Cu-K α , varredura angular 2 θ de 2°/min, com intervalo de varredura entre 5° e 70°.

Curva de calibração

Uma solução estoque de DEC (1mg/ml) foi preparada utilizando o meio empregado na cinética de liberação (água destilada). A partir desta solução, diferentes diluições foram realizadas nas concentrações 1µg/ml, 2µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml e 100µg/ml, em triplicata. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS, modelo Spectrum SP2000UV, no comprimento de onda de 211nm (valor obtido por varredura). A equação da curva foi obtida utilizando o Microsoft Excel 2013[®].

Cinética de liberação

A cinética de liberação *in vitro* foi determinada utilizando o método de membrana de diálise. Após obtenção das nanopartículas, a formulação foi transferida para a membrana de diálise (Dialysis Tubing Cellulose Membrane 25mmx16mm, referência D9777-100FT, 12.000 KDa Sigma-Aldrich[®]), que logo em seguida foi colocada em 100ml de água destilada. Todo o sistema foi mantido a temperatura ambiente com agitação contínua, a 500rpm. Em dados intervalos de tempo (min: 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 1440, 2880, 4320, 5760 e 7200), retirou-se 2mL de solução aquosa do meio de liberação, devolvendo 2mL de água destilada para o meio, a cada coleta. A concentração do soluto foi verificada utilizando o espectrofotômetro, a 211nm, e calculada pela curva de calibração. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Teste de toxicidade

Cultura de células

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram fornecidas pelo banco de células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As linhagens de células foram mantidas no meio RPMI 1640 nutriente suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibióticos (100 µg / mL de penicilina e estreptomicina) em uma incubadora de CO₂ a 5% a 37 ° C. O meio de cultura foi trocado após o período de 48 horas.

Ensaio de viabilidade celular

As soluções estoques de cada formulação testada foram preparadas em água destilada e diluídas até as concentrações desejadas (6,25µg/ml, 12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml e 200µg/ml) antes das experiências em um meio RPMI completo. A viabilidade celular foi determinada usando brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium pelo o teste de MTT (Mosmann, 1983). Linhas de células HUVEC, a uma densidade de 3×10^4 células/mL, foram inseridas em placas de 96 poços em contato com diferentes concentrações das formulações utilizadas, durante 24 e 72 horas a 37°C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Depois disso, o MTT (5 mg / mL em PBS) foi incubado durante 3h nas mesmas condições descritas anteriormente. O produto do MTT, formazan, foi dissolvido em SDS/HCl 0,01mol.L⁻¹ e a densidade óptica foi registada num espectrofotómetro a 570nm.

Avaliação em modelo de inflamação hepática aguda

Animais

Quarenta e dois camundongos machos C57Bl/6, com idade de 5 semanas e peso médio de 16g, foram obtidos no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - FIOCRUZ (PE-BR). O estado de saúde dos camundongos foi examinado e os animais foram aclimatados a um ambiente laboratorial de 23°C e um foto período escuro de 12 h em 12 horas. Os animais foram alojados em gaiolas metálicas e alimentados com uma dieta padrão e água *ad libitum*. O Comitê de Ética em Estudos Animal do Instituto Oswaldo Cruz aprovou todos os experimentos relatados (n. ° 72/2014).

Soluções de DEC

As soluções foram compostas por água destilada e DEC livre ou nanoencapsulada foram ajustadas de acordo com o peso corporal de cada animal. Elas foram administradas através de injeção intraperitoneal (100 µl / dia). O grupo de controle (Cont) recebeu apenas água destilada através da mesma via de administração.

Grupos experimentais

A inflamação aguda foi induzida por administração intraperitoneal de Hepatotoxina tetracloreto de carbono (CCl₄) administrando 0,1 µL / g de peso corporal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) dissolvido em azeite (volume final, 100 µl por camundongo) (Allman, 2010). Uma única injeção foi administrada no sexto dia de tratamento com DEC ou nanopartículas com DEC (NP-DEC). Foram administrados DEC (25 mg/kg e 50 mg/kg) e NP-DEC (25 mg/kg e 10 mg/kg) através de injeção intraperitoneal durante 6 dias (1 injeção / dia) antes da administração de CCl₄. Os grupos de controle receberam água destilada através da mesma via. Os camundongos C57BL/6 foram separados em seis grupos (n = 7 / grupo): (1) o grupo controle (Cont), que recebeu apenas água destilada; (2) o grupo CCl₄ (CCl₄); (3) o grupo DEC 25 mg/kg mais CCl₄ (CCl₄ + DEC 25); (4) o grupo DEC 50 mg/kg mais CCl₄ (CCl₄ + DEC 50); (5) o grupo NP-DEC 10 mg/kg mais CCl₄ (CCl₄ + NP-DEC 10) e (6) o grupo NP-DEC 25 mg/kg mais CCl₄ (CCl₄ + NP-DEC 25). 24 horas após a última administração intraperitoneal, os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e ketamina 100 mg/kg) e sacrificados por luxação cervical.

Determinações bioquímicas

O perfil lipídico do soro foi avaliado (colesterol total, lipoproteína de alta densidade-HDL, lipoproteína de baixa densidade-LDL e triglicerídeos) e o dano hepático foi avaliado com base na aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As concentrações séricas foram medidas pelo método espectrofotométrico com uma Integra 400 (Roche®, Basileia, Suíça). Os dados foram comparados pela ANOVA unidirecional e os testes de Dunnett ou Tukey, com GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad® Software, San Diego, CA, EUA).

Histopatologia

Coloração com hematoxilina-eosina (HE)

Os fragmentos de fígado foram fixados em 10% de formol durante 24 h, processados e incluídos em parafinas. Secções de 5 µm foram cortadas e montadas em lâminas de vidro. As fatias foram coradas com HE e avaliadas por microscopia de luz invertida (Observador Z1;

Zeiss MicroImaging[®], Jena, Alemanha), câmera, e software de análise de imagem 4.7.4 (AxionCam MRm[®]; Zeiss, Jena, Alemanha) em magnificação de x400.

Ensaio imuno-histoquímico

Cinco cortes (5 µm de espessura) de cada grupo foram aderidos a lâminas tratadas com 3-amino-propil-tri-etoxi-silano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As seções foram desparafinadas com xileno e reidratadas em etanol graduado (100 a 70%). As seções foram então aquecidas durante 30 minutos num tampão de citrato de sódio (0,01 M, pH 6,0) e tratadas com H₂O₂ a 0,3% (v/v) em água durante cinco minutos. As seções foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 0,01 M (pH 7,2) e depois com tampão bloqueador 1% de albumina de soro bovino (BSA) e 0,2% de Tween 20 em PBS durante 1 h à temperatura ambiente. As seções foram incubadas durante 12 horas a 4°C com os seguintes anticorpos: anticorpo anti-PGE2 (diluição 1: 100; ab2318; Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-TNF-α (diluição 1: 100; 500-P64; PreproTech, Londres, Reino Unido), anti-iNOS (diluição 1: 250; ab3523; Abcam) e anti-COX-2 (diluição 1: 400; ab15191; Abcam). A reação antígeno-anticorpo foi visualizada com avidina-biotina peroxidase (DakoUniversal LSAB + Kit, peroxidase), utilizando 3,3-diaminobenzidina como cromogênio. As lâminas foram contrastadas em hematoxilina. A coloração positiva resultou em um produto de reação marrom. Os controles negativos foram tratados como acima, com exceção do primeiro anticorpo, que foi omitido. Cinco imagens na mesma ampliação foram analisadas quantitativamente usando o software GIMP[®] 2.6 (GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX).

Medição do óxido nítrico

A reação colorimétrica de Griess foi utilizada para a medição de óxido nítrico (NO), que envolveu a detecção de nitrito (NO₂⁻) e a oxidação do NO no fígado. Em duplicata, adicionou-se 50 µl de homogeneizado de fígado a uma placa de ELISA de 96 poços, seguido pelo mesmo volume de reagente de Griess, composto por 1% de sulfanilamida diluída em 2,5% de Ácido fosfórico (H₃PO₄) (solução A) e N-1-naftil-etilenodiamina, também diluído em 2,5% de H₃PO₄ (solução B). Para preparar a curva padrão, uma solução de nitrito de sódio em uma concentração inicial de 100 µM foi diluída em série em PBS. Após a incubação durante 10 minutos no escuro, uma leitura foi realizada no espectrofotômetro a 490 nm. A

absorbância de diferentes amostras foi comparada com a curva padrão e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da duplicata, usando o programa GraphPad® Prism 6.01.

Atividade da glutathione redutase hepática

Os tecidos do fígado foram adquiridos e pesados. Cada peça foi homogeneizada usando o tampão do fabricante (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan, número de catálogo: KA0881) e centrifugada a 10.000 vezes por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para estimar a atividade da glutathione redutase hepática usando o kit de ensaio, seguindo as instruções do fabricante.

Western blot

Os fígados foram rapidamente dissecados e depois homogeneizados em Wheaton Overhead Stirrer (modelo 903475; Wheaton Science Products, Millville, NJ, EUA) usando um coquetel de extração de 10 mmol / L de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 2 mmol / L de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 100- mmol / L de sódio, 10-mmol / L de pirofosfato de sódio, 10 mmol / L de ortovanadato de sódio, 10 mg de aprotinina e 100 mmol / L de Tris (hidroximetil) aminometano (pH 7,4). Os ensaios de Western blot foram então realizados de acordo com a metodologia descrita anteriormente (Rodrigues, 2015). Os anticorpos utilizados foram: anticorpo anti-IL-1 β (diluição 1: 1000; ab9722; Abcam, Cambridge, Reino Unido), TNF- α (diluição 1: 1000; 500-P64; PrepoTech, Londres, Reino Unido), anti-iNOS (1: Diluição 1000; ab3523; Abcam) e anti-COX-2 (diluição 1: 1000; ab15191; Abcam).

