



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



**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DE NANOCÁPSULAS
COM NÚCLEO LIPÍDICO (LNC) CARREGADAS COM METOTREXATO**

AGUYDA RAYANY CAVALCANTE BARBOSA

**MANAUS
2021**



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



**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DE NANOCÁPSULAS
COM NÚCLEO LIPÍDICO (LNC) CARREGADAS COM METOTREXATO**

AGUYDA RAYANY CAVALCANTE BARBOSA

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientador: Prof.º Dr. Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Coorientador: Prof.º Dr. Pritesh Jaychand Lalwani**

**MANAUS
2021**

Ficha Catalográfica

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

B238a Barbosa, Aguyda Rayany Cavalcante
Avaliação das Propriedades Anti-inflamatórias de Nanocápsulas com Núcleo Lipídico (LNC) Carregadas com Metotrexato / Aguyda Rayany Cavalcante Barbosa . 2021
95 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Coorientador: Pritesh Jaychand Lalwani
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Metotrexato. 2. Nanocapsula de Núcleo Lipídico. 3. Apoptose.
4. Artrite. I. Lopes, Antonio Luiz Ribeiro Boechat. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGUYDA RAYANY CAVALCANTE BARBOSA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DE NANOCÁPSULAS
COM NÚCLEO LIPÍDICO (LNC) CARREGADAS COM METOTREXATO**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Imunologia Básica e Aplicada.

BANCA EXAMINADORA

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

**Dr. Jesus Rafael Rodríguez Amado
Universidad de Oriente - UO**

**Dr. Guilherme Peixoto Tinoco Arêas
Universidade Federal do Amazonas - UFAM**

**Dr. Marco Aurelio Sartim
Universidade Federal do Amazonas - UFAM**

**Dra. Roberta Lins Gonçalves
Universidade Federal do Amazonas - UFAM**

Dedicatória

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, que me deu saúde e força para chegar até aqui. Aos meus pais, **Ruy Silva Barbosa** e **Antonia Maria Cavalcante**, por todo apoio, incentivo e amor incondicional e aos meus irmãos, **Aghatta**, **Aquyla** e **Ruy Júnior**, por toda ajuda e companheirismo. Obrigada por serem meu alicerce.

Agradecimento

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

Aos meus pais, **Ruy Silva Barbosa e Antonia Maria Cavalcante**, por todo amor, carinho e dedicação, eles são meus maiores incentivadores, sempre me apoiaram e me encorajaram a nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, **Aghatta Rayandra, Aquyla Antonia e Ruy Júnior**, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e me incentivando, eles foram essenciais na conclusão de mais essa fase.

Ao meu orientador, Professor Dr. **Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes**, pelo conhecimento transmitido ao longo desses anos (mestrado e doutorado), por toda paciência e confiança.

Ao meu coorientador, Professor Dr. **Pritesh Jaychand Lalwani**, que sempre me incentivou a buscar conhecimento e por todo apoio nos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada - **PPGIBA**, aos **mestres, funcionários e coordenadores** que foram essenciais durante essa jornada.

Aos professores, **Oscar Costa, Emerson Silva, Marne Vasconcellos, Carlos Sorgi e Felipe Naveca**, que cederam seus laboratórios para a realização de experimentos, além de terem sido grandes mestres na minha formação, transmitindo conhecimento das diversas técnicas utilizadas.

Aos alunos, **Marcia de Jesus, Leilane Bentes, Yury Chaves e Valdinete**, que nos auxiliaram em técnicas utilizadas no desenvolvimento do projeto.

À plataforma de citometria de fluxo – **ILMD (FIOCRUZ)**

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane – **ILMD (FIOCRUZ)** Manaus/AM, que nos disponibilizaram diversos equipamentos.

Ao Centro de Apoio Multidisciplinar – **CAM-UFAM** que cederam sua estrutura e nos deram total acesso aos equipamentos.

À Universidade Federal do Amazonas – **UFAM** que investiu nos alunos e cedeu sua estrutura para o desenvolvimento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **CAPES**, que me concedeu bolsa durante esses anos de estudo.

À minha amiga **Rafaella Oliveira dos Santos**, nos conhecemos na seleção do mestrado, fizemos a mesma seleção do doutorado e desde o começo nos tornamos irmãs, são anos de companheirismo, cuidado e apoio. Obrigada por sempre estar comigo e tornar essa caminhada menos difícil.

Às amigas, **Siuhelen Rocha** e **Grasiele Camacho**, que estão comigo desde minha chegada em Manaus (2010). Elas se tornaram meu maior apoio longe da minha família, sempre me dedicando amor e companheirismo.

Aos **amigos do IDI**, em especial **Adriane Batalha**, que se tornaram minha família durante esses anos, com eles chorei, sorri, brinquei, briguei, tive total apoio e motivação para concluir mais essa etapa.

A todos meus **amigos e amigas** que de alguma forma me proporcionaram momentos alegres e leves durante essa jornada, sempre com palavras de conforto.

Por fim, a todos que fazem ou fizeram parte da minha vida durante o doutorado, o conjunto de todas essas pessoas e de toda essa vivência me fortaleceu, me ensinou e me tornou o que sou hoje.

RESUMO

O Metotrexato é uma droga antirreumática modificadora do curso da doença, sendo o primeiro medicamento antirreumático para maioria dos pacientes com artrite reumatoide (AR), porém alguns pacientes não respondem ao tratamento com MTX. Os macrófagos, são células imunes que exercem papel central na resposta inflamatória da AR, porém estas células são resistentes a apoptose. A nanocápsulas de Núcleo Lipídicos (LNC), é um novo sistema de nanoformulado que apresentam maior estabilidade nos fluidos corporais e são avidamente fagocitados por macrófagos. As LNC carregadas com MTX (MTX-LNC), foram utilizadas para avaliar o seu potencial pro-apoptótico e imunomodulador das em modelos biológicos de artrite (*in vivo*) e macrófagos (*in vitro*). Ratos Lewis foram induzidos a artrite por injeção intradérmica de adjuvante completo de Freund, os resultados demonstraram que o grupo MTX-LNC demonstrou melhores resultados quando comparado com MTX, tanto na redução do volume da pata, quanto na avaliação dos componentes articulares: espaço articular ($0,088 \pm 0,012$, $0,05 \pm 0,002$; $p=0,3291$), membrana sinovial ($22,61 \pm 2,291$, $29,35 \pm 0,9004$; $p=0,0211$), cartilagem (articular: $0,04 \pm 0,0063$, $0,053 \pm 0,0037$; $p=0,0031$, calcificada: $0,035 \pm 0,0058$, $0,054 \pm 0,005$; $p=0,0436$) e condrócitos (articular: $614,3 \pm 225,0$, $1089 \pm 87,72$; $p=0,0081$, calcificada: $495,3 \pm 180,6$, $954,5 \pm 76,16$; $p=0,0041$). As formulações também foram testadas em macrófagos humanos (THP-1) e murinho (J774) (*in vitro*) e a IC50% calculada, THP-1: MTX 17.365nM e MTX-LNC 194,2nM 48 horas e J774: MTX 17.188nM ($r^2=0,47$) e MTX-LNC 175,2nM ($r^2=0,98$) em 24 horas. O MTX-LNC induz mais iROS e uma membrana com potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mais baixo para ambas as células em comparação com o MTX ($P < 0,0001$). Quando avaliado o índice de dano ao DNA pelo ensaio cometa, ambas as formulações (MTX/MTX-LNC) apresentaram aumento significativo. MTX-LNC induz mais ativação de caspase-8 ($p = 0,002$), 3 ($p < 0,0001$) e Anexina V + ($p < 0,0001$) do que MTX. A análise da expressão gênica relacionada à apoptose, mostrou que o MTX-LNC regula positivamente o gene TNFRSF25 (84,29) comparado a formulação de MTX, genes da via extrínseca (FASLG, TRADD, CRADD) e genes pró-apoptóticos (BAD, BCL2L10) são também regulados positivamente, sugerindo ativação da via de apoptose extrínseca. A nova formulação MTX-LNC mostra-se promissora e mais eficiente que MTX tradicional, tanto em testes *in vivo*, como modificadora do curso de doença em modelo experimental, quanto em teste *in vitro*, melhorando os efeitos apoptóticos desta droga em macrófagos THP1 e J774, ao melhorar a ativação de caspases efetoras de apoptose, aumentando o dano ao DNA e regulando positivamente genes pró-apoptóticos de via extrínseca.

Palavras-Chave: Metotrexato, Nanocapsula de Núcleo Lipídico, Apoptose, Artrite

ABSTRACT

Methotrexate is an anti-rheumatic drug that modifies the course of the disease, being the first anti-rheumatic drug for most patients with rheumatoid arthritis (RA), however some patients do not respond to treatment with MTX, these patients have low expression of CD39 in regulatory T cells. Macrophages are immune cells that play a central role in the inflammatory response of RA, but these cells are resistant to apoptosis. The Lipid Nucleus (LNC) nanocapsules, is a new model of nanocapsules created by a research group from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, these nanocapsules have greater stability in the body fluid and are easily phagocytosed by macrophages. LNCs loaded with MTX (MTX-LNC), were used to evaluate the apoptotic and immunomodulatory potential of MTX-LNC in biological models of arthritis (in vivo) and macrophages (in vitro). Lewis rats were induced to arthritis by intradermal injection of Freund's complete adjuvant, the results showed that the MTX-LNC group showed better results when compared with MTX, both in reducing the volume of the paw and in the evaluation of the joint components: joint space (0.088 ± 0.012 , 0.05 ± 0.002 ; $p=0.3291$), synovial membrane (22.61 ± 2.291 , 29.35 ± 0.9004 ; $p=0.0211$), cartilage (joint: 0.04 ± 0.0063 , 0.053 ± 0.0037 ; $p=0.0031$, calcified: 0.035 ± 0.0058 , 0.054 ± 0.005 ; $p=0.0436$) and chondrocytes (articular: 614.3 ± 225.0 , 1089 ± 87.72 ; $p=0.0081$, calcified: 495.3 ± 180.6 , 954.5 ± 76.16 ; $p=0.0041$). The formulations were also tested on human (THP-1) and mouse (J774) macrophages (in vitro) and the calculated IC50%, THP-1: MTX 17.365nM and MTX-LNC 194.2nM 48 hours and J774: MTX 17.188nM ($r^2=0.47$) and 175.2nM MTX-LNC ($r^2=0.98$) in 24 hours. MTX-LNC induces more iROS and membrane with lower mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) for both cells compared to MTX ($P<0.0001$). When assessing the DNA damage index by the comet assay, both formulations (MTX / MTX-LNC) showed a significant increase. MTX-LNC induces more activation of caspase-8 ($p = 0.002$), 3 ($p < 0.0001$) and Annexin V + ($p<0.0001$) than MTX. The analysis of gene expression related to apoptosis, showed that MTX-LNC positively regulates the TNFRSF25 gene (84,29) purchased the MTX formulation, extrinsic pathway genes (FASLG, TRADD, CRADD) and pro-apoptotic genes (BAD, BCL2L10) are also positively regulated, suggesting activation of the extrinsic apoptosis pathway. The new MTX-LNC formulation is promising and more efficient than traditional MTX, both in vivo tests as a modifier of the disease course in an experimental model, and *in vitro* tests, improving the apoptotic effects of this drug in THP1 and J774 macrophages by improving the activation of apoptosis effector caspases increasing DNA damage and upregulating pro-apoptotic genes via extrinsic pathway.

Key words: Methotrexate, Lipid Nucleus Nanocapsule, Apoptosis, Arthritis

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas de Liberação Controlada de Drogas	20
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de publicações envolvendo Nanomedicina.	19
Figura 2. Estruturas das nanopartículas poliméricas.....	21
Figura 3. Ilustração da organização das Nanocápsulas de Núcleo Lipídicas (LNC).....	23
Figura 4. Efeito da iontoforese e Nanopartículas de Ind.....	27
Figura 5. Penetração de LNC carregada com VitK1 em pele suína de fêmea).29	

LISTA DE SIGLAS

ADAMT	Desintegrina e Metaloproteinase com motivos de trombospondina
ADO	Adenosina
Akt	Proteína quinase B
AR	Artrite Reumatoide
BZ3	Benzofenona-3
BZ3-LNC	Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregadas com Benzofenona-3
CTLA4	Proteína 4 associada a linfócito T citotóxicos
DHFR	Diidrofolato Redutase
DIC	Diclofenaco
DAMCD	Drogas Antirreumáticas Modificadoras do Curso da Doença
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOXO	Doxorrubicina
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FCA	Adjuvante Completo de Freund
HLA	Antígeno leucocitário humano
Ind	Indometacina
Ind-LNC	Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregadas com Indometacina
IndOET	Éster etílico de Indometacina
IL	Interleucina
IL-6R	Receptor de Interleucina-6
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
LNC	Nanocápsulas de Núcleo Lipídico
MCP-1	Proteína Quimiotáxica de Monócito
MDA	Malondialdeído
MEL	Melatonina
MEL-LNC	Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregadas com Melatonina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófagos
MMP	Metaloproteinase de matriz
MTX	Metotrexato
MTX-LNC	Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregadas com Metotrexato
MXO	Metoxicinamato de octila
NP	Nanocápsula polimérica
PADI4	Peptidil arginina desiminase tipo 4
PCL	Poli(ε)copolactano
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PTPN22	Proteína tirosina fosfatase, não receptor tipo 22
RANTES	Quimiotáticos para timócitos
RNA	Ácido Ribonucleico
RVT	Resveratrol
RVT-LNC	Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregadas com Resveratrol
SOD	Superóxido dismutase
STAT4	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 4
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAF-1	Fator-1 associado ao receptor de TNF
UV	Radiação Ultravioleta
VitK1	Vitamina K1
VitK1-LNC	Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregadas com Vitamina K1

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Sistema de Liberação Controlada (“Drug Delivery Systems”)	18
2.2 Nanopartículas Poliméricas.....	21
2.2.1 Nanoesferas.....	22
2.2.2 Nanocápsulas	22
2.3 Nanocápsulas de Núcleo Lipídico (LNC).....	22
2.4 Testes utilizando drogas nanoencapsuladas em LNC	24
2.5 Mercado	26
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO 2	37
Nanocápsulas de Núcleo Lipídico Carregadas com Metotrexato Previnem a Perda de Espaço Articular em Artrite Experimental.....	38
CAPÍTULO 3	62
Macrophages Apoptosis induced by Methotrexate Loaded Lipid-Core Nanocapsules.....	63
CONCLUSÃO	91
ANEXOS	92

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A Atrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por inflamação sistêmica e crônica, afeta principalmente as membranas sinoviais levando a danos irreversíveis as articulações, além de comprometer outros sistemas, cardiovascular, hematológico e pulmonar (ENGLAND et al., 2018; LIAO, 2017; NIKIPHOROU et al., 2020; SPAGNOLO et al., 2018; TSENG et al., 2020). A inflamação apresenta-se como hiperplasia sinovial agressiva, acarretando dor musculoesquelética, rigidez articular, perda de amplitude e deformidades nas articulações, o que prejudica a qualidade de vida dos pacientes. (FANG; ZHOU; NANDAKUMAR, 2020a; OSTROWSKA et al., 2018).

A prevalência da AR é de até 1,3% da população mundial, afeta todas as raças e manifestando-se três vezes mais em mulheres, aumenta com a idade, mas apresenta incidência maior aos 45 anos. Atualmente o tratamento visa a remissão da doença ou, ao menos, uma baixa atividade da mesma num período de 6 meses, buscando assim prevenir os danos causados nas articulações, que com o tempo (até 10 anos de doença) leva a incapacidade de trabalho de 40% dos pacientes, tornando a doença uma patologia de grande impacto socioeconômico, pois afeta adultos em fase produtiva (FERNANDES et al., 2011; LIN; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020; SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

A AR é uma doença de etiologia multifatorial, desencadeada por uma interação complexa de fatores genéticos e ambientais, entre os fatores de risco genético mais frequente, estão um conjunto de alelos dentro do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), que codificam a proteína Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), denominado “epítomos compartilhado”, onde a frequência encontra-se na região HLA-DR, outros genes também estão associados, Proteína tirosina fosfatase, não receptor tipo 22 (PTPN22), Receptor de interleucina-6 (IL-6R), Fator-1 associado ao receptor de TNF (TRAF-1), Transdutor de sinal e ativador da transcrição 4 (STAT4), Peptidil arginina desiminase tipo 4 (PADI4), Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA4), entre outros, fatores epigenéticos (modificações pós-traducional de proteínas) também podem causar o desenvolvimento da doença. Entre os fatores ambientais estão, obesidade, infecção periodontal, hormônios sexuais,

tabagismo, poeira ocupacional (sílica), microbiota e outros (DEANE et al., 2017; FANG; ZHOU; NANDAKUMAR, 2020b).