Análise estatística

GraphPad® Prism versão 6.01 foi utilizado para a análise estatística. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças entre o controle e os grupos tratados foram analisadas por ANOVA e teste de Dunnett, teste de Tukey ou teste t como teste post hoc. Os valores de probabilidade inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Produção de nanopartículas

As nanopartículas foram produzidas com sucesso de acordo com a metodologia descrita, onde foram obtidos 10mL da formulação final que continha um aspecto leitoso, translucido e de cor branca em todas as formulações.

Caracterização do sistema nanoparticulado

Tamanho de partícula, potencial Zeta e índice de polidispersão

A **Tabela 1** apresenta os valores de tamanho médio, potencial Zeta e índice de polidispersão das nanopartículas nas três formulações. Como pode ser observado, o diâmetro médio das nanopartículas variou em relação à quantidade de fármaco. Conforme demonstrado por Lucena (2014), a presença do fármaco na formulação fez com que o tamanho médio das nanopartículas diminuíssem em relação à formulação branca, mas aumentassem em relação a quantidade de fármaco encapsulado.

As análises de potencial Zeta, utilizada neste estudo para analisar a estabilidade, indicaram a obtenção de partículas pouco estáveis e com carga negativa (provavelmente decorrentes da presença de ácidos carboxílicos terminais na estrutura do polímero) (MORA-HUERTAS et al., 2010). O índice de polidispersão (PDI), que fornece informações referente a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, caracterizou as formulações como monodispersas (PDI menor ou igual a 0,3) (MACHADO, 2012).

Tabela 1. Caracterização do sistema nanoparticulado

Quantidade de fármaco (mg/ml)	Tamanho (d.nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de Polidispersão
Sem fármaco (Branco)	364,4 ± 3,439	-3.42 ± 0,0416	0,309 ± 0,030
1,0	298,7 ± 3,870	-3,07 ± 0,347	0,168 ± 0,018
2,5	329,8 ± 1,082	-8,17 ± 1,56	0,260 ± 0,011

Análise morfológica

As nanopartículas apresentaram forma predominantemente esférica, individuais e sem presença de agregados. A formulação com melhor aspecto morfológico foi a que continha 1mg/ml de DEC (Figura 2b). As nanopartículas contendo 2,5mg/ml de DEC apresentaram formas irregulares e pouco definidas como observado na Figura 2d.

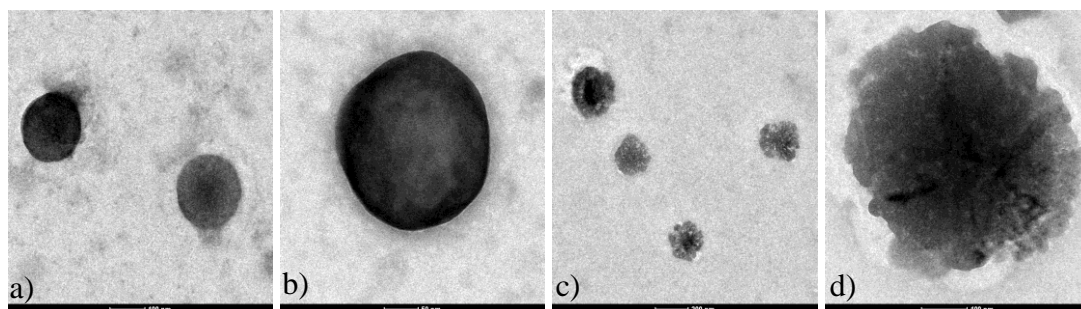


Figura 2 – Microscopia eletrônica de transmissão das NPs. (A) e (B) NP-DEC 10. (C) e (D) NP-DEC 25.

Espectroscopia na região do infravermelho

A caracterização do sistema nanoparticulado por meio da espectroscopia na região do infravermelho foi realizada a partir da comparação dos valores encontrados com os valores da literatura (BADRI, 2017; KAMARAJ, 2017; ROLIM, 2012). A figura 3 apresenta o espectro de IV, obtido por ATR.

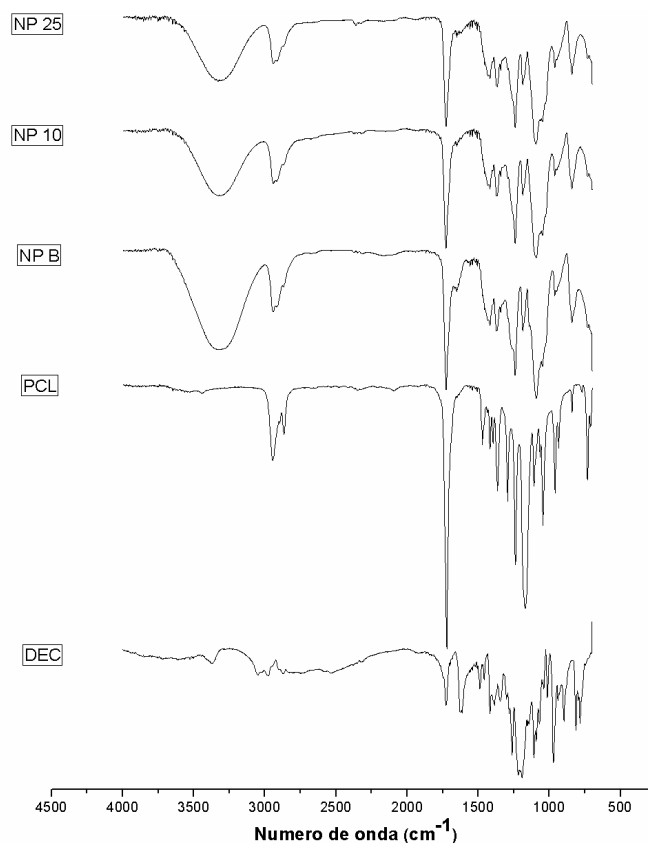


Figura 3 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Representação do citrato de dietilcarbamazina livre (DEC), policaprolactona (PCL), nanopartículas brancas (NP B), nanopartículas contendo 1 mg / ml de DEC (NP 10) e nanopartículas contendo 2,5 mg / ml de DEC (NP 25).

O espectro na região do IV foi realizado com as nanopartículas, o polímero utilizado (PCL) e o DEC. No espectro do DEC, podemos observar um pico curto em 2976 cm^{-1} , referente a ligação C-H com hibridização sp^3 , e outro em 3047 cm^{-1} , também referente a ligação C-H, possivelmente não tão evidentes devido a ligação O-H encontrada no agrupamento ácido do citrato do DEC. Ainda, picos em 1726 cm^{-1} e 1624 cm^{-1} , relacionados a carbonila, porém, o segundo pico, se apresentando um pouco abaixo do esperado devido a influência de outras ligações. Além destes, um pico característico em 1192 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação C-N.

Os padrões do PCL e das nanopartículas também pode ser observado na Figura 3. As bandas características do PCL apareceram em 2943 cm^{-1} , relacionado ao estiramento acíclico assimétrico e 2866 cm^{-1} , relacionado ao estiramento acíclico simétrico (C-H). Além disso, um pico acentuado, característico da carbonila, mostrou-se em 1720 cm^{-1} . As ligações C-O e C-C do PCL apareceram em 1292 cm^{-1} e a vibração C-O-C apareceu em 1170 cm^{-1} , simétrico, e 1238 cm^{-1} , assimétrico.

Por fim, pode ser observado uma faixa ampla com pico em 3321 cm^{-1} , para NP B, NP 10 e NP 25, correspondente ao modo de vibração de estiramento do O-H. Da mesma forma, observou-se uma banda em 2943 cm^{-1} , para NP B, e 2941 cm^{-1} , para NP 10 e NP 25, e pico a 1724 cm^{-1} , 1726 cm^{-1} e 1724 cm^{-1} , NP B, NP 10 e NP 25, respectivamente, mostrando similaridade com os picos característicos do PCL. Além da vibração C-O-C bastante expressiva, mostrando-se em 1095 cm^{-1} para ambas amostras de NPs.