A fisiopatologia da AR apresenta-se como inflamação da cápsula articular (sinovite), o que afeta os tecidos locais, causando perda funcional dos mesmos, a resposta inflamatória nas articulações, inicia-se por uma interação complexa entre diferentes tipos de células imunes (células T e B, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos) e não imunes, (fibroblastos, condrócitos), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α), quimiocinas (CXC, CCL20), enzimas de lise da matriz (MMPs, ADAMTS) e autoanticorpos (FR, Anti-CCP), potencializando os danos articulares e a erosão óssea (FANG; ZHOU; NANDAKUMAR, 2020a; JANAKIRAMAN et al., 2018; LIN; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020).

Os macrófagos são células centrais na evolução da AR, o infiltrado de macrófagos sinoviais está diretamente ligado a progressão radiológica (destruição articular), pois essas células têm papel multifacetados na patogênese, estimulando a neovascularização, proliferação de fibroblastos, secreção de proteases, produção de citocinas, eliminação de células apoptóticas, além de atuarem como apresentadoras de antígenos, potencializando a resposta de linfócitos T. Por isso, elas podem ser utilizadas como biomarcadores da gravidade da doença, ou até mesmo, como alvos na terapia com drogas antirreumáticas modificadoras do curso da doença (DAMCD) (ALIVERNINI et al., 2018; FANG; ZHOU; NANDAKUMAR, 2020b; GUO et al., 2018; SIOUTI; ANDREAKOS, 2019).

Atualmente há uma grande variedade de opções terapêuticas, as DAMCD são a primeira linha de medicamentos utilizados, essa classe visa reverter ou reduzir sinais e sintomas da doença, interferindo na fisiologia da doença, e assim melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Dentro dessa classe de medicamentos, o Metotrexato (MTX) é o DAMCD sintética de primeira escolha, podendo ser usado como monoterapia ou conjugado com outros agentes sintéticos ou biológicos (HAZLEWOOD et al., 2016; ROMÃO; CANHÃO; FONSECA, 2013; TANAKA, 2019).

O MTX é um antimetabólica de baixo custo, que tem como mecanismo de ação a inibição da dihidrofolato redutase (DHFR), reduzindo a síntese de purinas

e pirimidinas e conseqüentemente a produção de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), proteínas, causando interferência na resposta imune primária e secundária, o que lhe concede atividade imunossupressora, impedindo o crescimento do tecido proliferativo, além de aumentar a liberação de adenosina (ADO), que age nos receptores de neutrófilos e macrófagos, estimulando a produção de moléculas anti-inflamatórias (FRIEDMAN; CRONSTEIN, 2019; JEKIC; MAKSIMOVIC; DAMNJANOVIC, 2019; LUCAS; DIMMITT; MARTIN, 2019). Apesar da alta eficácia do MTX, há uma taxa de pacientes que não respondem, enquanto outra, precisa descontinuar o tratamento devido a toxicidade do medicamento, na literatura, efeitos colaterais pelo uso prologado já são descritos, entre eles estão, danos hepáticos, renais, gastrointestinais, hematológicos, pulmonares, dermatológico e mielossupressão (BECHARD et al., 2014; HOWARD et al., 2016; LOPEZ-OLIVO et al., 2014).

O campo da Reumatologia busca avanços tecnológicos que posam melhora a ação das drogas já utilizadas no tratamento da AR, buscando aperfeiçoamento na entrega, maior eficácia terapêutica, doses baixas e redução dos efeitos colaterais. Sistemas carreadores passaram a ser testados, lipossomas marcadas com tecnécio testadas em camundongos (administração endovenosa) acumulam-se seletivamente nos tecidos sinoviais inflamados (pannus) por direcionamento passivo, ampliando assim o interesse por sistemas avançados de entrega de medicamentos para o tratamento da AR (BADER, 2012b; GORANTLA et al., 2020; HAN; CHEN; CHEN, 2020).

Nanopartículas mostraram-se promissoras no tratamento da AR, apresentando eficácia, segurança, perfil farmacológico parra carregar drogas terapêuticas e direcionamento específico para as articulas inflamadas. Um novo modelo de nanopartículas, Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), composto por núcleo formado por monoestearato de sorbitano, triglicerídeos de cadeia média, envolto por poli(ϵ)caprolactona (PCL) e estabilizado por polissorbato 80, vem se mostrando um próspero carreador, além de controlar a cinética de liberação da droga, dependendo das concentrações do polímero ou da consistência do núcleo (GORANTLA et al., 2020; POLETTO et al., 2012a).

LNC vem sendo utilizada como veículo para uma ampla variedade de drogas, demonstrando resultados satisfatório nos estudos, a formulação foi capaz

de potencializar o efeito de diversas drogas com doses reduzidas, concentrar o fármaco no local inflamado, facilitar a internalização celular, reduziu efeitos colaterais e retardam a ligação de proteínas plasmáticas, aumentando assim o tempo na circulação (BERNARDI et al., 2009a, 2013; BOECHAT et al., 2015a; DREWES et al., 2016a; FIEL et al., 2014a; POLETTO et al., 2012a; YURGEL et al., 2014a).

Justificando, o estudo buscar a utilização de LNC carregadas com MTX (MTX-LNC) para o tratamento da AR, visando concentrar a droga no espaço inflamado, objetivando os macrófagos sinoviais, na busca por melhores resultados, menos efeitos colaterais, baixa dose e menos custos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

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

Nas últimas décadas, vem se buscando formas mais eficazes para administração de fármacos no tratamento de diversas doenças, o que acabou levando ao surgimento dos Sistemas de Liberação Controlada. Esses sistemas têm como objetivo central liberar agentes terapêuticos no local anatômico desejado e manter a concentração do fármaco dentro de uma faixa terapêutica por tempo prolongado, oferecendo muitas vantagens quando comparada as formas clássicas de administração de medicamentos (DASH et al., 2010; LIECHTY et al., 2010; RISBUD et al., 2000).

Em meados da década de 1970, o conceito de polímero-fármaco conjugados surgiu em vários lugares do mundo, e três características foram primordiais para o sucesso desse sistema no final dos anos 80 até os dias atuais. Primeiro, a conjugação de poli (etilenoglicol) ou PEG ao fármaco (PEGilação), aumentou a estabilidade e o tempo do sistema na circulação, segundo “direcionamento passivo”, efeito de permeabilidade e retenção, e por fim, “direcionamento ativo”, que são as interações através das ligações com anticorpos, receptores de membrana celular e outros (HOFFMAN, 2008; KOTSUCHIBASHI; NAKAGAWA; EBARA, 2016).

Já em 1986, Matsumura e Maeda demonstraram aumento das propriedades antitumorais de copolímeros de ácido estriótico e maleico conjugado com proteína antitumoral, o polímero aumentou a meia-vida do fármaco e o acúmulo do medicamento no tecido doente, esses dados os colocou entre os primeiros a apresentarem os efeitos de permeabilidade e retenção desses sistemas.

Em seguida, houve um grande aumento nas pesquisas relacionadas a entrega de medicamento (Figura 1), as publicações que nos anos 80 se limitavam a dez artigos por ano, aumentou mais de 120X em 2004, levando também a um maior número de patentes no início da década (WAGNER et al., 2006).

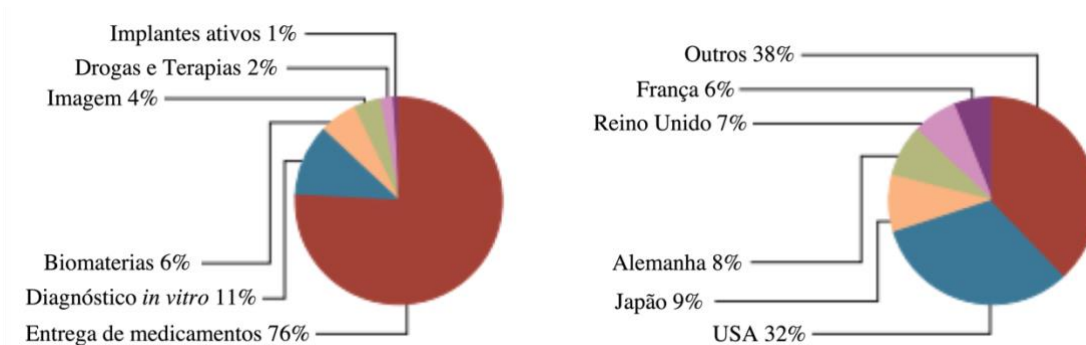


Figura 1. Distribuição de publicações envolvendo Nanomedicina.

Período de 1984 a 2004, o primeiro gráfico de setores mostra as áreas mais exploradas, enquanto o segundo, os países que mais investiram nessas pesquisas (WAGNER et al., 2006).

Esses sistemas, também chamados Sistemas de liberação de drogas e/ou Sistemas carreadores nanoparticulados, variam de acordo com o diâmetro podendo medir de 10 a 1000nm, entretanto a maioria se apresenta entre a faixa de 20 a 300nm. Seu tamanho em escala nanométrica, auxilia na redução da captura pelo sistema reticulo-endotelial, facilitando o direcionamento para o tecido lesionado e assim, fornecendo doses eficazes da droga para o local de interesse (JAIN, 2008; SIMS; FRIEBOES; STEINBACH-RANKINS, 2018; YOU et al., 2010).

A inserção desse sistema para entrega controlada de drogas resultou em diversas vantagens, sendo as principais: maior estabilidade, melhora na biodisponibilidade, liberação controlada, maior tempo na circulação, distribuição seletiva entre os órgãos ou tecidos, redução da dose total necessária, levando a diminuição dos efeitos colaterais e toxicidade, todos esses benefícios contribuem para a melhoria dos resultados terapêuticos durante o tratamento (RIGON et al., 2015; YOU et al., 2010). Devido as suas vantagens, essa tecnologia tornou-se foco de estudo em diversas áreas, inclusive em pesquisas relacionadas a tratamento para doenças como, câncer e doenças autoimunes (BADER, 2012a).

Com foco nas vantagens dessa nova tecnologia, diversos sistemas de distribuição de drogas foram criados (Tabela 1), sendo estruturas compostas principalmente de lipídios e/ou polímeros (ALLEN; CULLIS, 2004).

Sistemas de Distribuição de Drogas

Sistema Carreador	Tamanho	Droga	Composto	Referência
Nanocápsula	10 a 1000nm	Diclofenaco (DIC), Ind, Doxorubicina (DOXO), clorexidina, artemisina	Núcleo oleoso ou aquoso rodeado por polímero	(FONSECA-SANTOS; GREMIÃO; CHORILLI, 2015; KOTHAMASU et al., 2012)
Nanoesfera	1 a 1000nm	Dexametasona, savoxepine, clonazepam, saquinavir, docetaxel, cloroquina	Matriz polimérica	(FONSECA-SANTOS; GREMIÃO; CHORILLI, 2015; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010)
Micelas	10 a 100nm	DOXO, vitamina K3, tamoxifeno, porfirina, camptotecina,	Copoliméros compostos de segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos	(MASAYUKI et al., 1990; ZHANG; HUANG; LI, 2014)
Lipossomas	50 a 450nm	Insulina, metformina, tetrodoxina, metotrexato (MTX), DOXO	Bicamadas fosfolipídicas com núcleo aquoso	(BOZZUTO; MOLINARI, 2015; KESHARWANI et al., 2018; LINSLEY; WU, 2017)
Hidrogéis	----	DOXO, MTX, paclitaxel, temozolomida, etoposide, tricostatina A	Rede polimérica hidrofílica reticulada inchadas em água.	(BASTIANCICH et al., 2016; KOETTING et al., 2015; ZHAO et al., 2015)
Nanoemulsões	20 a 300nm	Vitamina E, celecoxibe, quercetina, progesterona	Gotículas de emulsão de óleo-em água	(LI et al., 2011; PATEL et al., 2013; SHAKEEL et al., 2012)
Nanocristais	10 a 800nm	Ciclosporina A, quercetina, ibuprofeno, glibeclamida, mebendazol, Ind	Dispersão coloidal sub-micron de partículas de fármaco puro em água, estabilizado por surfactantes ou polímeros.	(DONG et al., 2015; GIGLIOBIANCO et al., 2018)
Dendrímeros	1 a 100nm	Ind, rifampicina, MTX, DOXO, lamivudina, fosfato de cloroquina, efavirenz	Moléculas poliméricas hiper ramificadas com arquitetura tridimensional geométrica	(GARCÍA-GALLEGO et al., 2017; KESHARWANI; JAIN; JAIN, 2014)
Niossomas	10 a 3000nm	MTX, DIC, DOXO, ácido ascórbico, curcumina, hidroxicloquina,	Vesículas compostas de surfactantes não-iônicos hidratados, antipáticos com carga global neutra	(BARTELDs et al., 2018; MOGHASSEMI; HADJIZADEH, 2014)
Nanotubos	20 a 1000nm e diâmetro 0,4 a 3nm	Propofol, azapropazona, dabigatran, misoprostol, leucotrieno, DIC	Folhas de grafeno enroladas em cilindro (metálico ou semiconductor)	(HE et al., 2013; KARIMI et al., 2015; LIU; YANG; HOPFINGER, 2009)

Tabela 1. Sistemas de Liberação Controlada de Drogas

2.2 Nanopartículas Poliméricas

Nanopartícula é um termo genérico que se refere a Nanocápsulas e Nanoesferas, sistemas constituídos de polímeros biodegradáveis que apresentam estruturas vesiculares e matriciais com tamanho entre 1 a 1.000nm (CRUZ et al., 2006; FONSECA-SANTOS; GREMIÃO; CHORILLI, 2015). Essa classe de nanocarreadores se diferem de acordo com sua composição, onde as Nanocápsulas são integradas por um núcleo oleoso circundado por uma parede polimérica, e as Nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica (Figura 2) (POHLMANN et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003b).

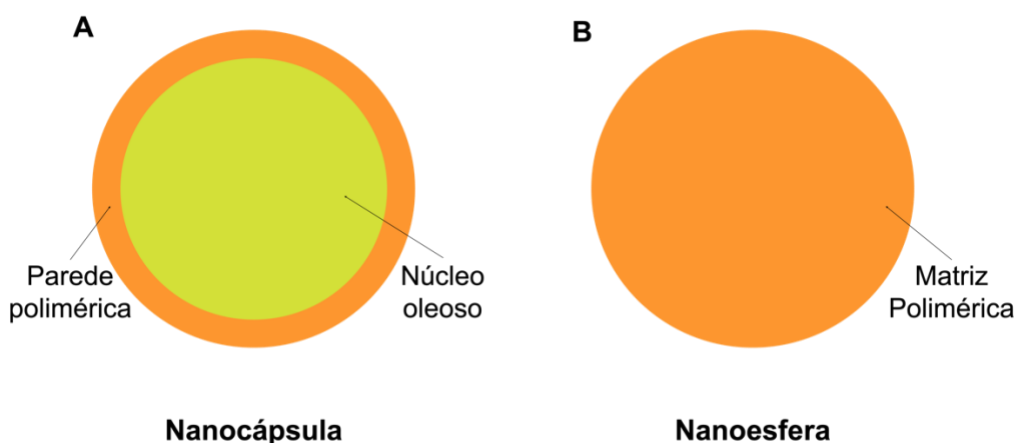


Figura 2. Estruturas das nanopartículas poliméricas.

A) Nanocápsula formada por um núcleo oleoso envolvido pelo polímero. **B)** Nanoesfera constituída por uma matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003a).

Estruturas poliméricas passaram a ser utilizadas na intenção de adequar a liberação do fármaco, com objetivo de manter a concentração da droga dentro do intervalo terapêutico desejado, minimizando dosagens inadequadas que podem acarretar em ineficácia do tratamento, toxicidade e/ou efeitos colaterais indesejados (YOU et al., 2010).

A utilização dessas estruturas como sistemas de liberação de drogas, apresentam vantagens, como: a) Direcionamento passivo ou ativo para tecidos alvos; b) Redução dos efeitos colaterais e aumento na eficácia do tratamento; c) Modulagem da degradação do polímero e liberação do fármaco, de acordo com a escolha dos constituintes da matriz; d) Estabilidade para diversas vias de administração: oral, nasal, parenteral e intra-ocular (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

2.2.1 Nanoesferas

As Nanoesferas podem fornecer entrega sustentada de diversos agentes terapêuticos (proteínas, peptídeos, DNA, entre outros), controlando e direcionando o agente para o local desejado. Além disso, sua matriz polimérica é capaz de proteger da degradação e aumentar a interação da partícula com a membrana celular, demonstrando segurança quanto a citotoxicidade (TAHARA et al., 2009).

2.2.2 Nanocápsulas

Já as Nanocápsulas apresentam vantagens quando comparadas as Nanoesferas, sua estrutura composta por um núcleo oleoso a habilita no transporte de drogas hidrofóbicas, alta eficiência de encapsulação devido à solubilidade otimizada do fármaco no núcleo, enquanto o revestimento polimérico protege o material encapsulado contra degradação fotoquímica, química e enzimática (KOMNINO et al., 2016; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Sendo um sistema com aplicação em diferentes áreas, tais como, agroquímica, tratamento de efluentes, engenharia genética, cosmético, produtos de limpeza e transporte de fármaco, enzimas, adesivos, catalisadores, polímeros, óleo, partículas de látex, entre outros (KOTHAMASU et al., 2012).

2.3 Nanocápsulas de Núcleo Lipídico (LNC)

As Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), são nanocápsulas poliméricas desenvolvidas por um grupo de pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (JÄGER et al., 2007). Este novo sistema é formada por um núcleo organogel composto por monoestearato de sorbitano e triglicerídeo cáprico/caprílico, envolvido por uma parede polimérica de poli(ϵ)coprolactano (PCL) e estabilizado por micelas de polissorbato 80 (Figura 3) (ANTONOW et al., 2017; FIEL et al., 2014; JÄGER et al., 2009; KOMNINO et al., 2016; POHLMANN et al., 2013).

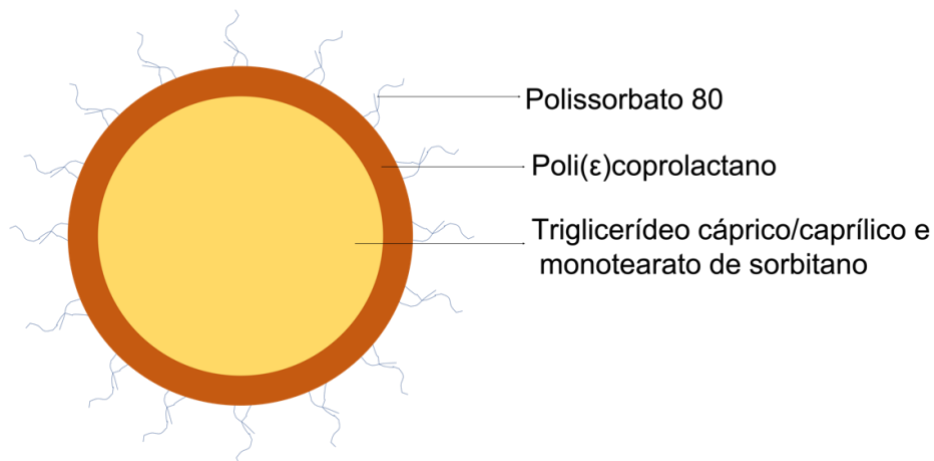


Figura 3. Ilustração da organização das Nanocápsulas de Núcleo Lipídicas (LNC) (VENTURINI et al., 2011).

O novo sistema LNC proporcionou vantagens frente as nanocápsulas poliméricas tradicionais: (1) a parede polimérica de PCL aumentou a meia-vida das fases de ruptura do fármaco porque o polissorbato 80 protela a ligação com as proteínas plasmática retardando a opsonização e prolongando o tempo das LNCs na circulação sanguínea; (2) o núcleo organogel tornou a estrutura mais rígida; (3) enquanto a presença de monoestearato de sorbitano amplia a capacidade de carga do fármaco em até 40 vezes (BERNARDI et al., 2009; CRUZ et al., 2006; KOMNINOU et al., 2016). Além disso, diferentes concentrações de monoestearato de sorbitano e triglicérides cáprico/caprílico modificam a viscosidade do núcleo alterando assim a liberação sustentada do fármaco. O aumento nas concentrações de monoestearato de sorbitano aumenta a resistência à difusão de um pró-fármaco (VENTURINI et al., 2011).

Komninou e colaboradores (2016) demonstraram a eficiência de LNC quanto aos seus efeitos antiapoptótico e antioxidante, em testes que compararam Nanocápsulas poliméricas (NP) e LNC carregadas com melatonina (MEL) na avaliação do desenvolvimento de embriões *in vitro*. O estudo sugeriu que características presentes nas LNCs, como disposição, composição química da superfície e o componente do núcleo, influenciaram na liberação e distribuição do fármaco, melhorando os resultados no grupo tratado com MEL-LNC. (BULCÃO, 2013) mostraram que as LNC não apresentam toxicidade aguda ou crônica em ratos.

2.4 Testes utilizando drogas nanoencapsuladas em LNC

A Nanomedicina vem ganhando ainda mais visibilidade com o surgimento de Sistemas nanoparticulados para entrega de droga. As LNC foram utilizadas em diversas aplicações para liberação controlada de fármacos sobretudo em modelos de neoplasias e doenças inflamatórias (MENEZES et al., 2017).

Bernardi e colaboradores (2008), utilizaram Indometacina (Ind) nanoencapsuladas com LNC (Ind-LNC) em testes com células de glioma (U138-MG e C6). Os resultados demonstraram a capacidade da Ind-LNC em reduzir a viabilidade celular e inibir a proliferação dessas células, além do mais, a Ind-LNC foi capaz de reduzir a proliferação celular (48 horas) após a curta exposição com as nanoformulações (1 a 3 horas). Quando testadas em células neuronais normais (fatias de hipocampo), a Ind-LNC não apresentou efeito citotóxico.

O mesmo foi observado em modelos de inflamação *in vivo*, onde Ind-LNC também mostrou-se eficaz na redução da inflamação em modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund (rato). O grupo tratado com Ind-LNC, apresentou redução na produção de citocinas pro-inflamatórias, tais como, Fator de necrose tumoral - α (TNF- α) e Interleucina-6 (IL-6) e aumento de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (BERNARDI et al., 2009c). De Oliveira e colaboradores (2019), também testaram os efeitos anti-inflamatório de Resveratrol (RVT) em LNCs (RVT-LNC) no modelo de Síndrome de desconforto respiratório agudo (camundongo). Os grupos tratando com RVT-LNC, apresentaram diferença significativa na redução de leucócitos totais, mediadores inflamatórios (IL-6, KC, MIP-2, MIP-1 α , MCP-1 e RANTES), infiltrado de neutrófilos no pulmão, inibição da hiperresponsividade das vias aéreas, estresse oxidativo (MDA, SOD), fosforilação de Akt e ERK e protegeu o pulmão de alterações patológicas causadas pelo LPS.

Outra vantagem do encapsulamento apresentados nos estudos, foi a proteção gastrointestinal, os danos causados por Ind livre não foram observados no grupo tratado com Ind-LNC (BERNARDI et al., 2009c). RVT-LNC, igualmente protegeu contra danos gastrointestinais após tratamento de 14 dias, além do mais, apresentou concentrações significativamente mais alta da droga, nos

órgãos analisados de ratos saudáveis (Cérebro, Fígado e Rim) (FROZZA et al., 2010).

Estudos focados na estabilidade das LNC no trato gastrointestinal foram realizados por Cattani e colaboradores (2010). Estes autores realizaram testes *in vivo* mostrando que o éster etílico de Indometacina (IndOEt) não foi liberado no lúmen quando nanoencapsulado. As LNC foram capazes de restringir a hidrólise do IndOEt, atuando como um sistema reservatório mucoadesivo para o pró-farmaco.

Considerando a estabilidade das LNC em fluidos corporais e a capacidade de concentrar-se em tecidos inflamados, foi observado que o polissorbato 80 adsorvido na superfície das LNC é capaz de promover adsorção de apolipoproteína B e E desencadeando sua endocitose. A concentração da droga no espaço intracelular chamou atenção para estudos focados em diversas doenças inflamatórias onde os macrófagos exercem papel importante como doenças autoimunes e câncer (DREWES et al., 2016b; POLETTO et al., 2012b).

A propriedade de internalização das LNC potencializam a citotoxicidade de drogas antineoplásicas, objetivando a redução da resistência pelo efluxo de fármacos antineoplásicos. Yurgel e colaboradores (2014) testaram o metotrexato (MTX) em duas linhagens de câncer de mama, os mecanismos de resistência ao MTX são diferentes nas células MCF-7 e MDA-MB-231. As células MCF-7 apresentam resistência ao MTX pela superexpressão da enzima diidrofolato redutase (DHFR), enquanto MDA-MB-231 foi resistente a MTX por falta de receptores de transporte mostrando que mesmo células resistentes ao MTX são sensíveis ao MTX nanoencapsulado (MTX-LNC). Porém, quando utilizado o MTX-LNC para tratamento, essas células tornam-se sensíveis a apoptose.

Os efeitos antioxidantes de MEL foram intensificados pelo uso de MEL-LNC em células pulmonares tratadas com paraquat. Testes de viabilidade com MTT e ensaio do cometa demonstraram que MEL-LNC e LNC não causaram danos as células A549, protegendo-as dos efeitos genotóxico, citotóxico e oxidativo do herbicida (CHARÃO et al., 2015).

Os efeitos potencializados de medicamentos nanoencapsulados em LNC também foram demonstrados em experimentos *in vivo* e *ex vivo* com LNC

carregadas com MTX. As propriedades anti-inflamatórias de MTX-LNC foi demonstrado em modelos de artrite crônica em ratos Lewis e células sinoviais de pacientes com Artrite Reumatoide (AR) ativa. A MTX-LNC foi capaz de controlar a inflamação em doses 75% menores que o fármaco livre, além de reduzir a produção de citocinas derivadas de células T mesmo em células resistentes ao MTX quando tratadas com PMA (BOECHAT et al., 2015b).

As nanocápsulas de núcleo lipídico se mostraram, portanto, bons sistemas de liberação controlada de fármaco com estabilidade para aplicações tópica, oral e sistêmica (BERNARDI et al., 2009b; CATTANI et al., 2010; CRUZ et al., 2006; FROZZA et al., 2010; MENEZES et al., 2017).

2.5 Mercado

Diferentes sistemas carreadores têm sido extensivamente estudados com o objetivo de controlar a liberação do fármaco e melhorar a eficácia e seletividade das formulações quanto a aplicação tópica, as nanopartículas poliméricas se mostraram eficientes ao modular a atividade da droga, prolongando e controlando a liberação do fármaco por aumento de adesividade na pele (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Teste com nimesulida demonstraram penetração do fármaco no estrato córneo quando conjugada com nanocarreadores (Nanocápsula e Nanoesfera), o que não houve com a nimesulida livre. Porém a formulação com nanocápsulas carregadas com nimesulida demonstrou maior penetração (epiderme e derme), quando comparada a Nanoesfera, Nanoemulsão e Nimesulida livre (ALVES et al., 2007). Lin e colaboradores (2010) comprovaram que sistemas nanoestruturados lipídicos são importantes transportadores para aplicação tópica, pois apresentam penetração aprimorada, irritação cutânea insignificante e compatibilidade de drogas com diferentes polaridades.

Tomoda e colaboradores (2011) estudaram nanocápsulas de Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) carregadas com cumarina e Ind para entrega de agentes terapêuticos através da penetração da pele de ratos (*in vitro*). Imagens de microscopia de varredura a laser confocal demonstrou penetração de

nanopartículas através do estrato córneo e da epiderme, enquanto as moléculas de Ind não permearam o estrato córneo (TOMODA et al., 2011).

Quando testados *in vivo* (ratos), foi demonstrado que a nanopartículas de PLGA carregados com cumarina-6, acumulou-se nos folículos e na epiderme, enquanto as carregadas com Ind, liberou a droga da partícula, assim, a permeabilidade de Ind, não é afetada pelo tamanho das nanopartículas (100 a 400nm). O estudo demonstrou que a permeabilidade de nanopartículas carregadas com drogas, aumenta quando aplicada com iontoforese (pele, musculo e plasma) (Figura 4) (TOMODA et al., 2012).

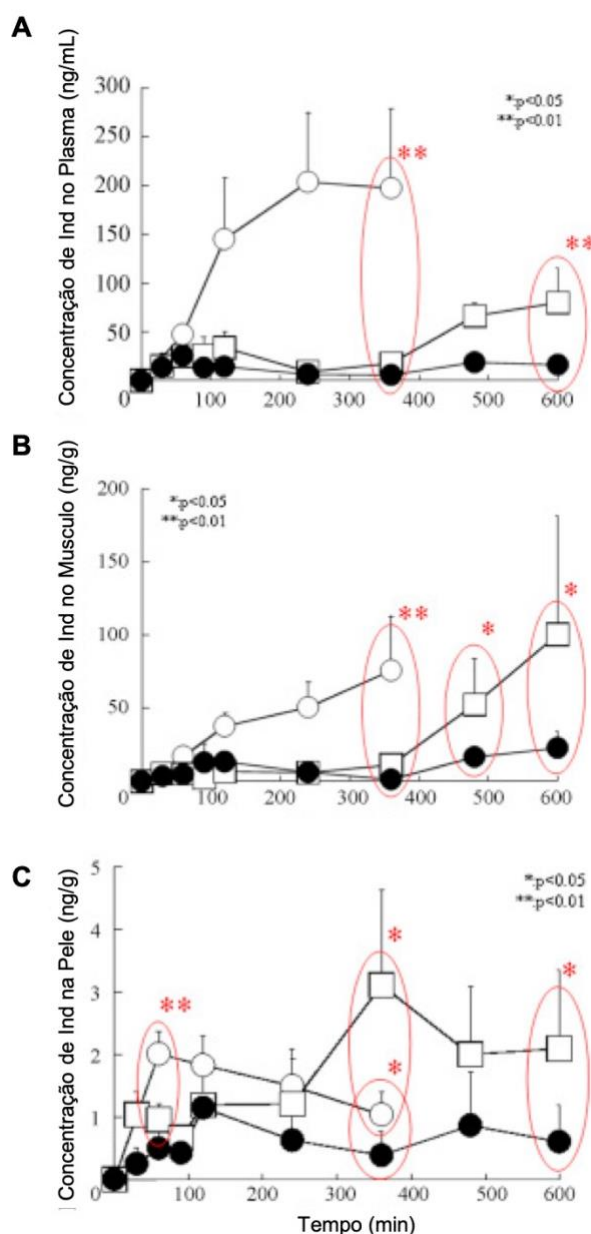


Figura 4. Efeito da iontoforese e Nanopartículas de Ind.

Concentrações de Ind na pele de ratos em minutos. **A)** no plasma, **B)** no musculo e **C)** na pele. (○: iontoforese na suspensão de nanopartículas de PLGA com Ind; □: Nanopartículas de PLGA com Ind e ●: Ind-livre) (TOMODA et al., 2012).

Em estudos focados na utilização de nanocápsulas na cosmetologia, especialmente bloqueadores UV, Jiménez e colaboradores (2004) utilizando nanocápsulas carregadas com Metoxicinamato de octila (MXO) em testes utilizando pele de porco (*in vitro*). Demonstraram que a incorporação de MXO nas nanocápsulas, diminuiu a liberação da droga, fornecendo assim um sistema de liberação sustentada, mantendo a concentração do filtro solar nas camadas mais externas e formando também um filme protetor na superfície da pele (fator físico), onde as nanocápsulas poliméricas agem como um bloqueador de UV espalhando a luz (JIMÉNEZ et al., 2004; PAESE et al., 2009).

Testes realizados por Paese e colaboradores (2009) utilizaram nanopartículas do tipo LNC para testes com bloqueador solar, benzofenona-3 (BZ3), e análise de resposta imune para aplicações tópicas. O processo de nanoencapsulação atrasou a degradação do BZ3 sob radiação UVA além de fotoproteção constante (13 horas). Já os testes *in vivo* para resposta imune, demonstraram que BZ3-LNC não produz sensibilidade de contato nos camundongos, apresentando baixo potencial para causar reações alérgicas de contato (PAESE et al., 2009).