Difratometria de pós por Raio X (DRX)

A Figura 4 apresenta os difratogramas das amostras de DEC, PCL e das nanopartículas, com três perfis distintos caracterizados e comparados com os valores encontrados na literatura (Dalmolin, 2016; De Abreu, 2014; Rolim, 2012)

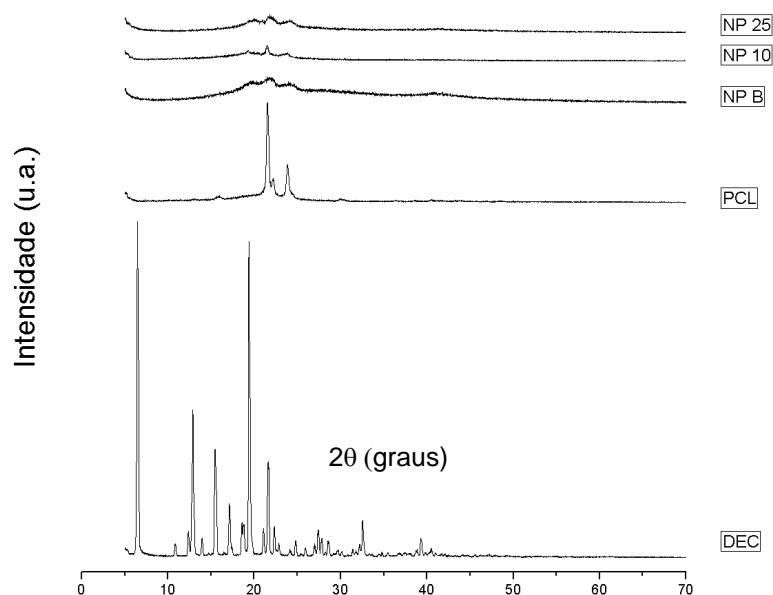


Figura 4 – Difratograma de raios X de dietilcarbamazina livre (DEC), policaprolactona (PCL), nanopartículas brancas (NP B), nanopartículas contendo 1 mg / ml de DEC (NP 10) e nanopartículas contendo 2,5 mg / ml de DEC (NP 25).

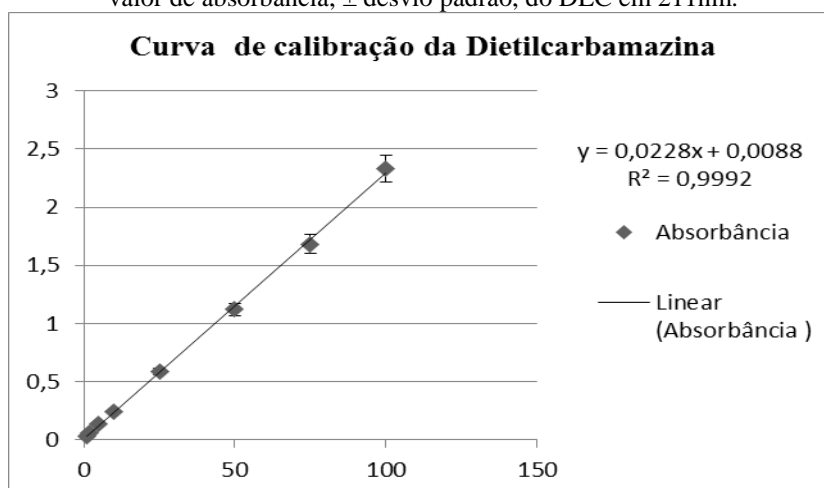
A estrutura essencialmente cristalina se apresenta na amostra de DEC, devido a presença de inúmeros picos ao decorrer do difratograma, com o pico mais intenso e característico a $6,46^\circ$ e picos secundários em $12,8^\circ$, $15,5^\circ$, $19,4^\circ$ e $21,7^\circ$.

Pode ser observado que as nanopartículas com DEC apresentaram um comportamento semelhante as brancas, sendo um forte indicativo de que o fármaco estaria disperso molecularmente na matriz polimérica, uma vez que não se observou nenhum padrão de difração exclusivamente característico do fármaco. Além disso, pode se observar dois picos principais, em 21,7° e 24,1°, para NP B, 21,5° e 23,8°, para NP 10 e 21,7° e 24,1°, para NP 25, relacionados a estrutura semicristalina do polímero, que apresentou picos em 21,5° e 23,8°.

Curva de calibração

A curva de calibração foi gerada com sucesso de acordo com a metodologia descrita, onde foi obtido a equação da reta posteriormente utilizada para os cálculos da cinética. A equação e o R^2 da curva pode ser observado no **Gráfico 1**.

Gráfico 1 – Curva de calibração do DEC, onde o eixo X representa a concentração das diluições e o eixo y o valor de absorvância, \pm desvio padrão, do DEC em 211nm.



Cinética de liberação

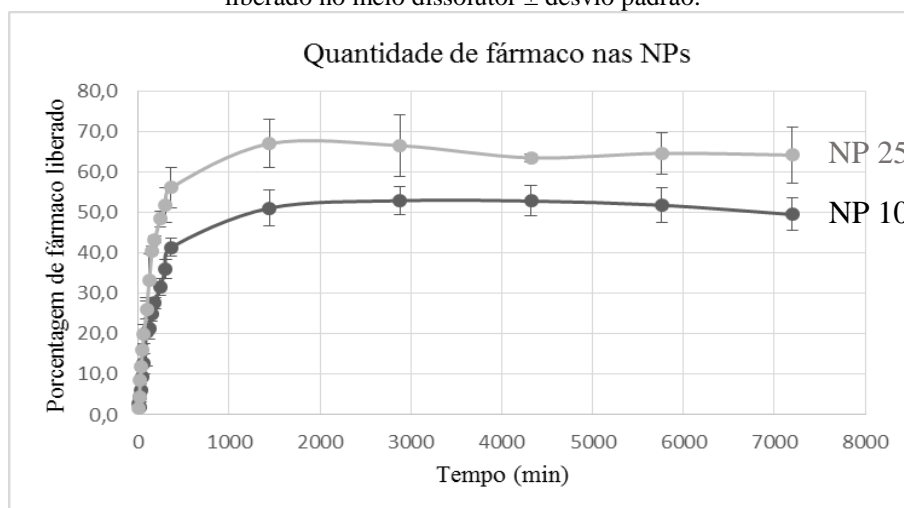
O DEC é bastante hidrofílico como mostrado na literatura e possui curta duração no organismo (Gill, 2013, Dreyer & Norões,1997). Para a cinética de liberação o meio de dissolução empregado foi água destilada.

Tabela 2 – Cinética de liberação *in vitro* de nanopartículas contendo DEC, em concentração no meio com \pm desvio padrão.

Tempo de coleta (minutos)	Concentração no meio (mg/ml) \pm desvio padrão		
	NP B	NP 10	NP 25
5	0,009 \pm 0,1367	0,2699 \pm 0,6977	0,4307 \pm 0,1900
10	0,009 \pm 0,1194	0,1822 \pm 0,3097	1,0798 \pm 0,0729
20	0,009 \pm 0,1064	0,4556 \pm 0,3021	2,1412 \pm 0,0761
30	0,009 \pm 0,1444	0,6149 \pm 0,2888	2,9746 \pm 0,2591
45	0,009 \pm 0,1297	0,9336 \pm 0,3014	4,0184 \pm 0,3114
60	0,009 \pm 0,0527	1,2611 \pm 0,2506	4,9643 \pm 0,5843
90	0,009 \pm 0,0355	2,0608 \pm 0,8473	6,4804 \pm 0,5409
120	0,009 \pm 0,0282	2,1412 \pm 0,2676	8,3313 \pm 1,6322
150	0,009 \pm 0,0359	2,4848 \pm 0,1738	10,1339 \pm 0,2628
180	0,009 \pm 0,0505	2,7626 \pm 0,1370	10,8313 \pm 0,2001
240	0,009 \pm 0,0375	3,1617 \pm 0,2005	12,1105 \pm 0,4985
300	0,009 \pm 0,0689	3,6003 \pm 0,2454	12,9585 \pm 1,0725
360	0,009 \pm 0,0067	4,1383 \pm 0,2174	14,0389 \pm 1,2594
1440	0,009 \pm 0,0812	5,1105 \pm 0,4518	16,7553 \pm 1,5022
2880	0,009 \pm 0,0351	5,2933 \pm 0,3581	16,6368 \pm 1,8815
4320	0,009 \pm 0,0307	5,2845 \pm 0,3750	15,8847 \pm 0,2379
5760	0,009 \pm 0,0158	5,1822 \pm 0,4173	16,1639 \pm 1,2733
7200	0,009 \pm 0,0945	4,9526 \pm 0,4042	16,0484 \pm 1,7131

O ensaio do perfil de liberação *in vitro* foi realizado com as NP brancas, NP-DEC 10 e NP-DEC 25. No ensaio foi utilizado como controle as NP B; tais mostraram um valor muito baixo, o que tornou possível o desenvolvimento do experimento no espectrofotômetro. A concentração do meio dissolutor (valor da absorbância em mg/ml) é representado, em média, na **Tabela 2**.

Gráfico 2 – Cinética de liberação *in vitro* de nanopartículas contendo DEC, média da porcentagem de fármaco liberado no meio dissolutor \pm desvio padrão.



Analisando os resultados é observado que em 360 minutos houve uma liberação de 41,4%, para as NP-DEC 10 e 56,2%, para as NP-DEC 25. A partir do Tempo (T) 1440 observa-se valores mais estáveis, ou constantes. Foi considerado como quantidade total de fármaco liberado 5,3 μ g em T2880, para NP-DEC 10 e 16,8 μ g em T1440, para NP-DEC 25, o que expressa uma menor taxa de liberação em função do tempo se comparado com o fármaco livre. A eficiência de encapsulação foi de 52,9% e 67,0%, para NP-DEC 10 e NP-DEC 25, respectivamente.

Teste de toxicidade

O efeito citotóxico das nanopartículas e do DEC foi avaliado, pela técnica de MTT, na linhagem HUVEC. Na **Tabela 3**, podemos observar os resultados expresso para ausência e presença de efeito significativo na viabilidade.

Tabela 3 - Efeito citotóxico do DEC livre e em nanopartículas em células HUVEC, após um período de 24 e 72 horas de incubação. Resultados expressos como (–) para ausência de efeito significativo, (\pm) para efeito com 10-30% de redução da viabilidade. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$.