Ainda na cosmetologia, a análise da permeabilidade e absorção sistêmica de vitamina K1 (VitK1), foi analisada quando incorporada a nanocápsulas e LNCs, Silva e colaboradores (2013) analisaram a penetração cutânea em pele de suína (*in vitro*) após 8 horas de tratamento com Nanocápsulas de VitK1 e VitK1-LNC. O grupo tratado com VitK1-LNC, não apresentou penetração da droga na espessura total da pele, mas apresentou quantidades significativas de VitK1 no estrato córneo (camada mais externa) (Figura 5).

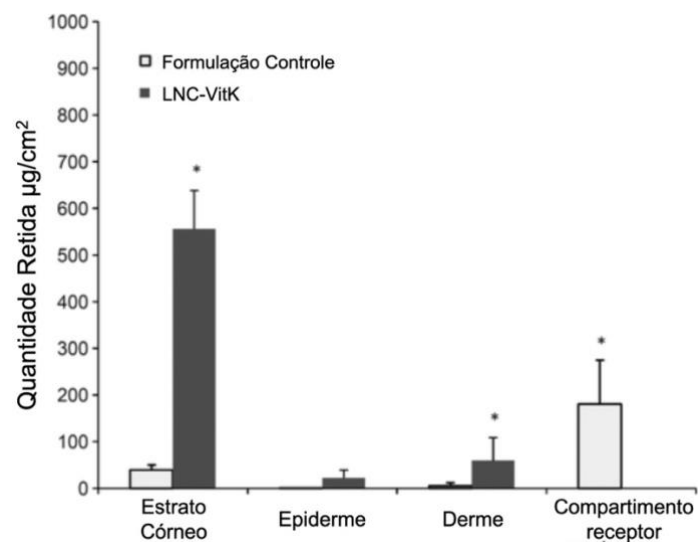


Figura 5. Penetração de LNC carregada com VitK1 em pele suína de fêmea (SILVA et al., 2013).

De Brum e colaboradores (2015) realizaram testes de penetração cutânea com nanocápsulas poliméricas e LNC preparadas com rodamina B, as imagens de fluorescência demonstraram que as nanocápsulas penetraram a pele atingindo a derme, enquanto a LNC ficou retida nas camadas mais externas (extrato córneo e epiderme). Esses resultados tornam a LNC uma promissora ferramenta para indústria de cosméticas e medicamentos dermatológicos, por concentra as partículas nas camadas mais externas da pele (DE BRUM et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial apoptótico e imunomodulador de nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com Metotrexato, através de sua aplicação em modelos biológicos de artrite (*in vivo*) e macrófagos em cultura (*in vitro*).

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o ação anti-inflamatória de Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregadas com metotrexato (LNC-MTX) em modelos de artrite experimental em ratos Lewis.
- b) Analisar por estereologia (morfometria quantitativa) os componentes articulares (membrana sinovial, espaço sinovial, cartilagem e condrocitos) das patas dos ratos com artrite experimental.
- c) Avaliar o efeito apoptótico de Nanocápsulas de Núcleo Lipídico carregadas com metotrexato (LNC-MTX) sobre macrófagos em cultura.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIVERNINI, S. et al. Driving chronicity in rheumatoid arthritis: perpetuating role of myeloid cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 193, n. 1, p. 13–23, jul. 2018.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818–1822, 19 mar. 2004.
- ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1, p. 215–220, 16 ago. 2007.
- ANTONOW, M. B. et al. Arginylglycylaspartic Acid-Surface-Functionalized Doxorubicin-Loaded Lipid-Core Nanocapsules as a Strategy to Target Alpha(V) Beta(3) Integrin Expressed on Tumor Cells. **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, 22 dez. 2017.
- BADER. **The Development of Targeted Drug Delivery Systems for Rheumatoid Arthritis Treatment.**
- BADER, R. A. The development of targeted drug delivery systems for rheumatoid arthritis treatment. **Syracuse Biomaterials Institute**, p. 111–132, 2012b.
- BARTELD, R. et al. Niosomes, an alternative for liposomal delivery. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, 12 abr. 2018.
- BASTIANCICH, C. et al. Anticancer drug-loaded hydrogels as drug delivery systems for the local treatment of glioblastoma. **Journal of Controlled Release**, v. 243, p. 29–42, 10 dez. 2016.
- BECHARD, M. A. et al. Procedural pain and patient-reported side effects with weekly injections of subcutaneous Methotrexate in children with rheumatic disorders. **Pediatric Rheumatology Online Journal**, v. 12, 19 dez. 2014.
- BERNARDI, A. et al. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. **European Journal of Pharmacology**, v. 586, n. 1, p. 24–34, 31 maio 2008.
- 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, out. 2009a.
- 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, out. 2009b.
- 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. 2009c.
- BERNARDI, A. et al. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 711–729, 2013.
- 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**, v. 10, p. 6603–6614, 22 out. 2015a.
- 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**, v. 10, p. 6603–6614, 22 out. 2015b.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2 fev. 2015.
- BULCÃO, R. P. Avaliação toxicológica in vivo de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis. 2013.

- CATTANI, V. B. et al. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1, p. 116–124, 31 jan. 2010.
- CHARÃO, M. F. et al. Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonary cell line. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 784–785, p. 1–9, 1 jun. 2015.
- CRUZ, L. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, n. 1, p. 198–205, 26 abr. 2006.
- DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217–223, jun. 2010.
- DE BRUM, T. L. et al. **Polymeric Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules Have Diverse Skin Penetration.** Text. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jnn/2015/00000015/00000001/art00142>>. Acesso em: 25 dez. 2018.
- DE OLIVEIRA, M. T. P. et al. Orally delivered resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules ameliorate LPS-induced acute lung injury via the ERK and PI3K/Akt pathways. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5215–5228, 12 jul. 2019.
- DEANE, K. D. et al. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 31, n. 1, p. 3–18, fev. 2017.
- DONG, D. et al. Elucidating the in vivo fate of nanocrystals using a physiologically based pharmacokinetic model: a case study with the anticancer agent SNX-2112. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 2521–2535, 31 mar. 2015.
- DREWES, C. C. et al. Novel therapeutic mechanisms determine the effectiveness of lipid-core nanocapsules on melanoma models. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1261–1279, 31 mar. 2016a.
- DREWES, C. C. et al. Novel therapeutic mechanisms determine the effectiveness of lipid-core nanocapsules on melanoma models. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1261–1279, 31 mar. 2016b.
- ENGLAND, B. R. et al. Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: mechanisms and implications. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 361, p. k1036, 23 abr. 2018.
- FANG, Q.; ZHOU, C.; NANDAKUMAR, K. S. **Molecular and Cellular Pathways Contributing to Joint Damage in Rheumatoid Arthritis.** Review Article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2020/3830212/>>. Acesso em: 27 fev. 2021a.
- FANG, Q.; ZHOU, C.; NANDAKUMAR, K. S. Molecular and Cellular Pathways Contributing to Joint Damage in Rheumatoid Arthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, p. e3830212, 17 mar. 2020b.
- 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. Labeling the oily core of nanocapsules and lipid-core nanocapsules with a triglyceride conjugated to a fluorescent dye as a strategy to particle tracking in biological studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 233, 13 maio 2014a.
- FIEL, L. A. et al. Labeling the oily core of nanocapsules and lipid-core nanocapsules with a triglyceride conjugated to a fluorescent dye as a strategy to particle tracking in biological studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 233, 13 maio 2014b.
- FONSECA-SANTOS, B.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. **International Journal**

- of **Nanomedicine**, v. 10, p. 4981–5003, 4 ago. 2015.
- FRIEDMAN, B.; CRONSTEIN, B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 86, n. 3, p. 301–307, maio 2019.
- FROZZA, R. L. et al. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 6, p. 694–703, dez. 2010.
- GARCÍA-GALLEGO, S. et al. Function Oriented Molecular Design: Dendrimers as Novel Antimicrobials. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 22, n. 10, 21 set. 2017.
- GIGLIOBIANCO, M. R. et al. Nanocrystals of Poorly Soluble Drugs: Drug Bioavailability and Physicochemical Stability. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, 21 ago. 2018.
- GORANTLA, S. et al. Targeted drug-delivery systems in the treatment of rheumatoid arthritis: recent advancement and clinical status. **Therapeutic Delivery**, 20 maio 2020.
- GUO, Q. et al. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. **Bone Research**, v. 6, 27 abr. 2018.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 11 jul. 2007.
- HAN, D.; CHEN, Q.; CHEN, H. Food-Derived Nanoscopic Drug Delivery Systems for Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Molecules**, v. 25, n. 15, 31 jul. 2020.
- HAZLEWOOD, G. S. et al. Methotrexate monotherapy and methotrexate combination therapy with traditional and biologic disease modifying anti-rheumatic drugs for rheumatoid arthritis: A network meta-analysis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2016, n. 8, 29 ago. 2016.
- HE, H. et al. Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- HOFFMAN, A. S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, Proceedings of the Tenth European Symposium on Controlled Drug Delivery. v. 132, n. 3, p. 153–163, 18 dez. 2008.
- HOWARD, S. C. et al. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. **The Oncologist**, v. 21, n. 12, p. 1471–1482, dez. 2016.
- JÄGER, A. et al. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, n. 1, p. 297–305, 29 jun. 2007.
- JÄGER, E. et al. **Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area**. Text. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jbn/2009/00000005/00000001/art00015>>. Acesso em: 9 dez. 2018.
- JAIN, KEWALK. Drug Delivery Systems - An Overview. In: JAIN, KEWALK. (Ed.). . **Drug Delivery Systems**. Methods in Molecular Biology™. [s.l.] Humana Press, 2008. p. 1–50.
- JANAKIRAMAN, K. et al. Novel nano therapeutic materials for the effective treatment of rheumatoid arthritis-recent insights. **Materials Today. Communications**, v. 17, p. 200–213, dez. 2018.
- JEKIC, B.; MAKSIMOVIC, N.; DAMNJANOVIC, T. Methotrexate pharmacogenetics in the treatment of rheumatoid arthritis. **Pharmacogenomics**, v. 20, n. 17, p. 1235–1245, nov. 2019.
- JIMÉNEZ, M. M. et al. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, n. 1, p. 45–55, 19 mar. 2004.

- KARIMI, M. et al. Carbon nanotubes part I: preparation of a novel and versatile drug-delivery vehicle. **Expert opinion on drug delivery**, v. 12, n. 7, p. 1071–1087, jul. 2015.
- KESHARWANI, P. et al. Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 136, p. 52–77, 1 fev. 2018.
- KESHARWANI, P.; JAIN, K.; JAIN, N. K. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. **Progress in Polymer Science**, Topical Issue on Biorelated Polymers. v. 39, n. 2, p. 268–307, 1 fev. 2014.
- KOETTING, M. C. et al. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. **Materials science & engineering. R, Reports : a review journal**, v. 93, p. 1–49, jul. 2015.
- KOMNINO, E. R. et al. Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157561, 16 jun. 2016.
- KOTHAMASU, P. et al. Nanocapsules: The Weapons for Novel Drug Delivery Systems. **BioImpacts : BI**, v. 2, n. 2, p. 71–81, 2012.
- KOTSUCHIBASHI, Y.; NAKAGAWA, Y.; EBARA, M. 2.1 - Nanoparticles. In: EBARA, M. (Ed.). . **Biomaterials Nanoarchitectonics**. [s.l.] William Andrew Publishing, 2016. p. 7–23.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 1 jan. 2010.
- LI, X. et al. Microencapsulation of nanoemulsions: novel Trojan particles for bioactive lipid molecule delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1313–1325, 2011.
- LIAO, K. P. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 27, n. 2, p. 136–140, fev. 2017.
- LIECHTY, W. B. et al. Polymers for Drug Delivery Systems. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 1, p. 149–173, 2010.
- LIN, Y.-J.; ANZAGHE, M.; SCHÜLKE, S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. **Cells**, v. 9, n. 4, 3 abr. 2020.
- LIN, Y.-K. et al. Combination of calcipotriol and methotrexate in nanostructured lipid carriers for topical delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 117–128, 2010.
- LINSLEY, C. S.; WU, B. M. Recent advances in light-responsive on-demand drug-delivery systems. **Therapeutic Delivery**, v. 8, n. 2, p. 89–107, fev. 2017.
- LIU, J.; YANG, L.; HOPFINGER, A. J. Affinity of Drugs and Small Biologically Active Molecules to Carbon Nanotubes: A Pharmacodynamics and Nanotoxicity Factor? **Molecular pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 873–882, 2009.
- LOPEZ-OLIVO, M. A. et al. Methotrexate for treating rheumatoid arthritis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 6, 10 jun. 2014.
- LUCAS, C. J.; DIMMITT, S. B.; MARTIN, J. H. Optimising low-dose methotrexate for rheumatoid arthritis—A review. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 85, n. 10, p. 2228–2234, out. 2019.
- MASAYUKI, Y. et al. Polymer micelles as novel drug carrier: Adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. **Journal of Controlled Release**, v. 11, n. 1, p. 269–278, 1 jan. 1990.
- MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. **Cancer Research**, v. 46, n. 12 Part 1, p. 6387–6392, 1 dez.

1986.

MENEZES, P. DOS P. et al. **Hesperetin-loaded lipid-core nanocapsules in polyamide: a new textile formulation for topical drug delivery.** Disponível em: <<https://www.dovepress.com/hesperetin-loaded-lipid-core-nanocapsules-in-polyamide-a-new-textile-f-peer-reviewed-article-IJN>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

MOGHASSEMI, S.; HADJIZADEH, A. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. **Journal of Controlled Release**, v. 185, p. 22–36, 10 jul. 2014.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573–573, 1 jan. 2006.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 29 jan. 2010.

NIKIPHOROU, E. et al. Haematological abnormalities in new-onset rheumatoid arthritis and risk of common infections: a population-based study. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 59, n. 5, p. 997–1005, 1 maio 2020.

OSTROWSKA, M. et al. Cartilage and bone damage in rheumatoid arthritis. **Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 111–120, 2018.

PAESE, K. et al. **Semisolid Formulation Containing a Nanoencapsulated Sunscreen: Effectiveness, In Vitro Photostability and Immune Response.** Text. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jbn/2009/00000005/00000003/art00002>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

PATEL, S. K. et al. Cyclooxygenase-2 Inhibiting Perfluoropoly (Ethylene Glycol) Ether Theranostic Nanoemulsions—In Vitro Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 7 fev. 2013.

POHLMANN, A. R. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 4–5, p. 305–312, set. 2002.

POHLMANN, A. R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623–638, maio 2013.

POLETO, 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. 2012a.

POLETO, 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. 2012b.

RIGON, R. B. et al. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Melanoma Antitumoral Therapy: A Review. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

RISBUD, M. V. et al. pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 68, n. 1, p. 23–30, 31 jul. 2000.

ROMÃO, V. C.; CANHÃO, H.; FONSECA, J. E. Old drugs, old problems: where do we stand in prediction of rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and other synthetic DMARDs? **BMC Medicine**, v. 11, p. 17, 23 jan. 2013.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003a.

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. 2003b.

- SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 25 set. 2010.
- SHAKEEL, F. et al. Nanoemulsions as potential vehicles for transdermal and dermal delivery of hydrophobic compounds: an overview. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 8, p. 953–974, 1 ago. 2012.
- SILVA, A. L. M. DA et al. Vitamin K1-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and in vitro skin permeation. **Skin Research and Technology**, v. 19, n. 1, p. e223–e230, 2013.
- SIMS, L. B.; FRIEBOES, H. B.; STEINBACH-RANKINS, J. M. Nanoparticle-mediated drug delivery to treat infections in the female reproductive tract: evaluation of experimental systems and the potential for mathematical modeling. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 2709–2727, 3 maio 2018.
- SIOUTI, E.; ANDREAKOS, E. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. **Biochemical Pharmacology**, v. 165, p. 152–169, jul. 2019.
- SPAGNOLO, P. et al. The Lung in Rheumatoid Arthritis: Focus on Interstitial Lung Disease. **Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)**, v. 70, n. 10, p. 1544–1554, out. 2018.
- TAHARA, K. et al. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, n. 1, p. 198–204, 1 dez. 2009.
- TANAKA, S. RANKL is a therapeutic target of bone destruction in rheumatoid arthritis. **F1000Research**, v. 8, 23 abr. 2019.
- TOMODA, K. et al. Enhanced transdermal delivery of indomethacin-loaded PLGA nanoparticles by iontophoresis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 2, p. 706–710, 1 dez. 2011.
- TOMODA, K. et al. Enhanced transdermal delivery of indomethacin using combination of PLGA nanoparticles and iontophoresis in vivo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 50–54, 1 abr. 2012.
- TSENG, C.-C. et al. Dual Role of Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis: The Chicken and the Egg. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 6 fev. 2020.
- VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1–3, p. 200–208, fev. 2011.
- WAGNER, V. et al. The emerging nanomedicine landscape. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1211–1217, out. 2006.
- YOU, J.-O. et al. Bioresponsive matrices in drug delivery. **Journal of Biological Engineering**, v. 4, p. 15, 29 nov. 2010.
- 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. 2014a.
- 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. 2014b.
- ZHANG, Y.; HUANG, Y.; LI, S. Polymeric Micelles: Nanocarriers for Cancer-Targeted Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 4, p. 862–871, 4 abr. 2014.
- ZHAO, F. et al. Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Nanomaterials**, v. 5, n. 4, p. 2054–2130, 3 dez. 2015.

CAPÍTULO 2

Nanocápsulas de Núcleo Lipídico Carregadas com Metotrexato Previnem a Perda de Espaço Articular em Artrite Experimental

Aguyda Rayany Calvante Barbosa¹; Catiúscia Padilha de Oliveira², Silvia Stanisçuaski Guterres², Adriana Raffin Pohlmann², Oscar Tadeu Ferreira Costa³, Antonio Luiz Boechat¹

¹Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil.

² Programa de Pós-graduação em ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

³Laboratório de Morfologia Quantitativa, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas

⁴ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto alegre, Brazil

Corresponding Authors:

Antonio Luiz Boechat, MD, PhD, alboechat@ufam.edu.br

Adriana Raffin Pohlmann, PhD, adriana.pohlmann@ufrgs.br

RESUMO

Introdução – O Metotrexato é uma droga antirreumática considerada modificadora do curso da doença, por sua capacidade de preservar o espaço articular e reduzir danos a cartilagem. Entretanto, o MTX está associado a eventos adversos frequentes, além de ausência de resposta clínica em pacientes. As nanocápsulas de Núcleo Lipídico (LNC) carregadas com metotrexato (MTX-LNC) são um novo sistema mais efetivo no controle da artrite devido a altas concentrações teciduais e intracelulares. *Objetivos* – avaliar a eficácia das Nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com metotrexato em preservar a cartilagem articular e espaço sinovial, e reduzir a sinovite em animais com artrite experimental. *Metodologia* – As formulações MTX e MTX-LNC foram preparadas por metodologia *self-assembling*. Ratos Lewis foram induzidos a artrite por injeção intradérmica de adjuvante completo de Freund nos grupos (1) artrite; (2) metotrexato; (3) LNC; (4) MTX-LNC e (5) animais sem artrite. O edema de pata traseira foi avaliado com pletismometria durante 28 dias. As patas traseiras foram preparadas para análise histológica por morfometria quantitativa para espaço articular, membrana sinovial, cartilagem articular e calcificada, além da quantificação de condrócitos. *Resultados* – O grupo MTX-LNC apresentou melhor resultado quando comparado com MTX na redução do volume da pata no 28º dia de experimento ($p < 0.0001$). Este efeito redutor de artrite é também observado precocemente no 21º dia de experimento, $p < 0.0001$. Na avaliação por estereologia dos componentes articulares o MTX-LNC foi superior ao MTX para Espaço Articular ($p = 0,329$), Membrana Sinovial ($p = 0,021$), Cartilagem (articular: $p = 0,0031$, calcificada: $p = 0,044$) e Condrócitos (articular: $p = 0,008$, calcificada: $p = 0,004$). *Conclusão* – A nova formulação MTX-LNC mostra-se promissora e mais eficiente que MTX tradicional como modificadora do curso de doença em modelo experimental, preservando espaço articular, volume de cartilagem e número de condrócitos.

Palavras Chaves: Nanocápsula de Núcleo Lipídico, Metotrexato, Artrite Experimental,

INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica autoimune, caracterizada por inflamação da membrana sinovial e se não tratada adequadamente resulta em danos a cartilagem, estreitamento do espaço articular e erosão óssea. A inflamação se apresenta como sinovite clínica resultando em dor musculoesquelética, rigidez nas articulações, perda da amplitude de movimentos e fraqueza muscular (BOECHAT et al., 2015a; CONCEIÇÃO et al., 2016; GOES; COELHO; OLIVEIRA, 2014; ROGERS et al., 2015; URMAN et al., 2018).

A AR acomete até 1% da população mundial, afetando todas as raças e com prevalência de 3:1 em mulheres. A doença normalmente inicia-se entre 20-60 anos, com incidência maior aos 45 anos, por acometer adultos em fase produtiva, tornou-se uma doença de importância socioeconômica, tornando até 50% dos paciente incapazes para trabalhar após 10 anos da doença (FERNANDES et al., 2011; FILIPPIN et al., 2008; LOUZADA-JUNIOR et al., 2007).

O tratamento farmacológico é a principal terapia para pacientes com AR, sendo as drogas antirreumáticas modificadoras do curso da doença (DMCD), a primeira linha de medicamentos utilizados. Esses agentes possuem a capacidade de reduzir ou reverter sinais e sintomas, incapacidade, comprometimento da qualidade de vida, incapacidade para o trabalho e progressão do dano articular, interferindo assim todo o processo da doença (BADER, 2012; SMOLEN et al., 2014).

O Metotrexato (MTX) é um medicamento utilizado no tratamento de câncer, doenças inflamatórias imunomediadas, tais como AR, tendo um papel central no tratamento, pois contribui para melhora dos sintomas clínicos e controle da doença, inibindo a proliferação de células inflamatórias, interferindo na atividade das células T, aumento na liberação de adenosina (ADO), que por sua vez age nos receptores de macrófagos e neutrófilos reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e elevando a secreção de moléculas anti-inflamatórias (BELLO et al., 2017; ROMÃO; CANHÃO; FONSECA, 2013) Apesar da importância do tratamento com MTX, um grupo significativo de pacientes não respondem ao tratamento com a droga (40%), enquanto os pacientes respondedores nota-se que 8 a 16% devem descontinuar a droga devido a efeitos adversos, tais como problemas hepáticos, gastrointestinais, hematológicos, renais e pulmonares

(ANTONIOLI et al., 2013; BOECHAT et al., 2015b; GUPTA et al., 2018; PERES et al., 2015, 2018).

Um importante avanço em sistemas de drogas em reumatologia foi a demonstração que lipossomas marcados com tecnécio acumulam-se na membrana sinovial de camundongos após administração endovenosa (WILLIAMS et al., 1986, 1987). Um novo modelo de nanocápsulas, denominada Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) vem demonstrando resultados promissores, essas nanopartículas apresentam grande estabilidade nos fluidos corporais, acúmulo em tecidos inflamados e maior captação por macrófagos ($M\phi$ s), aumentando assim a liberação da droga no espaço intracelular (BADER, 2012; POLETTO et al., 2012; POPE, 2002).

Considerando que a AR é uma doença incapacitante e de grande impacto socioeconômico, a utilização de LNC carregadas com Metotrexato (MTX-LNC) visa concentrar a droga no sítio inflamatório e/ou nos espaços intracelulares para controle da doença, além disso, o uso de nanoformulações pode reduzir os efeitos colaterais relacionados ao tratamento.

MATERIAIS E METODOS

Preparo das formulações de Nanocápsulas de Núcleo Lipídico (LNC)

As formulações foram produzidas por precipitação do polímero pré-formado (BOECHAT et al., 2015a; OLIVEIRA et al., 2012) descrito na Tabela a seguir, e evaporadas à pressão reduzida até o volume final.

Matéria-prima	LNC	MTX-LNC
Poli(ϵ)coprolactano	0,100g	0,100g
Monoestearato de sorbitano	0,038g	0,038g
Triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico	0,160g	0,160g
Diclofenaco ácido	-----	0,0025g
Acetona	27mL	27mL
Polissorbato 80	0,077g	0,077g
Água ultrapura	53mL	53mL
Volume final após evaporação	10mL	10mL

Para análise de distribuição de tamanho das partículas produzidas, foi utilizada a técnica de difração de laser (teoria Mie de espalhamento de luz). A determinação da quantidade de MTX nas MTX-LNC, foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (OLIVEIRA et al., 2012).

Considerações Éticas

Os procedimentos metodológicos com animais foram submetidos à apreciação ética no Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, protocolo 018/2010-CEEA com aprovação.

Animais

Vinte ratos Lewis machos de 8 semanas de idade, foram mantidos no biotério Central da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pesando entre 220-270g, com acesso a água e comida *ad libitum*, ciclo de claro-escuro a cada 12 horas e ambiente com temperatura controlada de 22°C. Para a execução do experimento, os animais foram randomizados em 5 grupos com 6 animais cada, sendo mantido dois por gaiola. Todos os experimentos conduzidos foram realizados com aprovação do Comitê Institucional de Ética em Experimentação Animal (001/2009 UFAM). Os animais foram randomizados nos seguintes grupos: 1 – Controle (+) (Artrite); 2 – MTX (formulação tradicional); 3 – LNC (nanocápsula sem droga); 4 – MTX-LNC (nanocápsula com droga) e 5 – Controle (-) (Sem Artrite). O grupo 2 foi tratado com MTX i.p 1mg/Kg/semanal (0,7, 14 e 21 dias), o grupo 4 com dose equivalente com MTX-LNC e o grupo 3 (LNC), com o mesmo volume do grupo MTX-LNC.

A avaliação do volume das patas (mL) (*variável dependente*) por pletismometria (Insight®, Brasil) foi feita nos dias 0, 7, 14, 21, 24 e 28 de experimento (configuração pré-teste-pós-teste). Desse modo, tem-se um delineamento fatorial com múltiplos níveis, completamente randomizado, cego, balanceado e replicado, com dois fatores: 1 – fator *grupo* com cinco níveis e 2 – fator *tempo* com 6 níveis, formando 30 unidades de experimentação com 6 replicações cada. Delineamento Experimental vide Figura 1.

Experimental Design

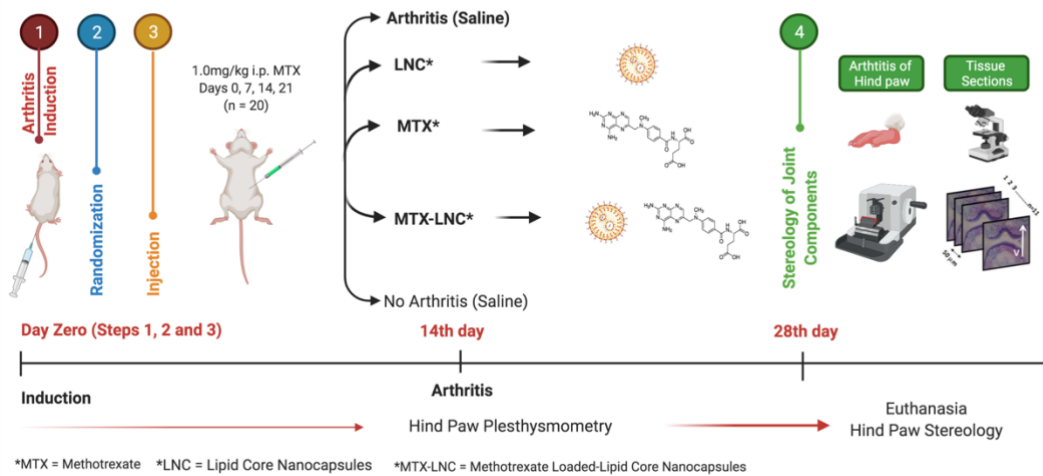


Figura 1: Delineamento Experimental

Artrite Induzida por Adjuvante de Freund em Ratos Lewis (CFA)

A indução ocorreu no dia zero com a injeção 0,1mL de adjuvante completo de Freund (Difco®) em dose única contendo 1µg de *Mycobacterium tuberculosis* aplicado por via intradérmica na base da cauda (EDEN; WAGENAAR-HILBERS; WAUBEN, 1996; PEARSON, 1956; VAN EDEN; WAGENAAR-HILBERS; WAUBEN, 2001; WHITEHOUSE, 2007), posterior a breve anestesia inalatória com isoflurano (COLMAN et al., 2002). O grupo controle (-), foi mantido nas mesmas condições com injeção contendo solução salina.

Avaliação do Volume das Patas e Escore de Artrite

Os animais foram avaliados diariamente quanto às variações de peso (controle = $370 \pm 13,96g$; IA = $396 \pm 30,89 g$) e, em relação à atividade locomotora. No 28º dia, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical após injeção intravenosa de 3 ml (200 mg/ml) de pentobarbital sódico. O volume das patas (mL) foi avaliada (*variável dependente*) por pletismometria (Insight®, Brasil).

Análise Estereológica (Morfologia Quantitativa)

A sequência metodológica da estereologia das articulações está demonstrada na Figura 2. Os membros posteriores dos animais foram removidos *en bloc* e mantidas em formalina tamponada por no mínimo 48/hs em temperatura ambiente. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Citologia, UFAM, Manaus, AM. Em seguida, os membros foram dissecadas do tegumento e a articulação metatarsofalangeana (MTF) do 5º dígito de uma das patas foi cuidadosamente removida *en bloc* com o auxílio de um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) e mantida na mesma solução fixadora por 48/hs.

Em seguida, as amostras foram descalcificadas em ácido nítrico 5% por 48hs. Para o processamento histológico, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70 e 96%) por 6/hs. Em seguida, pré-infiltradas em etanol 96% + solução de resina plástica de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraues, Alemanha) *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram depositadas em moldes individuais de teflon *Histobloc* (Külzer-Heraues, Alemanha) (1 articulação/molde) e incluídos em resina plástica + solução polimerizadora. Os moldes foram mantidos em estufa a 37º C por 24/hs.

Após total polimerização, os blocos foram observados em estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) e marcados com pincel de ponta fina quanto ao início e fim da região articular separando-a da região tegumentar e dermal. As marcas serviram de orientação para a microtomia posterior (Microtome Leica RM2125RT, Alemanha).

Com a ajuda de um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) equipado com uma lente micrometrada, o comprimento total projetado (L_t) de cada articulação MTF dentro do bloco de resina foi medido perpendicularmente ao plano do seccionamento, isto é, na direção em que o bloco iria avançar durante a microtomia. Assim, $L_t = \text{SOMA } L_1 + L_2 + \dots + L_n$. L_t foi dividido pelo número de seções desejadas (n). Neste estudo, o número de 6-12 seções por pata foi estabelecido como satisfatório. Seções seriais de 3 μm foram obtidas a cada avanço na navalha sobre o bloco de resina no micrótomo, o que equivaleu ao avanço de 10 ou 25 μm a cada seção obtida. A 1ª seção válida para contagem foi aquela que apresentou o 1º sinal evidente da articulação

simbolizado pela cartilagem articular, a partir deste ponto, dependendo do animal, obteve-se de 6 a 12 seções. Todas as seções seriais foram marcadas e identificadas quanto a sua sequência de corte. As seções foram coradas com um dos seguintes corantes:

1. Fucsina básica (fucsina, 0,25g; etanol, 96º GL à 60º C, 20mL; água destilada, 80mL) e Azul de toluidina (borato de sódio, 0,5g; azul de toluidina, 0,12g; água destilada, q.s.p) 0,5% para a evidenciação de mastócitos na cápsula sinovial. Brevemente, as seções foram mergulhadas rapidamente em fucsina, secas em chapa aquecedora e coradas por 1 min em azul de toluidina.
2. Eosina (eosina, 2g; dicromato de potássio, 1g; solução aquosa saturada de ácido pícrico, 20mL; etanol absoluto, 20 mL, água destilada, 160mL) e hematoxilina de Harrys (hematoxilina cristalizada, 1g; etanol absoluto, 10ml; sulfato de alumínio e amônio ou sulfato de alumínio e potássio, 20g; água destilada, 200ml; óxido de mercúrio (vermelho), 0,5g) para a histopatologia. Brevemente, as seções foram mergulhadas por 1 min em eosina e em seguida lavadas em água destilada. Em seguida, foram mergulhadas por 1 hora em hematoxilina de Harrys a 60º C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e montadas em lâminas histológicas seladas com Entellan (Merck, Alemanha).