Amostras	Tempo (horas)	
	24	72
DEC	-	-
NP B	-	-
NP 10	-	\pm
NP 25	-	-

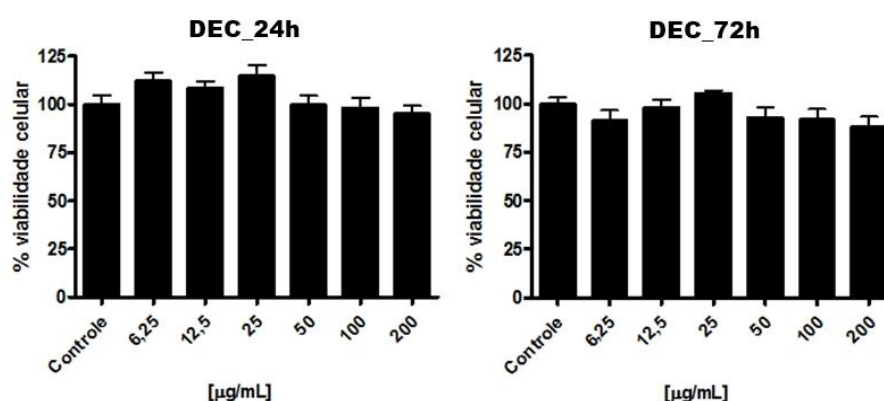


Figura 5 – Efeito citotóxico do DEC livre em células HUVEC \pm desvio padrão. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

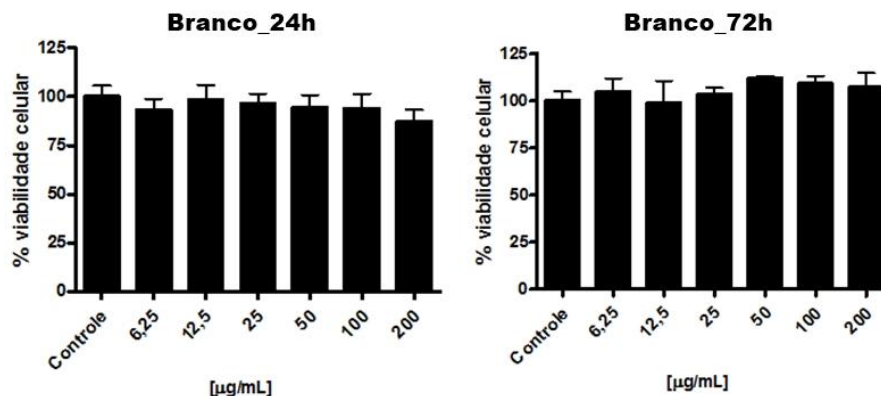


Figura 6 – Efeito citotóxico das nanopartículas brancas em células HUVEC \pm desvio padrão. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

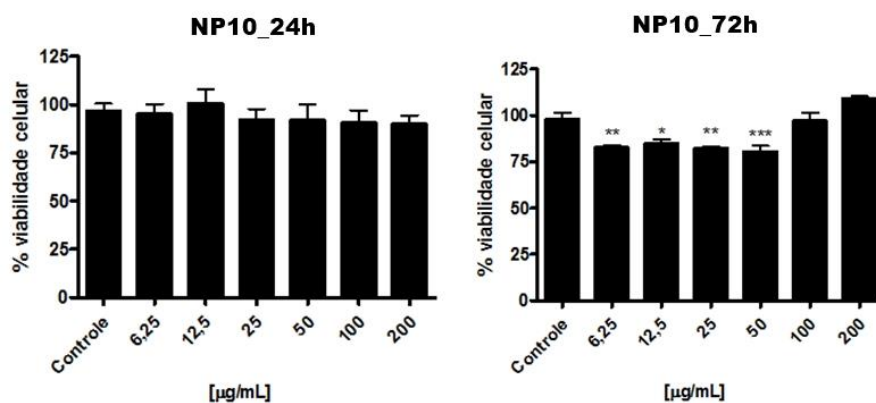


Figura 7 – Efeito citotóxico das nanopartículas contendo 1,0 mg/ml de DEC em células HUVEC \pm desvio padrão. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

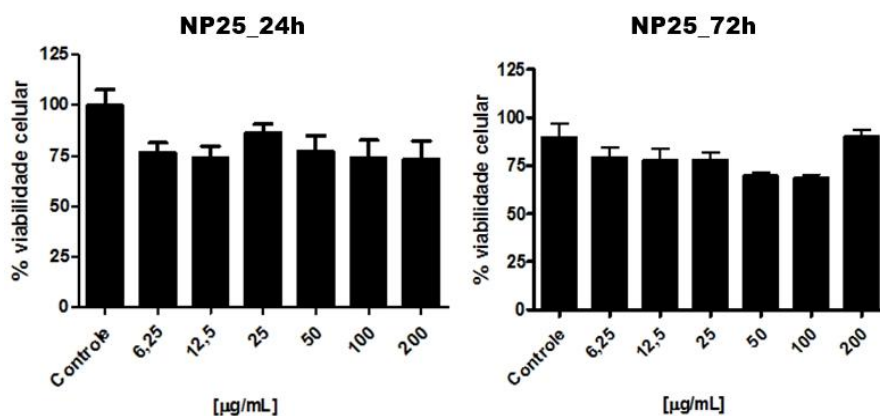


Figura 8 – Efeito citotóxico das nanopartículas contendo 2,5 mg/ml de DEC em células HUVEC \pm desvio padrão. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Os resultados não mostraram mudanças significantes na viabilidade celular dentro da faixa de concentração selecionada (6,25 – 200 $\mu\text{g/ml}$). O DEC não apresentou efeito citotóxico em nenhuma das concentrações testadas e independente do tempo de exposição

utilizado neste experimento, assim como a formulação NP-DEC 25, apenas na formulação NP-DEC 10 exposta ao maior tempo de incubação (72 horas), observa-se uma leve redução da viabilidade (<20%).

Como mostrado por Dreyer & Norões (1997), o DEC atua diferentemente *in vivo* e *in vitro*, onde *in vivo* altera o metabolismo de células endoteliais, mostrando atividade citotóxica nas plaquetas e granulócitos. Entretanto, os resultados encontrados indicam que a citotoxicidade mostrada pela formulação NP 10 não pode ser creditada ao fármaco liberado, sendo necessário a avaliação junto a outros parâmetros.

Avaliação em modelo de inflamação hepática aguda

Perfil lipídico e níveis de transaminases

Na análise bioquímica do perfil lipídico, o grupo CCl₄ apresentou um aumento significativo no conteúdo de colesterol total (Figura 9A) e triglicérido (Figura 9D) em comparação com o grupo controle. Os grupos CCl₄ + DEC 25 e CCl₄ + NP-DEC 10 não reduziram significativamente os marcadores lipídicos. No entanto, os grupos CCl₄ + DEC 50 e CCl₄ + NP-DEC 25 reduziram o teor de lipídio circulante quando comparado ao grupo CCl₄.

O colesterol HDL foi significativamente reduzido em todos os grupos em comparação com o controle (Figura 9B). No entanto, o grupo CCl₄ + NP-DEC 25 aumentou significativamente o teor de colesterol HDL em comparação com o grupo CCl₄. LDL forneceu resultados opostos (Figura 9C), com todos os grupos exibindo um aumento significativo em relação ao grupo de controle e apenas o grupo CCl₄ + NP-DEC 25 mostrando uma redução significativa em comparação com o grupo CCl₄.

Na avaliação dos marcadores de danos no fígado (Figura 9E e F), as transaminases AST e ALT exibiram um aumento significativo no grupo CCl₄ em comparação com o grupo controle. Os grupos CCl₄ + DEC 25 e CCl₄ + NP-DEC 10 também apresentaram aumento significativo em ambas as enzimas. Os grupos CCl₄ + DEC 50 e CCl₄ + NP-DEC 25, no entanto, exibiram uma redução nos marcadores de danos no fígado em comparação com o grupo inflamado.