Para as análises estereológicas foi utilizado um microscópio Olympus BX-41 equipado com uma câmara digital Nikon Coolpix-5400 (Japão) para captura das imagens. As contagens estereológicas foram executadas através do programa Imod versão 4.7/módulo stereology (KREMER; MASTRONARDE; MCINTOSH, 1996). O programa de análise de imagens ImageJ (RASBAND, 2008) foi utilizado para a amostragem sistemática uniforme ao acaso dos campos de vista analisados, SURS (*systematic uniforme random sampling*) e para as medidas de espessura da cartilagem.

Os campos amostrados foram fotografados em vários aumentos conforme conveniente (objetiva PLAN 4x/0,4; PLAN 10x/0,4; 20x/0,4; 40x/0,4 e 100x/0,4; ocular GSWH 10x/22) para análises e descrição patológica. Ambos os sistemas permitem a sobreposição das imagens com sistemas teste de contagem de natureza variada dependendo do

propósito da contagem. Desse modo, a contagem de pontos sobre determinada estrutura relacionou com volume ou densidade de volume e a contagem de estruturas em uma moldura 3-D relacionou com o número total dessas estruturas (HOWARD, C. V.; REED, M. G., 2010). Nesse estudo o termo "perfil" empregado no processo de contagem de células denota um evento contável 2D resultante da microtomia de determinada estrutura que antes possuía 3 dimensões.

Volume articular

O princípio de Cavalieri (CAVALIERI, 1635) foi utilizado na determinação do volume das articulações MTF. A técnica é baseada em análises matemáticas robustos, sendo extremamente eficiente em sua simplicidade (WEIBEL, 1980; GUNDERSEN et al., 1988; HOWARD; REED, 2010; MOUTON, 2011). O material foi totalmente fotografado, com 8 ampliações e sobrepostas com um sistema de testes de contagem contendo cruzamento gerados pelo programa Imod (versão 4.7 / estereologia) (KREMER; MASTRONARDE; MCINTOSH, 1996). A cada vez que o ponto central do cruzamento tocava a área de interesse (articulação MTP incluindo a região periarticular), uma seção era contatada. A área de articulação avaliada neste estudo compreendeu os limites do osso subcondral tanto da região falangeana quanto da região metatársica. O volume absoluto da articulação MTP foi calculado como:

$$V_{MTP} = \sum_{i=1}^m P_i \cdot \frac{a}{p} \cdot T$$

Onde, V é o volume absoluto da junta; é a soma dos pontos que atingem a junta; a / p é a área ocupada por cada ponto central (11,867,38 μm^2) e T (25 μm) é a distância entre cada seção.

Volume de componentes articulares

O percentual de cada componente dentro da articulação MTP foi obtida pelo princípio de Delesse (DELESSE, 1866). Para isso, os campos de visão microscópicos dentro da

articulação MTF foram sistemáticos, uniformes e amostrados aleatoriamente (ampliação 200). A porcentagem de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (junta) foi calculada como:

$$Vv(\text{component, reference space}) = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$$

Onde Vv é a densidade de volume do componente articular; é a soma dos pontos que atingem cada componente (espaço articular, membrana sinovial, cartilagem articular, cartilagem calcificada e condrócitos) e é a soma dos pontos que atingem o espaço de referência (região articular) (HOWARD; REED, 2010). Os valores percentuais obtidos para cada componente foram transformados em absolutos quando multiplicados pelo volume Cavalieri da junta.

Número de condrócitos articulares e calcificados

Uma quantificação 2-D foi usada para determinar o número de perfis de condrócitos na cartilagem. Para tanto, foi utilizado um sistema de teste contendo quatro linhas delimitando um quadro de contagem. Para contagens das células, a área de cada quadro foi de $15.800 \mu\text{m}^2$. O perfil celular ($Q_{condrócito}$) foi contado apenas se estivessem dentro do quadro (mesmo em suas extensões) e não tocassem a linha de exclusão e os resultados foram expressos como número de perfis mm^{-2} e calculados como:

$$Q_{mast\ cell} = \frac{\sum Q_{mast\ cell}}{(\sum Nframes \times \sum Aframe)} \quad \text{e} \quad Q_{chondrocyte} = \frac{\sum Q_{chondrocyte}}{(\sum Nframes \times \sum Aframe)}$$

Onde, $\sum Q_{chondrocyte}$ são perfis de número de células; $\sum Nframes$ é a soma dos frames e $\sum Aframe$ é a área dos frames.

Joint Stereology (Quantitative Morphology)

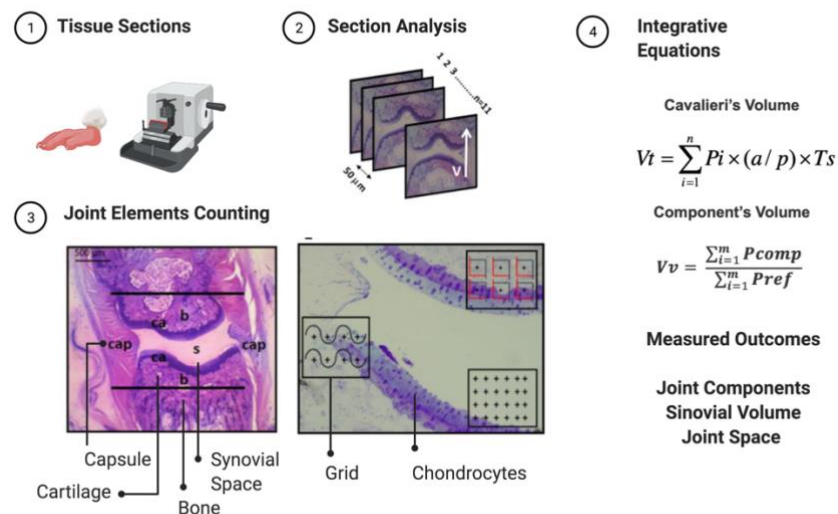


Figura 2. Sequência metodológica da Estereologia Articular

Análise Estatística

Os dados foram descritos como média e desvio padrão. Foram utilizados Análise de Variância (ANOVA) comparação de médias do volume de patas para cinética de artrite e demais medidas (delineamento com dois fatores completamente randomizado). 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. Os dados estereológicos obtidos através da microscopia de luz foram avaliados para cada animal e o estimador da variância foi determinado usando o coeficiente de erro (C.E.) para cada parâmetro. Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Nos casos em que foi indicada a diferença entre os grupos, o teste t de Student foi utilizado para comparar os valores médios entre os grupos testados. O limite de confiança estabelecido para os testes foi de 5%. Os dados estereológicos foram avaliados para cada animal e o estimador de variância foi determinado utilizando o coeficiente de erro de acordo com CRUZ-ORIVE (1999). A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada às 15 variáveis estereológicas para explorar as relações entre essas variáveis e os tratamentos testados e para definir as variáveis com maior influência no presente modelo experimental. Para tanto, foi utilizado o programa PAST-Paleontological Statistics, versão 3.14 (HAMMER, 2013).

RESULTADOS

Evolução da artrite em ratos Lewis

A cinética da artrite foi acompanhada através do volume das patas traseiras dos ratos, nos diferentes grupos: 1- Controle (+), 2- LNC, 3- MTX e 4- MTX-LNC, os animais tiveram as patas medidas nos dias 0, 7, 14, 21, 24 e 26 do experimento. A partir do vigésimo primeiro dia de experimento, os grupos apresentaram diferenças. O grupo MTX, MTX-LNC e LNC apresentaram redução quando comparados ao grupo controle (+) (artrite). Ao compararmos os grupos MTX e MTX-LNC, o grupo tratado com a droga nanoencapsulada reduziu o volume da pata de forma significativa a partir do vigésimo primeiro dia ($p=0,01$), vigésimo quarto dia ($p<0,0001$) e vigésimo sexto dia ($p=0,001$) (Figura 3).

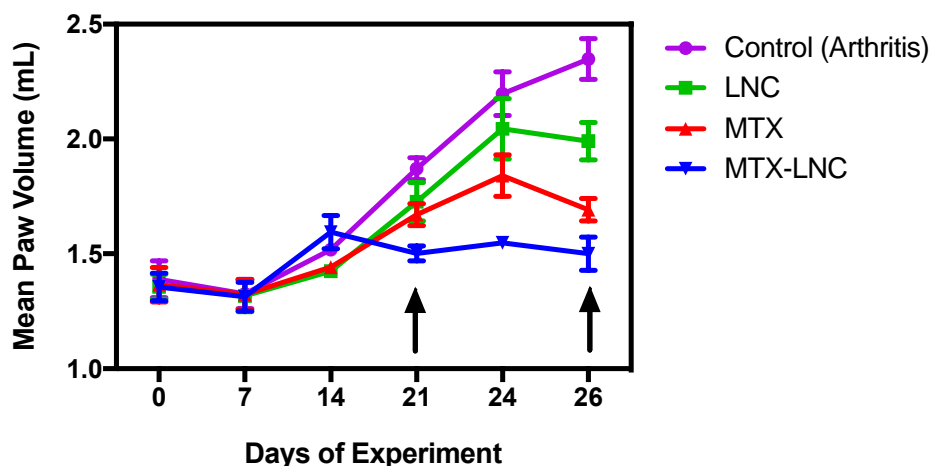


Figura 3. Evolução da artrite em 28 dias. Volume das patas traseiras dos Ratos Lewis foram comparadas entres os grupos MTX vs MTX-LNC, houve diferença significativa entre os grupos a partir do dia 21 ($p=0,01$), dia 24 ($p<0,0001$) e dia 26 ($p=0,001$).

Componentes estruturais da articulação metatarsofalangeana (MTF)

A densidade de volume de alguns componentes da articulação MTF foram calculados através do método de Cavalieri (mm^3) (Figura 4). Uma das características da artrite é a perda do espaço articular, o grupo MTX não apresentou significância quando comparado ao grupo artrite ($0,05\pm0,002$, $0,024\pm0,004$; $p=0,3291$), enquanto o grupo tratado com MTX-LNC, apresentou diferença significativa com o grupo MTX

($0,088\pm 0,012$, $0,05\pm 0,002$; $p=0,3291$) e controle (+) ($0,088\pm 0,012$, $0,024\pm 0,004$; $p=0,0022$) (Figura 4A). Quando analisado a espessura da membrana sinovial, o único grupo que apresentou diferença significativa foi MTX-LNC, tanto comparada com o controle (+) ($22,61\pm 2,291$, $35,80\pm 2,678$; $p<0,0001$), como com MTX ($22,61\pm 2,291$, $29,35\pm 0,9004$; $p=0,0211$) (Figura 4B).

A cartilagem articular do grupo MTX-LNC, apresentou diferença significativa quando comparada ao controle (+) ($0,04\pm 0,0063$, $0,099\pm 0,00047$; $p<0,0001$) e MTX ($0,04\pm 0,0063$, $0,053\pm 0,0037$; $p=0,0031$). Os animais do grupo LNC apresentaram redução igual o grupo MTX (Figura 4C). O grupo MTX-LNC, também causou uma redução significativa da cartilagem calcificada quando comparada com o grupo artrite ($0,035\pm 0,0058$, $0,089\pm 0,018$; $p<0,0001$) e MTX ($0,035\pm 0,0058$, $0,054\pm 0,005$; $p=0,0436$). O grupo MTX, apresentou redução significativa da cartilagem calcificada quando comparado com o controle (+) ($0,054\pm 0,005$, $0,089\pm 0,018$; $p=0,0005$) (Figura 4D).

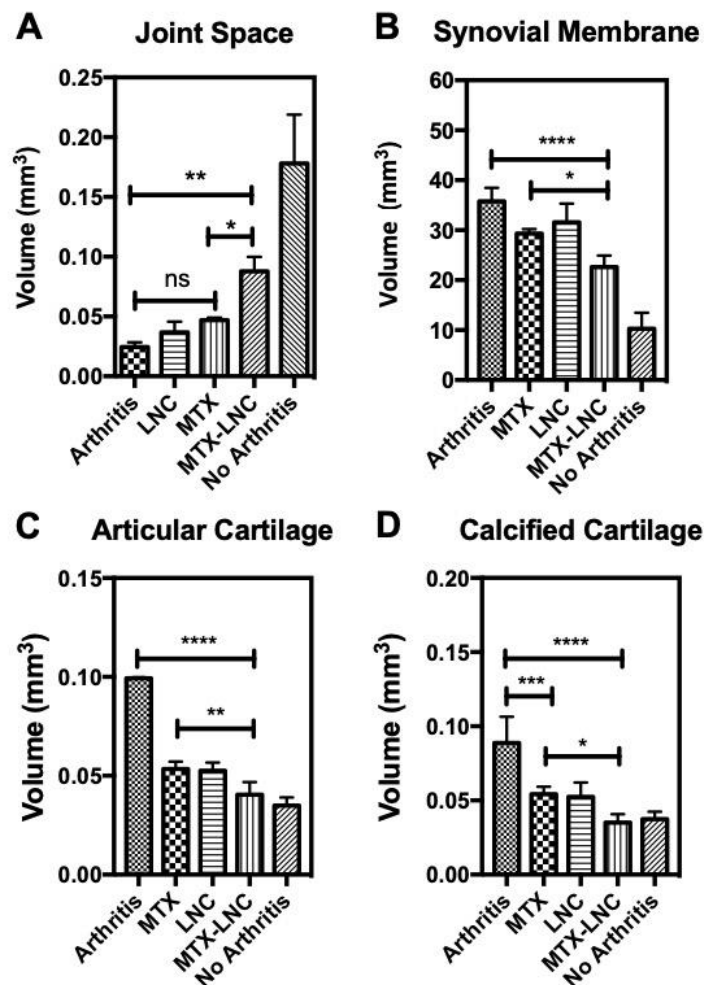


Figura 4. Densidade de volume dos componentes estruturais da MTF.

A análise do Espaço articular apresentou diferença significativa entre os grupos MTX-LNC e artrite ($p=0,0022$) e MTX-LNC e MTX ($p=0,3291$), o grupo MTX, não apresentou significância quando comparado ao grupo artrite. **B)** O grupo LNC-MTX, apresentou diferença significativa com controle (+) ($p<0,0001$) e MTX ($p=0,0211$) quando analisada a espessura da membrana sinovial. Quando analisada a espessura da cartilagem, **C)** os grupos LNC-MTX apresentou diferença do grupo artrite ($p<0,0001$) e MTX ($p=0,0031$) da cartilagem articular. **D)** A espessura da cartilagem calcificada foi analisada e a diferença entre os grupos MTX-LNC/Controle (+) ($p<0,0001$), MTX-LNC/MTX ($p=0,0436$) e MTX/artrite ($p=0,0005$) foi significativa.

MTX protegeu os condrócitos na artrite experimental

Quando analisado o número de condrócitos nas cartilagens, observamos nos grupos tratados com MTX/MTX-LNC (Figura 5), uma maior proteção. Os condrócitos da cartilagem articular, apresentaram diferença significativa entre os grupos: MTX/Artrite ($614,3\pm 225,0$, $2887\pm 496,1$; $p=0,0055$) e MTX/MTX-LNC ($614,3\pm 225,0$, $1089\pm 87,72$; $p=0,0081$) (Figura 5A). Condrócitos da cartilagem calcificada, MTX/Artrite ($495,3\pm 180,6$,

1951±477,8; $p=0,0242$) e MTX/MTX-LNC (495,3±180,6, 954,5±76,16; $p=0,0041$) (Figura 5B).