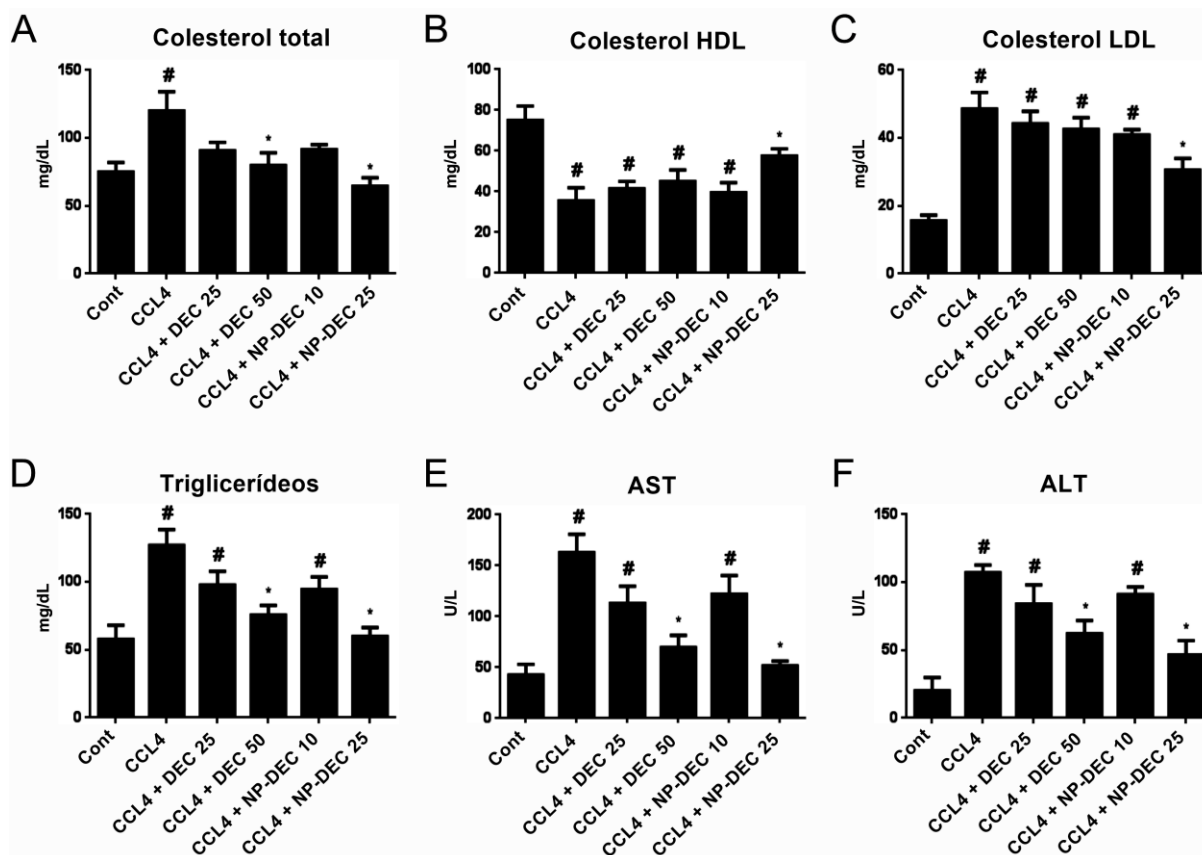


Figura 9 - Parâmetros bioquímicos. (A) Colesterol total. (B) Colesterol HDL. (C) Colesterol LDL. (D) triglicerídeos. (E) Aspartato aminotransferase (AST). (F) Alanina aminotransferase (ALT). Os resultados são expressos como média \pm DP de três camundongos por grupo. * $p < 0,05$ vs CCl₄; # $p < 0,05$ vs controle. CCl₄, tetracloreto de carbono; Cont, controle; DEC, dietilcarbamazina.

Como pode ser observado o NP-DEC 25 melhorou o perfil lipídico, reduzindo o teor total de colesterol e triglicerídeos, aumentando o HDL e baixando os níveis de colesterol LDL. As formulações NP-DEC 25 e NP-DEC 10 não melhoraram efetivamente os parâmetros lipídicos enquanto DEC 50 reduziu apenas o teor de triglicerídeos. DEC 50 e NP-DEC 25 foram eficazes na redução das transaminases séricas ALT e AST, marcadores de anomalias no fígado, em comparação com o grupo CCl₄.

Histologia

A análise histológica do fígado identificou a morfologia padrão no grupo controle (Figura 10A), com hepatócitos bem conservados. Várias áreas de necrose perilobular dos hepatócitos foram observadas no grupo CCl₄ (Figura 10B), juntamente com esteatose e células inflamatórias. O grupo CCl₄ + DEC 25 apresentou as mesmas características inflamatórias do grupo CCl₄ (Figura 10C), com várias áreas de hepatócitos danificados.

Os grupos CCl₄ + DEC 50 e CCl₄ + NP-DEC 10 apresentaram uma pequena diminuição da morte de hepatócitos, incluindo nas regiões necróticas, mas ainda estavam presentes alterações inflamatórias (Figura 10D e E). O grupo tratado com NP-DEC 25 apresentou distúrbios inflamatórios mais baixos, com maior preservação do estroma hepático e redução da esteatose com menos áreas necróticas (Figura 10F).

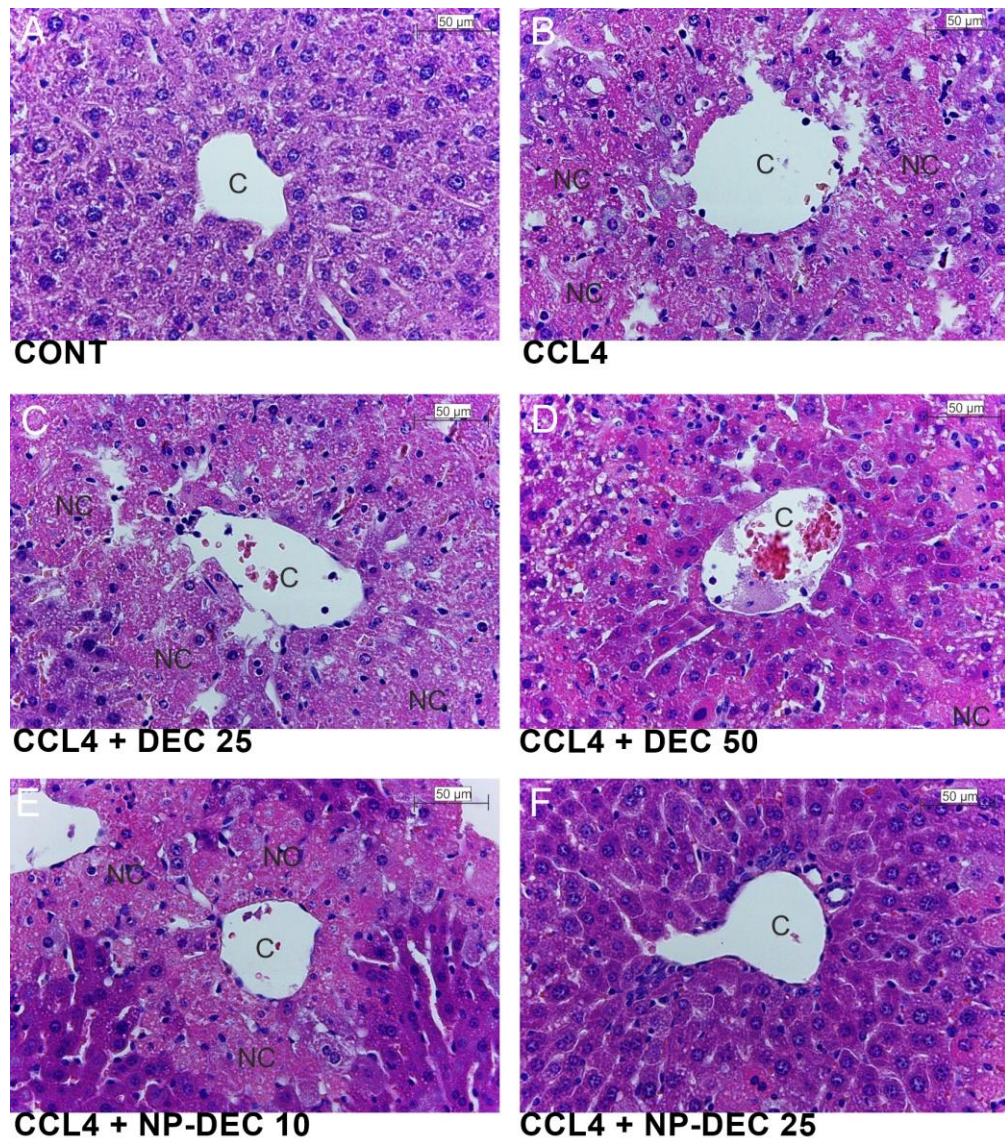


Figura10 – Análise histológica de fragmentos hepáticos na coloração com hemotoxilina e eosina. (A) Grupo de controle. (B) grupo CCl₄. (C) CCl₄ + DEC 25 mg / kg de grupo. (D) CCl₄ + DEC 50 mg / kg grupo. (E) CCl₄ + NP-DEC 1,0 µg / kg grupo. (F) CCl₄ + NP-DEC 2,5 µg / kg grupo. Bar = 50 µm. Ampliação: 400x. Seção fina de fígado = 4-5µm. C, veia centrlobular; CCl₄, tetracloreto de carbono; Cont, controle; DEC, dietilcarbamazina; NC, áreas de necrose.

A inflamação do fígado é normalmente associada à necrose dos hepatócitos e à apoptose (Czaja, 2014). Esta morte de hepatócitos é o principal motor de inflamação crônica

do fígado e fibrose (Seki, 2015). No grupo CCl₄, observou-se uma alta morte de hepatócitos, com significativa necrose perilobular. Os grupos CCl₄ + DEC 50 e CCl₄ + NP-DEC 10 apresentaram uma menor redução na morte celular. Porém, o grupo CCl₄ + NP-DEC 25 reduziu de fato a morte de hepatócitos e áreas de necrose, indicando um efeito hepatoprotetor.

Expressão de marcadores inflamatórios

Para avaliar os efeitos hepatotóxicos do CCl₄, foi realizada imuno-histoquímica para TNF- α (Figura 11 - TNF- α). O grupo inflamatório demonstrou positividade elevada ao TNF- α , assim como os grupos CCl₄ + DEC 25, CCl₄ + DEC 50 e CCl₄ + NP-DEC 10. O grupo CCl₄ + NP-DEC 25 apresentou positividade significativa do TNF- α em comparação com o grupo inflamatório.

O DEC é um inibidor conhecido da enzima COX-2. A expressão de PGE₂, um produto da ciclooxygenase 2, foi avaliada (Figura 11 - PGE₂). O grupo CCl₄ apresentou alta expressão de PGE₂, assim como os grupos CCl₄ + DEC 25 e CCl₄ + NP-DEC 10. Os grupos tratados com DEC 50 e NP-DEC 25 reduziram significativamente a expressão de PGE₂.

Todos os grupos apresentaram rotulagem elevada da enzima inflamatória iNOS em comparação com o grupo controle (Figura 11 - iNOS). Somente o grupo CCl₄ + NP-DEC 25 reduziu a rotulação de iNOS quando comparado ao grupo CCl₄.

De acordo com os resultados da PGE₂, os grupos CCl₄, CCl₄ + DEC 25 e CCl₄ + NP-DEC 10 apresentaram alta expressão da enzima inflamatória COX-2 (Figura 11 - COX-2). Os grupos CCl₄ + DEC 50 e CCl₄ + NP-DEC 25 reduziram significativamente a expressão da ciclooxygenase-2 quando comparados com o grupo inflamado.

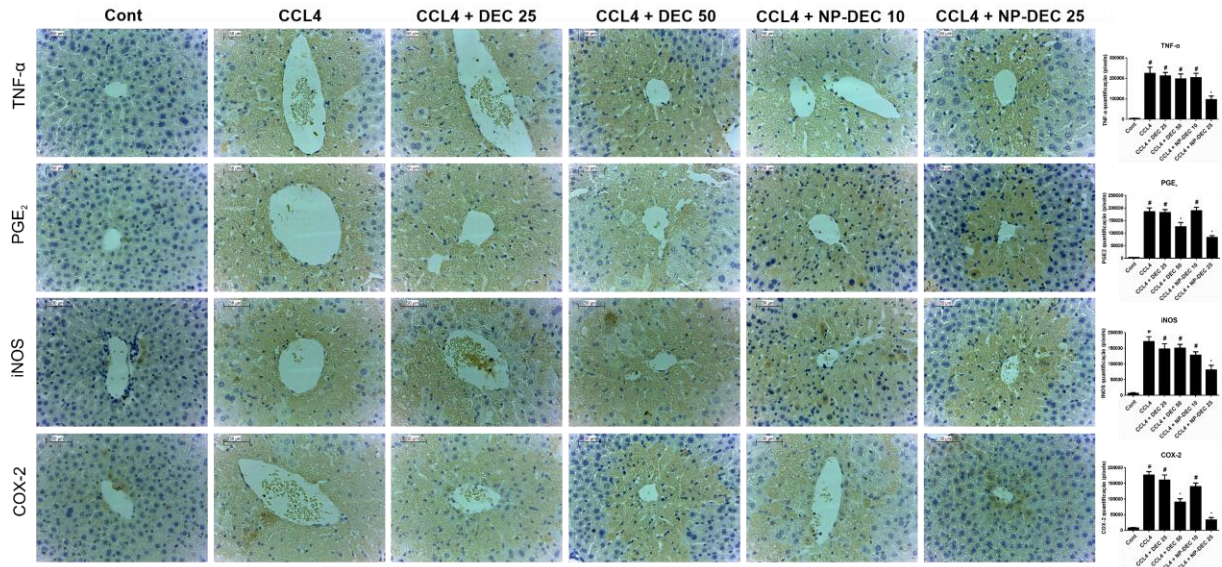


Figura 11 – Imuno-histoquímica para TNF- α , PGE₂, iNOS e COX-2 no fígado. A quantificação (sete áreas selecionadas arbitrariamente por animal) foi realizada usando o software de análise de imagem GIMP 2.8 (n = 3 animais por grupo). Os resultados são expressos como média \pm DP de três camundongos por grupo. *p < 0,05 vs CCL4; #p < 0,05 vs controle. Bar = 50 μ m. Ampliação: 400x. Seção fina de fígado = 4-5 μ m. CCL4, tetracloreto de carbono; Cont, controle; COX-2, ciclooxigenases-2; DEC, dietilcarbamazina; iNOS, sintase de óxido nítrico induzível; PGE₂, prostaglandina E₂; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa.

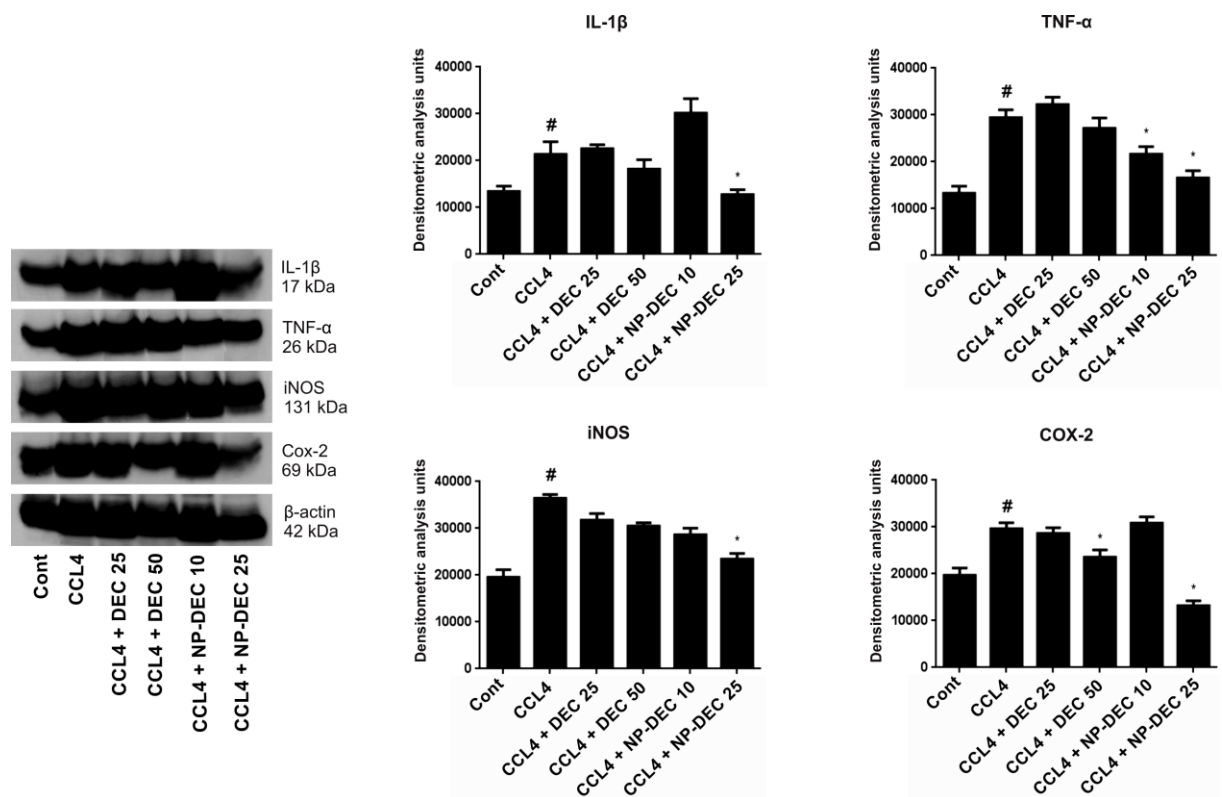


Figura 12 – Western Blot para IL-1 β , TNF- α , iNOS e COX-2. A análise densitométrica foi realizada com o software IMAGEJ 1.38. Os resultados são expressos como média \pm DP de cinco camundongos por grupo. *p < 0,05 vs CCL4; #p < 0,05 vs controle. CCL4, tetracloreto de carbono; Cont, controle; COX-2, ciclooxigenases-2; DEC, dietilcarbamazina; IL-1 β , interleucina 1 beta; iNOS, óxido nítrico-sintase induzida; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa.

Na análise Western Blot (Figura 12), o grupo inflamatório apresentou alta expressão de citocinas de IL-1 β , assim como os grupos CCl₄ + DEC 25 e CCl₄ + NP-DEC 10. Apenas o grupo CCl₄ + NP-DEC 25 reduziu significativamente a expressão de IL-1 β em comparação com o grupo CCl₄.

Na avaliação de expressão TNF- α , os grupos CCl₄, CCl₄ + DEC 25 e CCl₄ + DEC 50 apresentaram aumento na expressão de citocinas quando comparado ao grupo controle. No entanto, os grupos tratados com NP-DEC 10 e NP-DEC 25 reduziram a expressão de TNF- α em comparação com o grupo inflamatório.

Semelhante aos resultados encontrados na imuno-histoquímica, todos os grupos inibiram a alta expressão do iNOS em comparação com o grupo controle. Somente o grupo CCl₄ + NP-DEC 25 reduziu significativamente a expressão da enzima quando comparado ao grupo CCl₄.

Confirmando os resultados obtidos na imuno-histoquímica, os grupos CCl₄, CCl₄ + DEC 25 e CCl₄ + NP-DEC 10 exibiram uma expressão elevada de COX-2. No entanto, os grupos CCl₄ + DEC 50 e CCl₄ + NP-DEC 25 reduzam eficientemente a expressão da ciclo-oxigenase em comparação com o grupo CCl₄.