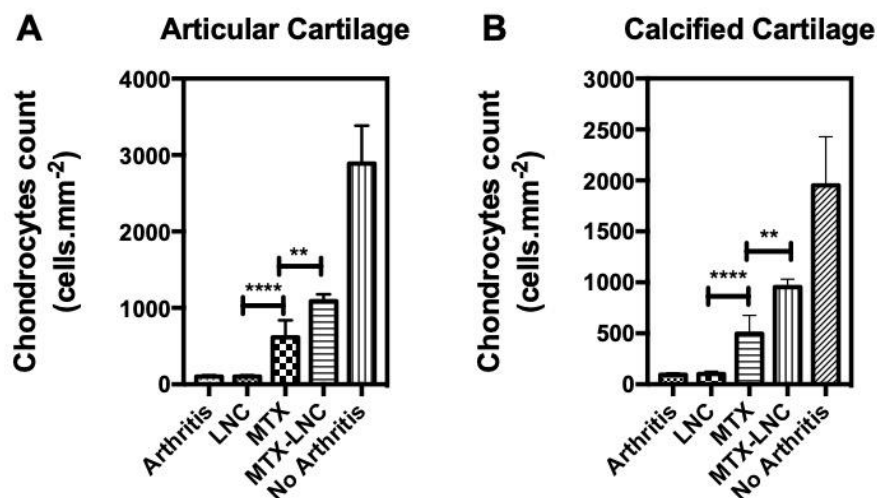


Figura 5. Condrcitos das cartilagens articular e calcificada.

Os grupos tratados com MTX/MTX-LNC apresentou diferenas significativas em ambas as cartilagens: **A)** MTX/Artrite ($p=0,0055$) e MTX/MTX-LNC ($p=0,0081$), **B)** MTX/Artrite ($p=0,0242$) e MTX/MTX-LNC ($p=0,0041$).

DISCUSSÃO

O MTX é um recurso terapêutico importante no tratamento da AR, é a principal droga prescrito, pois atua na reduão de sinais e sintomas, alcanando baixa atividade da doença e até remissão, além do baixo custo. Atualmente ele é prescrito no início do tratamento, no entanto alguns pacientes não respondem clinicamente a intervenão, e em contrapartida outros apresentam efeitos colaterais pelo uso prologado (BURMESTER; POPE, 2017; FRIEDMAN; CRONSTEIN, 2019; JEKIC; MAKSIMOVIC; DAMNJANOVIC, 2019; SMOLEN et al., 2018). O uso de LNC como sistemas de entrega de drogas vem demonstrando eficácia com diversos fármacos, inclusive com MTX, aumentando a eficácia do medicamento e reduzindo os efeitos colaterais (BERNARDI et al., 2009; CHARÃO et al., 2015; FROZZA et al., 2010; YURGEL et al., 2014).

A AR por ser uma síndrome clínica caracterizada por inflamaão sinovial persistente, causa inchaço, ridez e dores nas juntas, o que com o tempo leva a deformidade articular irreversível tais como danos articulares, estreitamento do espaço articular e erosão óssea (CROIA et al., 2019; FIRESTEIN; MCINNES, 2017; SPARKS, 2019). No estudo foi

utilizado modelo de Artrite induzida por CFA, onde analisou-se a eficácia do tratamento em relação a inflamação local e aos danos estruturas na articulação.

Ao analisar a cinética da inflamação, os grupos tratados com MTX, MTX-LNC e LNC demonstraram redução no volume das patas, o grupo com MTX-LNC, suprimiu totalmente a inflamação a parte do vigésimo primeiro dia, o que corrobora com Boechat e colaboradores (2015a), que demonstrou os efeitos anti-inflamatórios de MTX-LNC em modelo in-vivo, com dose 75% menor que a formulação tradicional. A LNC por si só, apresenta atividade anti-inflamatória (REFERENCIA), e quando associada ao MTX, que é uma droga consolidada no tratamento da AR, apresentou uma redução significativa, nos levando a acreditar que a capacidade das LNCs se acumularem nos tecidos inflamados, potencializa o efeito do medicamento (BERNARDI et al., 2009; BOECHAT et al., 2015a; DREWES et al., 2016; FROZZA et al., 2010).

Nas articulações afetadas pela AR, a predominância de células sinoviais semelhantes a fibroblastos e semelhantes a macrófagos, acredita-se que os sinoviócitos semelhantes a macrófagos são responsáveis pela superprodução de citocinas pró-inflamatória, enquanto os sinoviócitos semelhantes a fibroblastos mostram comportamento anormais, tipo invasão a cartilagem e destruição articular (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). O crescimento anormal dessas células cria um microambiente inflamatório, onde ocorre interação entre linfócitos T e B, Fibroblastos do tipo sinovial, macrófagos, superprodução de TNF, aumento na produção de citocinas (tipo interleucina-6), quimiocinas e moléculas de adesão, promovendo surgimento de pannus sinovial em proliferação, danos à cartilagem e erosão óssea (OTERO; GOLDRING, 2007). Os autoanticorpos também contribuem para o processo inflamatório, agindo como mediadores da inflamação articular, ativando vias efetoras que podem afetar os condrócitos e a cartilagem, causando liberação de componentes da MEC (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

As estruturas da articulação metatarsfalangeana (MTF) do 5º dígito dos animais de todos os grupos foram analisadas e, os resultados confirmam o achado macroscópico anterior, demonstrando preservação do Espaço Articular, Membrana Sinovial e das

Cartilagens Articular e Calcificada. Os grupos MTX e LNC apresentaram resultados semelhantes, enquanto o grupo MTX-LNC apresentou diferença significativa ao comparar com os demais grupos (Controle com artrite, MTX e LNC). Novamente reforçando a atividade anti-inflamatória da nanopartícula sem o medicamento e, a potencialização ao conjugá-los (BERNARDI et al., 2009, 2013; BOECHAT et al., 2015a; FROZZA et al., 2010; YURGEL et al., 2014).

A cartilagem articular é um tecido formado por até 80% de água, desprovido de vasos sanguíneos, linfáticos e nervosos, povoado unicamente por células do tipo condrócitos, esse tecido conjuntivo recobre a superfície epifisária dos ossos articulares, e é dividida em duas fases. A fase sólida, composta por uma rede de fibras de colágeno (75%), em especial o tipo II, glicosamioglicanos (GAGs), proteoglicanos (20 a 30%) e uma pequena parte de glicoproteínas, e uma fase líquida, formada por água (80%) e eletrólitos (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^-), onde todos os componentes sólidos estão imersos, formando assim a matriz extracelular (MEC), responsáveis pela propriedade biomecânica da cartilagem (ARMIENTO et al., 2018).

A cartilagem é um tecido autor regenerativo limitado, caso danificado, sua capacidade de cura e reparo é severamente limitado (NIE et al., 2020). Em condições normais, os condrócitos, células presentes no tecido, são responsáveis por manter o equilíbrio entre a síntese e a quebra da MEC, mediante a produção de proteínas, fatores de crescimento, enzimas, seus inibidores e citocinas (FANG; ZHOU; NANDAKUMAR, 2020). Num processo degenerativo, ocorre o desequilíbrio homeostático do tecido, o que pode acarretar a liberação dos condrócitos, inibição do crescimento e ativação de genes pró-inflamatórios (CARBALLO et al., 2017). Na AR, os condrócitos atuam como células efetoras, expressando um perfil totalmente inflamatório. Aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinase de matriz, suprimindo a síntese da matriz e agravando a degradação da cartilagem, além do mais, o aumento da apoptose e redução na proliferação celular, o que impossibilita a regeneração tecidual (FENG; QIU, 2018; OTA et al., 2020; TSENG et al., 2020).

Ao investigar os condrócitos, percebeu-se a proteção gerada pelo MTX, os grupos tratados com MTX e LNC-MTX preservaram as células de forma relevante, mas ao comparar os resultados entre os dois grupos, o grupo MTX-LNC apresentou diferença significativa. A LNC apesar de exibir resultado positivos nos experimentos anteriores, não apresentou efeito algum na proteção dos condrócitos, demonstrando não ter efetividade na redução do dano radiológico, necessitando assim do MTX.

Por fim, o tratamento com MTX-LNC, exibiu os melhores resultados na prevenção dos danos causados pela artrite, protegendo a organização estrutural das juntas, o que pode ser um tratamento promissor para AR, levando a remissão da doença a longo prazo, redução dos efeitos colaterais e com baixo custo.

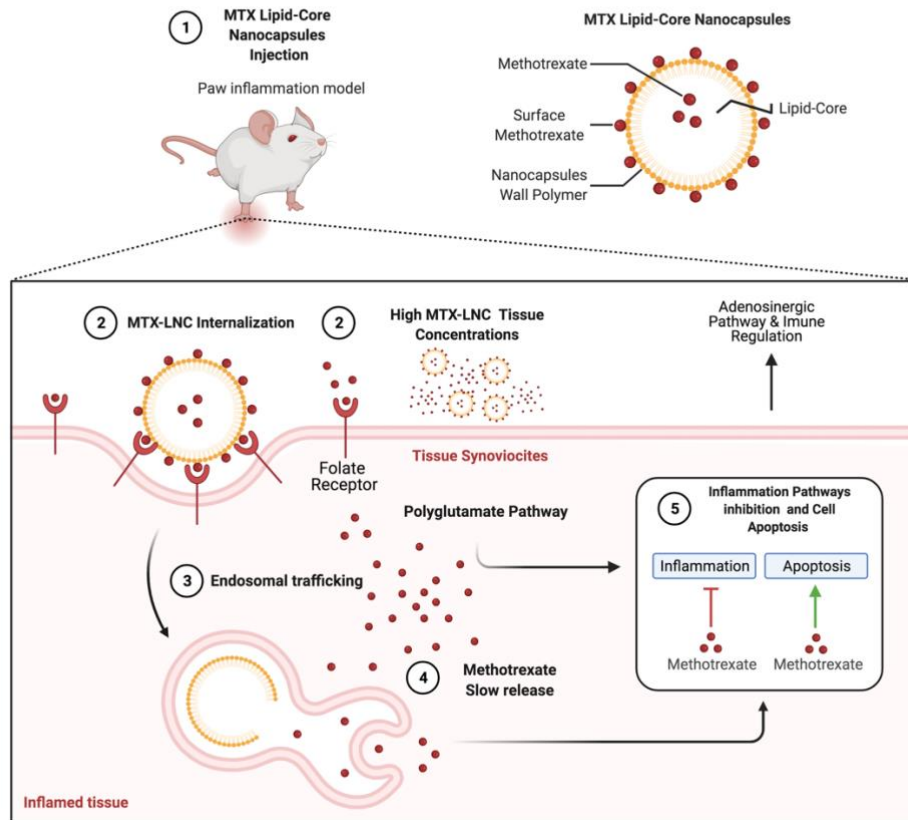
CONCLUSÃO

A formulação MTX-LNC foi altamente eficaz no controle da inflamação causada pela Artrite Experimental, reduzindo de forma significativa o volume das patas nos animais tratados com a formulação a parte do 21º dia Além disso, quando analisada as estruturas articulares, tais como Espaço Articular, Membrana sinovial, Cartilagem articular e Cartilagem Calcificada, todos demonstraram resultados positivos, reduzindo de forma expressiva os danos causados no modelo. A formulação MTX-LNC, também foi capaz de proteger os condrócitos nas cartilagens articular e calcificadas, células estas, reesposáveis pela formação da matriz das cartilagens. Estes dados mostram que o novo sistema de liberação controlada MTX-LNC apresenta propriedades promissoras no tratamento de doenças inflamatórias articulares.

SUPLEMENTO

Graphical Abstract

Methotrexate-Loaded Lipid Core Nanocapsules for Arthritis Reduction



REFERENCIAS

- ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in molecular medicine**, v. 19, n. 6, p. 355–367, jun. 2013.
- ARMIENTO, A. R. et al. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. **Acta Biomaterialia**, v. 65, p. 1–20, 1 jan. 2018.
- BADER. The Development of Targeted Drug Delivery Systems for Rheumatoid Arthritis Treatment.**
- BELLO, A. E. et al. Recommendations for optimizing methotrexate treatment for patients with rheumatoid arthritis. **Open Access Rheumatology: Research and Reviews**, v. 9, p. 67–79, 2017.
- 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, out. 2009.
- BERNARDI, A. et al. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 711–729, 2013.
- 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**, v. 10, p. 6603–6614, 22 out. 2015a.
- 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**, v. 10, p. 6603–6614, 22 out. 2015b.
- BURMESTER, G. R.; POPE, J. E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. **Lancet (London, England)**, v. 389, n. 10086, p. 2338–2348, 10 jun. 2017.
- CARBALLO, C. B. et al. Basic Science of Articular Cartilage. **Clinics in Sports Medicine**, v. 36, n. 3, p. 413–425, 1 jul. 2017.
- CHARÃO, M. F. et al. Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonary cell line. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 784–785, p. 1–9, jun. 2015.
- COLMAN, D. et al. Análise da redistribuição de calor com agentes inalatórios, em ratos submetidos a laparotomia e pneumoperitônio, através da termografia infravermelha. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, p. 307–315, jun. 2002.
- CONCEIÇÃO, C. S. DA et al. Análise das propriedades psicométricas do American

Orthopaedic Foot and Ankle Society Score (Aofas) em pacientes com artrite reumatoide: aplicação do modelo Rasch. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 1, p. 8–13, fev. 2016.

CROIA, C. et al. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 37, n. 3, p. 347–357, jun. 2019.

DREWES, C. C. et al. Novel therapeutic mechanisms determine the effectiveness of lipid-core nanocapsules on melanoma models. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1261–1279, 31 mar. 2016.

EDEN, W. VAN; WAGENAAR-HILBERS, J. P. A.; WAUBEN, M. H. M. Adjuvant Arthritis in the Rat. **Current Protocols in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 15.4.1-15.4.8, 1996.
FANG, Q.; ZHOU, C.; NANDAKUMAR, K. S. **Molecular and Cellular Pathways Contributing to Joint Damage in Rheumatoid Arthritis**. Review Article.

FENG, F.-B.; QIU, H.-Y. Effects of Artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 102, p. 1209–1220, jun. 2018.

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.

FILIPPIN, L. I. et al. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. 2008.

FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 183–196, 21 fev. 2017.

FRIEDMAN, B.; CRONSTEIN, B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 86, n. 3, p. 301–307, maio 2019.

FROZZA, R. L. et al. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 6, p. 694–703, dez. 2010.

GOES, P.; COELHO, A. C.; OLIVEIRA, C. C. Efeito da raspagem e alisamento radicular em pacientes com artrite reumatóide– revisão da literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, v. 24, n. 1, p. 33–40, 31 jul. 2014.

GUPTA, V. et al. CD39 positive regulatory T cell frequency as a biomarker of treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1548–1556, ago. 2018.

JEKIC, B.; MAKSIMOVIC, N.; DAMNJANOVIC, T. Methotrexate pharmacogenetics in the

treatment of rheumatoid arthritis. **Pharmacogenomics**, v. 20, n. 17, p. 1235–1245, nov. 2019.

KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. **Journal of Structural Biology**, v. 116, n. 1, p. 71–76, fev. 1996.

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.

NIE, X. et al. Decellularized tissue engineered hyaline cartilage graft for articular cartilage repair. **Biomaterials**, v. 235, p. 119821, 1 mar. 2020.

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. 2012.

OTA, M. et al. Role of Chondrocytes in the Development of Rheumatoid Arthritis Via Transmembrane Protein 147-Mediated NF- κ B Activation. **Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)**, v. 72, n. 6, p. 931–942, jun. 2020.

OTERO, M.; GOLDRING, M. B. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 5, p. 220, 2007.

PEARSON, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 91, n. 1, p. 95–101, jan. 1956.

PERES, R. S. et al. Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 8, p. 2509–2514, 24 fev. 2015.

PERES, R. S. et al. TGF- β signalling defect is linked to low CD39 expression on regulatory T cells and methotrexate resistance in rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 90, p. 49–58, 1 jun. 2018.

POLETTI, 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.

POPE, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 527–535, jul. 2002.

ROGERS, H. L. et al. Sintomas depressivos e de ansiedade e apoio social estão associados de modo independente à qualidade de vida específica da doença em

pacientes colombianos com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 5, p. 406–413, out. 2015.

ROMÃO, V. C.; CANHÃO, H.; FONSECA, J. E. Old drugs, old problems: where do we stand in prediction of rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and other synthetic DMARDs? **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 17, 23 jan. 2013.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 25 set. 2010.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 3, p. 492–509, mar. 2014.

SMOLEN, J. S. et al. Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 4, p. 18001, 8 fev. 2018.

SPARKS, J. A. Rheumatoid Arthritis. **Annals of Internal Medicine**, v. 170, n. 1, p. ITC1–ITC16, 1 jan. 2019.

TSENG, C.-C. et al. Dual Role of Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis: The Chicken and the Egg. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 6 fev. 2020.