Devido a ação da enzima citocromo p450 2E1, o CCl₄ induz a produção de radicais triclorometilo que podem levar à peroxidação lipídica, com a produção de radicais livres, ativando as células de Kupffer, que produzem citocinas pró inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (Basu,2003). Os dados de imunohistoquímica e Western blot identificaram altos níveis de TNF- α e IL-1 β em camundongos que receberam CCl₄. O tratamento com NP-DEC 25 foi capaz de prevenir o aumento desses marcadores inflamatórios.

O iNOS, que está expresso em todas as células do fígado, está associado ao desenvolvimento e propagação de uma inflamação. Os grupos tratados com CCl₄ demonstraram níveis elevados de iNOS tanto no Western blot quanto na análise imuno-histoquímica. Apenas o grupo CCl₄ + NP-DEC 25 reduziu significativamente a concentração de iNOS em comparação com o grupo CCl₄.

Rodrigues e cols em 2015, relataram a inibição de COX-2 por DEC a uma concentração de 50 mg/kg, de camundongos C57BL/6, durante 12 dias de tratamento. O presente estudo, com a mesma concentração do DEC e com 6 dias de tratamento foi capaz de reduzir a expressão de COX-2, quando comparado ao grupo tratado com CCl₄. Notavelmente, NP-DEC 25 mostrou maior inibição do citocromo p450 2E1 do que quando submetido ao tratamento com a DEC livre, em concentração superior.

Níveis de óxido nítrico

Na avaliação hepática dos níveis de NO₂ (Figura 13), todos os grupos mostraram um aumento significativo na concentração em comparação com o grupo controle. No entanto, apenas o grupo CCl₄ + NP-DEC 25 conseguiu reduzir significativamente a concentração de NO₂ em relação ao grupo CCl₄.

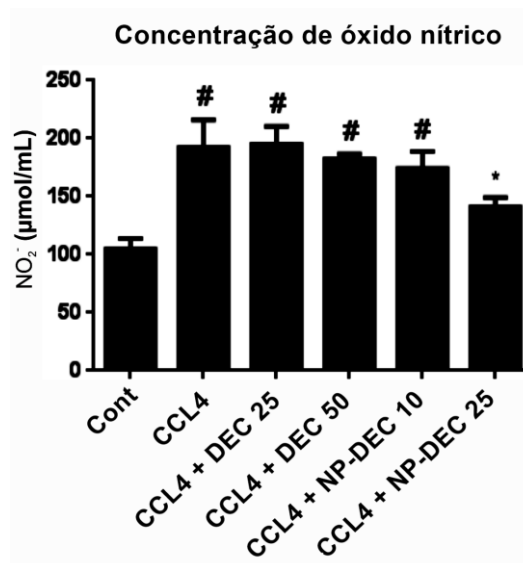


Figura 13 - Avaliação da concentração hepática de óxido nítrico através da medida dos metabolitos totais de nitrito. Os resultados são expressos como média \pm DP de três por camundongos por grupo. *p <0,05 vs CCl₄; #p <0,05 vs controle. CCl₄, tetracloreto de carbono; Cont, controle; DEC, dietilcarbamazina.

Quando o equilíbrio redox é interrompido, o estresse oxidativo resulta em dano celular com inflamação subsequente. Em todos os grupos tratados, tetracloreto de carbono induziu aumento do NO hepático. Apenas o grupo CCl₄ + NP-DEC 25 reduziu a concentração de óxido nítrico.

Atividade da glutathiona redutase

Na avaliação da atividade da glutathiona redutase hepática (Figura 14), o grupo inflamado (CCl₄) apresentou uma redução significativa na produção do substrato enzimático em comparação com o grupo controle. Todos os grupos tratados com DEC apresentaram um aumento da atividade da glutathiona redutase em comparação com o grupo CCl₄. Os resultados sugerem atividade dose-dependente, onde os grupos tratados com DEC nanoencapsulado exibiram maior atividade enzimática no fígado.

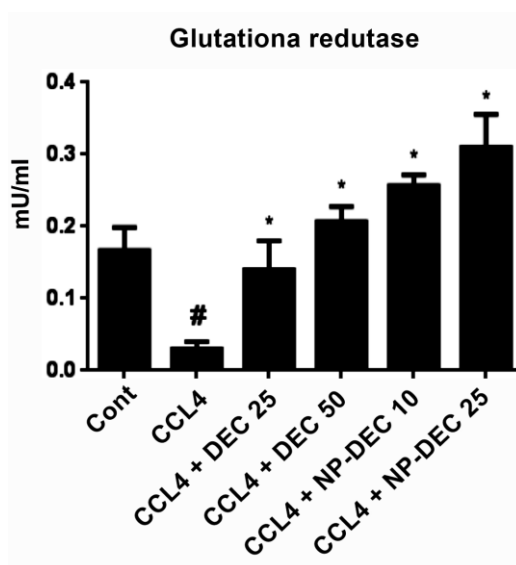


Figura 14 - Avaliação da atividade da glutathiona hepática. Definição da unidade (U): uma unidade é definida com a quantidade de enzimas que gera 1,0 μ mol de ácido 5-thionitrobenzoic (TNB) por minuto a 25 ° C. Os resultados são expressos como média \pm DP de três camundongos por grupo. *p <0,05 vs CCl₄; #p <0,05 vs controle. CCl₄, tetracloreto de carbono; Cont, controle; DEC, dietilcarbamazina.

Utilizou-se a glutathiona redutase hepática como parâmetro para verificar a atividade antioxidante da glutathiona. Verificou-se que a atividade da glutathiona é dose-dependente. Os grupos tratados com as NP de DEC, ambos, apresentaram maior atividade enzimática, provavelmente em consequência do maior tempo em que o fármaco se encontrou retido no fígado. Essas descobertas, junto aos resultados de NO, indicam a ação antioxidante de nanopartículas de DEC no fígado, muito provavelmente em virtude à estimulação da atividade da glutathiona redutase.

CONCLUSÃO

As nanopartículas de PCL contendo DEC foram desenvolvidas com sucesso através da técnica de múltipla emulsão (H/L/H).

A cinética de liberação mostrou um aumento significativo no tempo de liberação do fármaco quando comparado com o fármaco livre.

Os testes *in vivo* mostraram bons resultados para a NP-DEC 25, demonstrando que com uma quantidade menor de fármaco encapsulado e com menor tempo de tratamento conseguimos obter melhores resultados em relação as demais amostras, quando comparado com as análises do presente trabalho e de estudos anteriores.

Portanto, as nanopartículas contendo DEC demonstraram um efeito mais significativo quando comparada com sua formulação convencional, o que representa uma formulação promissora para o tratamento de distúrbios inflamatórios.

PRODUCTION OF NANOPARTICLES CONTAINING DIETHYLCARBAMAZINE FOR
HEPATO-SPECIFIC RELEASE AND EVALUATION IN MODEL OF ACUTE HEPATIC
INFLAMMATION

ABSTRACT

It has been reported that diethylcarbamazine (DEC) and its potent anti-inflammatory effect due glutathione, cytokines and inflammatory enzymes have been reported in previous studies. However, due to the physical-chemical characteristics of this drug, for a better absorption and permanence without organism, a vector, in the case of a nanocarrier, produced by the multiple emulsion method is necessary. The present work aimed at the production of nanoparticles containing DEC for hepato-specific release, characterizing the nanoparticulate system and evaluation in a model of acute hepatic inflammation in C57B1 / 6 mice. The results found revealed nanoparticles with a mean size varying between 298.7 nm and 364.4 nm. They further showed that the drug was found to be molecularly dispersed and had increased release time for nanoencapsulated samples. The 2.5 mg / ml nanoparticle treatment of DEC presented an anti-inflammatory action superior to the traditional dose of DEC (50 mg / kg), restoring a morphology of the liver, Improving serological parameters of view and reducing the expression of inflammatory markers. Therefore, we have achieved a satisfactory formulation with a significant anti-inflammatory effect in liver cells, in addition to the reduction in dose and time of treatment, which represents a promising formulation for the treatment of inflammatory disorders.

Keywords: Hepatitis. Anti-inflammatory. Nanobiotechnology.

REFERÊNCIAS

AKRIVIADIS, E. et al. **Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial.** *Gastroenterology*, v. 119, n. 6, p. 1637-1648, 2000.

ALLMAN, M. et al. **CCl₄-induced hepatic injury in mice fed a Western diet is associated with blunted healing.** *Journal of gastroenterology and hepatology*, v. 25, n. 3, p. 635-643, 2010.

BADRI, W. et al. **Polycaprolactone Based Nanoparticles Loaded with Indomethacin for Anti-Inflammatory Therapy: From Preparation to Ex Vivo Study.** *Pharmaceutical Research*, p. 1-11, 2017.

BAHMANI, M. et al. **A review on most important herbal and synthetic antihelmintic drugs.** *Asian Pacific journal of tropical medicine*, v. 7, p. S29-S33, 2014.

BASU, S. **Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients.** *Toxicology*, v. 189, n. 1, p. 113-127, 2003.

BOETTICHER, N. C. et al. **A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of etanercept in the treatment of alcoholic hepatitis.** *Gastroenterology*, v. 135, n. 6, p. 1953-1960, 2008.

CZAJA, A. J. **Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease.** *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 10, p. 2515, 2014.

DA SILVA, B. S. et al. **Inhibition of NF- κ B activation by diethylcarbazine prevents alcohol-induced liver injury in C57BL/6 mice.** *Tissue and Cell*, v. 46, n. 5, p. 363-371, 2014.

DALMOLIN, L. F. et al. **Delivery of vanillin by poly (lactic-acid) nanoparticles: development, characterization and in vitro evaluation of antioxidant activity.** *Materials Science and Engineering: C*, v. 62, p. 1-8, 2016.

DE ABREU, L. C. L. **Preparo e avaliação de nanossistemas de liberação modificada de nisina para controle e prevenção de patologias ginecológicas.** *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2014.*

DREYER, G. & NORÕES, J. **Dietilcarbamazina no tratamento da filariose bancroftiana.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 30, n. 3, p. 229-240, 1997.

EL, A. E. E. et al. **Antifibrotic effect of diethylcarbamazine combined with hesperidin against ethanol induced liver fibrosis in rats.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 89, p. 1196-1206, 2017.

FRAGOSO, I. T. et al. **Diethylcarbamazine attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by apoptosis of inflammatory cells.** Pharmacological Reports, v. 69, n. 1, p. 81-89, 2017.

GILL, P. **Nanocarriers, nanovaccines, and nanobacteria as nanobiotechnological concerns in modern vaccines.** Scientia Iranica, v. 20, n. 3, p. 1003-1013, 2013.

GONG, R. & CHEN, G. **Preparation and application of functionalized nano drug carriers.** Saudi Pharmaceutical Journal, v. 24, n. 3, p. 254-257, 2016.

HARISA, G. I. & ALANAZI, F. K. **Low density lipoprotein bionanoparticles: From cholesterol transport to delivery of anti-cancer drugs.** Saudi Pharmaceutical Journal, v. 22, n. 6, p. 504-515, 2014.

ISLAN, G. A. et al. **Nanopharmaceuticals as a solution to neglected diseases: Is it possible?.** Acta Tropica, 2017.

JORGE, S. G. **Hepatites**, 2011. Disponível em:
<<http://www.hepcentro.com.br/hepatites.htm>>. Acesso em: 20 de jun. 2016.

KAMARAJ, N. et al. **Fabrication, characterization, in vitro drug release and glucose uptake activity of 14-deoxy, 11, 12-didehydroandrographolide loaded polycaprolactone nanoparticles.** Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017.

KARNSAKUL, W., & SCHWARZ, K. B. **Hepatitis B and C.** Pediatric Clinics of North America, v. 64, n. 3, p. 641-658, 2017.

LEE, W. M. et al. **AASLD position paper: the management of acute liver failure: update 2011.** AASLD September, 2011.

LUCENA, P. D. A. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo itraconazol**. 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiás. 2014.

MACHADO, A. R. **Avaliação biológica da spirulina em tamanho micro e nanométrico e estudo da sua encapsulação em lipossomas**. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Rio Grande-FURG, Rio Grande do Sul. 2012.

MORA-HUERTAS, C. E. et al. **Polymer-based nanocapsules for drug delivery**. *International journal of pharmaceutics*, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application proliferation and cytotoxicity assays**. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p.55–63. 1983.

NAVEAU, S. et al. **A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis**. *Hepatology*, v. 39, n. 5, p. 1390-1397, 2004.

ROCHA, S. W. S. et al. **Effect of diethylcarbamazine on chronic hepatic inflammation induced by alcohol in C57BL/6 mice**. *European journal of pharmacology*, v. 689, n. 1, p. 194-203, 2012.

ROCKEY, D. C. **Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease**. *Clinics in liver disease*, v. 12, n. 4, p. 939-962, 2008.

RODRIGUES, G. B. et al. **Diethylcarbamazine: Possible therapeutic alternative in the treatment of alcoholic liver disease in C57BL/6 mice**. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 42, n. 4, p. 369-379, 2015.

ROLIM, L. A. **Obtenção tecnológica de forma farmacêutica associação em dose fixa para o tratamento da filariose linfática e estudo de estabilidade forçada dos fármacos**. *Tese* (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2012.

RUTHERFORD, A. E. **Causes of Hepatitis**, 2016. Disponível em: <<https://www.merckmanuals.com/professional/hepatic-and-biliary-disorders/hepatitis/causes-of-hepatitis>>. Acesso em: 16 de mai. 2017.

SANTIAGO-STEVENSON, D. et al. **Treatment of Filariasis bancrofti with 1-diethylcarbamy-4-methylpiperazine hydrochloride (Hetrazan)**. Journal of the American Medical Association, v. 135, n. 11, p. 708-712, 1947.

SALTÃO, R. & VEIGA, F. **Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 37, n. 1, 2001.

SARTAKHTI, J. S. et al. **Hepatitis disease diagnosis using a novel hybrid method based on support vector machine and simulated annealing (SVM-SA)**. Computer methods and programs in biomedicine, v. 108, n. 2, p. 570-579, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos**. Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737, 2003.

SEKI, E. & SCHWABE, R. F. **Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways**. Hepatology, v. 61, n. 3, p. 1066-1079, 2015.

SHERLOCK, S., & DOOLEY, J. **Diseases of the liver and biliary system**. Milão: Blackwell Science, 2002. 706 p. 11ª ed.

SILVA, P.; **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1352 p. 8ª ed.

ZORZI, G. K. et al. **On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 25, n. 4, p. 426-436, 2015.

ANEXO – ARTIGO PUBLICADO

International Immunopharmacology 50 (2017) 330–337



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp

Characterization and evaluation of nanoencapsulated diethylcarbamazine in model of acute hepatic inflammation



Gabriel Barros Rodrigues^{a,b}, Elquio Eleamen Oliveira^c,
Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior^c, Laise Aline Martins dos Santos^a,
Wilma Helena de Oliveira^{a,b}, Maria Eduarda Rocha de França^{a,b}, Deniele Bezerra Lós^{a,d},
Brenda Martins Gabínio^c, Fábica Cristiane Melo Leite de Lira^c, Christina Alves Peixoto^{a,*}

^a Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, Brazil

^c Laboratório de Síntese e Verificação de Moléculas (LSVM), Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Brazil

^d Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/RENORBIO, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, Brazil

* Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Diethylcarbamazine
Nanoencapsulation
Liver
Inflammation
Carbon tetrachloride

ABSTRACT

Previous studies from our laboratory have demonstrated that Diethylcarbamazine (DEC) is a potent anti-inflammatory drug. The aim of the present study was to characterize the nanoencapsulation of DEC and to evaluate its effectiveness in a model of inflammation for the first time. C57BL/6 mice were divided into six groups: 1) Control; 2) Carbon tetrachloride (CCl₄); 3) DEC 25 mg/kg + CCl₄; 4) DEC 50 mg/kg + CCl₄; 5) DEC-NANO 05 mg/kg + CCl₄ and 6) DEC-NANO 12.5 mg/kg + CCl₄. Liver fragments were stained with hematoxylin-eosin, and processed for Western blot, ELISA and immunohistochemistry. Serum was also collected for biochemical measurements. Carbon tetrachloride induced hepatic injury, observed through increased inflammatory markers (TNF- α , IL-1 β , PGE₂, COX-2 and iNOS), changes in liver morphology, and increased serum levels of total cholesterol, triglycerides, TGO and TGP, LDL, as well as reduced HDL levels. Nanoparticles containing DEC were characterized by diameter, polydispersity index and zeta potential. Treatment with 12.5 nanoencapsulated DEC exhibited a superior anti-inflammatory action to the DEC traditional dose (50 mg/kg) used in murine assays, restoring liver morphology, improving serological parameters and reducing the expression of inflammatory markers. The present formulation of nanoencapsulated DEC is therefore a potential therapeutic tool for the treatment of inflammatory hepatic disorders, permitting the use of smaller doses and reducing treatment time, while maintaining high efficacy.

1. Introduction

Acute hepatitis can occur without symptoms and may lead to high blood bilirubin levels (jaundice), a decreased sensation of appetite, and fatigue. About 90% of patients with acute hepatitis recover spontaneously. However, depending on the type and duration of the stimulus, the disease may progress to a serious condition, such as acute liver failure (ALF). ALF is characterized by acute inflammation with severe liver cell injury, where a previously normal liver fails within days or weeks. With a high mortality rate (40–50%), drug-induced injury is responsible for half the cases of ALF [1,2].

The hepatotoxin carbon tetrachloride (CCl₄) is widely used in models of liver inflammation. CCl₄ causes fatty liver, acute necrosis and

oxidative stress. Studies have demonstrated that single doses of CCl₄ cause areas of necrosis and the generation of reactive radicals in 2 h following administration [3,4].

Diethylcarbamazine (DEC) is a piperazine derivative which, as a result of its microfilaricide action, has been used in the treatment and control of lymphatic filariasis since 1947. DEC also has anti-inflammatory properties due to its interference with arachidonic acid metabolism. Studies demonstrate the inhibition of enzymes of the 5-lipoxygenase pathway and cyclooxygenase, resulting in a reduction in prostaglandin E₂ (PGE₂) production [5].

In a previous study, we characterized the anti-inflammatory action of DEC in a liver model of chronic inflammation induced by alcohol. The results demonstrated that treatment with 50 mg/kg of DEC for

* Corresponding author at: Instituto Aggeu Magalhães, Av Moraes Rego s/n Campus da UFPE FIOCRUZ, Recife CEP 52171-011, Brazil.
E-mail address: cpeixoto@pq.fiocruz.br (C.A. Peixoto).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.014>

Received 12 May 2017; Received in revised form 11 July 2017; Accepted 13 July 2017
1567-5769/ Published by Elsevier B.V.