URMAN, A. et al. Inflammation beyond the Joints: Rheumatoid Arthritis and Cardiovascular Disease. **SciFed journal of cardiology**, v. 2, n. 3, 2018.

VAN EDEN, W.; WAGENAAR-HILBERS, J. P.; WAUBEN, M. H. Adjuvant arthritis in the rat. **Current Protocols in Immunology**, v. Chapter 15, p. Unit 15.4, maio 2001.

WHITEHOUSE, M. W. Adjuvant arthritis 50 years on: The impact of the 1956 article by C. M. Pearson, “Development of arthritis, periartthritis and periostitis in rats given adjuvants”. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]**, v. 56, n. 4, p. 133–138, abr. 2007.

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.

YAP, H.-Y. et al. Pathogenic Role of Immune Cells in Rheumatoid Arthritis: Implications in Clinical Treatment and Biomarker Development. **Cells**, v. 7, n. 10, out. 2018.

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.

CAPÍTULO 3

Macrophages Apoptosis induced by Methotrexate-Loaded Lipid-Core Nanocapsules

Aguyda Rayany Calvante Barbosa¹; Rosmery Duran Ubiera¹; Kelly Cristine Zatta²; Valdinete Alves do Nascimento³; Felipe Gomes Naveca³, Silvia Staniscuaski Guterres², Adriana Raffin Pohlmann², Pritsh Jaychand Lalwani¹, Antonio Luiz Boechat¹

¹Laboratorio de Imunologia e Doenças Infecciosas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil.

² Programa de Pós-graduação em ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

³Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz, Manaus , Brazil

⁴ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto alegre, Brazil

Corresponding Authors:

Antonio Luiz Boechat, MD, PhD, alboechat@ufam.edu.br

Adriana Raffin Pohlmann, PhD, adriana.pohlmann@ufrgs.br

Abstract – Methotrexate is a mainstay Rheumatoid Arthritis (RA) disease-modifying drug (DMARD). Synovial cells at inflamed synovial membrane are an important targets for anti-rheumatic drugs to induce immune regulation or synoviocytes apoptosis. The aim of this work was to evaluate the apoptosis induced effect by new nanoencapsulated system called methotrexate loaded lipid core nanocapsules (MTX-LNC). *Methods* – Methotrexate loaded Lipid-Core Nanocapsules (MTX-LNC and LNC) formulations were obtained by self assembled methodology. THP1 and J774 cells cultured and treated with both formulations. Intracellular ROS, mitochondrial potential membrane, caspase 2, 3, 8 and 9 activity were assessed. Annexin V+ cells were evaluated by flow cytometry. In addition, gene expression profile for THP-1 cells treated with MTX and MTX-LNC were also assessed. *Results* – LNC formulations were obtained as blank LNC (D_{4,3} 245/152) and for methotrexate (MTX-LNC D_{4,3} 264/313). The MTX-LNC induces more iROS and a lower mitochondrial potential membrane for both cells compared to MTX (P<0.0001). The THP-1 Doxorubicin treated cells showed more DNA damage than MTX and MTX-LNC (). MTX-LNC induces more activation of caspase-8 (p=0.002), 3 (p<0.0001) and Annexin V+ (p<0.0001) than MTX. Gene expression analysis of 84 apoptosis related genes showed that MTX-LNC upregulates *TNFRSF25* gene (fold change 84.29) over MTX formulation, and other genes of the extrinsic pathway (*FASLG*, *TRADD*, *CRADD*) and pro-apoptotic genes (*BAD*, *BCL2L10*) are also upregulated, suggesting extrinsic apoptosis pathway activation. *Conclusions* - We show that the incorporation of methotrexate in lipid core Nanocapsules improves the apoptotic effects of this drug in THP1 and J774 macrophages, by improving the activation of apoptosis effector caspases, increasing the DNA damage and up-regulating pro-apoptotic genes of the extrinsic pathway.

Key Words: Methotrexate, Apoptosis, Rheumatoid Arthritis, Macrophages.

1. Introduction

Methotrexate is a Rheumatoid Arthritis (RA) disease-modifying drug (DMARD) used as a monotherapy or combined with other DMARDs or biologic agents. Methotrexate is used also in the treatment of Leukemia, Psoriatic Arthritis, and other diseases with optimal results^{1,2}, the goal in RA treatment is the remission or the stop of the disease progression. One of the most abundant cells in the synovial space of RA patients are macrophages which are also responsible for modifications like bone erosion. The control of the proliferation, as well as the induction of apoptosis of synovial macrophages, can cease the inflammation and stop the disease progression^{3,4}.

The Inflammatory response is mediated by multiple cells and secreted molecules, including pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6 and chemokines. The inflammation is the result of the activation of different mechanisms in the effort to deal with stress and restore homeostasis, but in some diseases, these mechanisms could be wrongly activated due to environmental or genetic factors, and instead of a help to deal with the stress, generate it^{5,6}. The inflammatory response is mediated primarily by immune cells and one of the main cells in maintaining the response and also resolving the resulting tissue damage are macrophages.

Macrophages are important cells of innate immunity, pro-inflammatory M1 macrophages and anti-inflammatory M2 macrophages are the most common variants, despite the relevance of other subtypes like Tumor-Associated Macrophages (TAM). These cells are present in the inflamed synovial space of RA patients and are widely spread in the synovial membrane since embryonic life, a membrane that is disrupted in experimental models of RA to mimic the findings in RA patients. Macrophages are the main cells secreting TNF- α in the inflamed synovial space and rapidly becomes fibroblasts, they are also responsible for some of the pathologic lesions of the disease⁷. The apoptosis of synovial macrophages can contribute to the active process of remission in Rheumatoid Arthritis and is a reachable goal for some of the available therapies like Methotrexate. Apoptosis is a conservative process that depends on the activation of cysteine aspartic proteases, known as caspases [initiators caspases (8 and 9) and executioners caspases (3, 6 and 7)]^{8,9}.

The mechanism of action of methotrexate is not completely clear, it is known that can inhibit the progression of the cell cycle in the S phase and interfere with purine and pyrimidine bases formation leading to apoptosis of T cells by interfering with folic acid metabolism result of the dihydrofolate reductase inhibition and also interact with the adenosinergic pathway^{10,11}. Methotrexate as RA therapy has a proven efficacy but the bio-availability of this drug after administration depends on phase 1 metabolism, something that can be improved with the implementation of new drug delivery systems based on nanotechnology¹⁰. The nano-encapsulated and microencapsulated formulations provide better absorption of the drugs and also potentiate the drug effects^{12,13}.

Methotrexate is associated with cellular apoptosis in RA, and different hypotheses are available to explain this phenomenon, recent research using nano-encapsulated formulations of methotrexate in experimental models of RA and in vitro using U937 monocytic cells showed increased FOXO gene members at transcript levels, which correlated with increase expression at protein levels of BIM, a proapoptotic molecule, member of Bcl2 family, transcriptionally regulated by FOXO¹⁴. Here we demonstrate that in fact, Methotrexate nano-encapsulated formulations can increase the apoptosis in synovial macrophages using human and murine macrophages (THP1 and J774) according to the apoptotic caspases activity, DNA damage index, among other relevant parameters.

2. Materials and Methods

2.1. Lipid-Core Nanocapsules (LNC) Preparation

The Nanocapsules were elaborated by precipitating a pre-formed polymer described in table 2 and then evaporating it at reduced pressure to the final volume. The drug quantification was performed as a quality control¹⁵

Table 1. Composition of the Lipid Core Nanocapsules

Raw Material	LNC	MTX-LNC
Poly (□) caprolactone	0,100g	0,100g
Sorbitan monostearate	0,038g	0,038g
Capric and caprylic acid triglycerides	0,160g	0,160g
Methotrexate	-----	0,0025g
Acetone	27mL	27MI

Polysorbate 80	0,077g	0,077g
Ultrapure water	53mL	53MI
Final volume after evaporation	10mL	10MI

The determination of the size and distribution of the particles was performed using the laser diffraction technique (based on the light spreading theory). To determine the amount of Methotrexate contained in each Nano capsule was used the high-efficiency liquid Chromatography¹⁵.

2.2. Macrophages cell lines

2.2.1. Lineage J774

The cells were cultured in a humid atmosphere, at 37°C, containing 5% of CO₂, in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco[®], Life Technologies, EUA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco[®], Life Technologies, EUA), L-glutamine 2mM, penicillin/ streptomycin 1% (Gibco[®], Life Technologies, EUA). The cells were plaque in 96 wells plate, at 100.000 cells/ well, and incubated for 2 hours to adhere.

2.2.2. THP-1 Lineage

THP-1 human monocytes were cultured in a humid atmosphere, containing 5% of CO₂, in RPMI 1640 (Gibco[®], Life Technologies, EUA) medium, supplemented with Bovine Fetal Serum 10% (Gibco[®], Life Technologies, EUA), L-glutamine 2mM and penicillin/ streptomycin 1% (Gibco[®], Life Technologies, EUA). To induce cell differentiation into adherent macrophages, cells were resuspended in a fresh medium, containing 200ng/ml of phorbol 12- myristate-13 acetate 9 (PMA). The cells were plated in 24,48 and 96 wells plaques at 1,000,000, 300,000, and 100,000 cells/ well respectively and incubated for 48 hours. Macrophages were washed with fresh medium and rest for 2 days, with daily medium replacement.

2.3. Cytotoxicity Test (MTT)

The MTT method {[3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide} (Sigma, Brasil) is based on the reduction of a yellow substrate, the tetrazolium salt MTT, by mitochondrial enzymes, resulting in formazan crystals, which absorbance is determined by spectrophotometry. THP-1 and J774 cells were treated with 10, 100, 1000, and 5000nM of MTX and MTX-LNC for 24 and 48 hours. The controls were not treated, treated with 0,1% of Dimethylsulfoxide (DMSO) or Nanocapsules discharged with the drug. After the treatment period, the cells were washed twice with 100 μ L of Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X, and cells were resuspended in 90 μ L of RPMI or DMEM and 10 μ L of MTT (5mg/mL) /well. The cells were incubated for 3 hours and then the solution was removed. For the complete dissolution of formazan Crystals, was added 100 μ L of DMSO, and the plate was left for 20 minutes under stirring^{16,17}.

The reading was performed in an ELISA reader, with an absorbance of 560nm, proportional to live cells. The cell viability was determined with the equation: Cell viability in% = (Abs_{sample} x 100 / Abs_{controle}), where Abs_{sample} is the absorbance of the cells treated with the studied formulations and Abs_{controle} is the absorbance of the control cells (cells with medium only).

2.4. Reactive Oxygen Species (ROS) Detection

The intracellular production of ROS (iROS) was detected using the fluorescent probe 2'7'-Dichlorofluorescein acetate (DCFDA, Sigma, Brazil). After treating THP-1 and J774 cells with MTX and MTX-LNC in the concentrations of 100 and 200nM for 24 and 48 hours respectively, the DCFDA (25 μ M) was added to the cultures for 45 minutes, at 37°C with 5% of CO₂, without light exposition^{18,19}.

The DCFDA diffuses through the cellular membrane and is hydrolyzed by intracellular esterases, forming dichlorofluorescein (DCF, non-fluorescent), which reacts with the intracellular H₂O₂, resulting in an oxidated dichlorofluorescein (ox DCF, fluorescent). The plates were scraped, and the fluorescence levels were measured in a Chameleon™ V Multitechnology Plate Reader, 450nm and 535nm emission.

2.5. Electrical Potential of Mitochondrial Membrane ($\Delta\Psi_m$) Determination

The 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6 (3)) (Sigma, Brazil) is a lipophilic dye, used to determine the mitochondrial and cytoplasmic membranes potential resulted from the difference in ions concentrations between internal and external space. The J774 and THP-1 cells were treated with MTX and MTX-LNC in concentrations of 100 and 200nM (24 and 48 hours) and incubated with DiOC6 (2 μ M) inside the stove for 12 minutes. The cells were retired from the plaque and washed 3x with 100 μ L of PBS 1X, the fluorescence was measured with Chameleon™ V Multi-technology Plate Reader, 450nM emission, and 500nM excitation²⁰.

2.6. DNA Damage Detection Assay (Alkaline comet)

For the DNA damage assay, THP-1 monocytes were differentiated into macrophages and the assay was performed according to SINGH et al., (1988) with some modifications. The macrophages were treated with MTX, MTX-LNC, medium (negative control), and Doxorubicin 63 μ M (positive control), cells were plated in 48 wells plates, at a density of 300.000 cells/well during 48 hours. When retired from the plaques, the cells were centrifuged and resuspended in low melting point agarose (LMP) and then placed in normal melting point agarose pre-coated sheets. The sheets were placed in a lysis solution for 1 hour and transferred to the horizontal electrophoresis chamber containing electrophoresis solution (alkaline comet) for DNA release (20 minutes, 20V, an electric stream of 300 mA)^{21,22}.

After the reading, the sheets were placed in a neutralizing solution for 15 minutes and fixed with ethanol 100%. Three sheets were prepared for each group containing 50 cells/sheet and were analyzed in the fluorescence microscopy containing Syber Green 40 μ L. The analysis was performed with a score pattern (0 to 4) according to the comet tail size, which represents the grade of DNA lesion³².

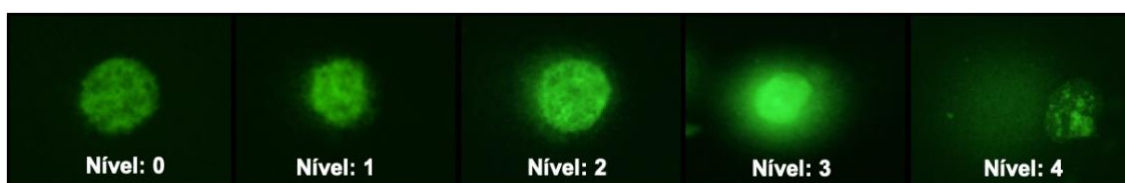


Figure 1: Comet classification according to DNA damage grades

2.7. Caspase 2, 8 and 9 activity

The Caspase-Glo® 2, 8, and 9 Assay, are homogenous luminescent assays that measure specific caspase activity (Promega). The kits provide a luminescent substrate for each caspase (VDVAD – Cap-2, LETD – Cap-8 e LEHD – Cap-9), and a buffer containing lysis and a Proteasome inhibitor reagent. The tests were performed according to the manufacturer's recommendations and the luminescence was read using Chameleon™ V Multi-technology Plate Reader.

2.8. Caspase 3 activity

Caspase 3 activity in cells treated with the different formulations was assessed by using the active Caspase apoptosis kit (BD Bioscience), which uses anti-active caspase 3 antibodies. The assay was performed according to the manufacturer's instructions and cells were further fixed and stained for flow cytometry analysis, using *FACSCanto™ II* (BD Bioscience) and later analyzed with the software FlowJo 8.7.

2.9. Effect of Nano Formulations on Cell Labeled with Annexin V

The apoptosis in the cells treated with the nano-formulations was determined using annexin V dye (DB Pharmingen™), a widely utilized stain in this field. Annexin V has an affinity to the membrane phospholipid phosphatidylserine, which is found in the internal face of the cell membrane, which is exposed only during the initial phase of apoptosis.

The activated THP-1 were cultured in a 24 wells plaque, in a density of 1×10^6 cells/wells, utilizing Staurosporine (Stau) 5 μ M (Sigma, Brazil) (positive control), the different formulations (Concentrations of 75 μ M and 150 μ M) and medium (Negative control) as the stimulus for 48 hours. The cells were further fixed (paraformaldehyde 2%) and stained for flow cytometry analysis. Cells were analyzed with FACS Calibur (BD Bioscience) from Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Manaus/AM and later analyzed with the software FlowJo 8.7.

2.10. In vitro induced Apoptosis signaling pathways

Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen) from the-1 cells exposed to MTX and LCN-MTX for 48 hours after stabilized with the help of RNAlater (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The complementary DNA(cDNA) was synthesized using the RT2 First Strand Kit PAHS-012Z (Qiagen) to obtain the transcriptome and cDNA database for genes related to apoptosis. The real-time PCR was performed in a Thermal Cycler ABI 7300, utilizing RT2 PCR plaques (Qiagen) for the expression of 84 genes associated with cell death. Housekeeping genes and the foldchange were used to stabilize the ct values of the genes and the fold regulation was measured using the method ΔCt ($2^{-\Delta Ct}$). The genes with foldchange over 2 were considered significant. A scatterplot and a HeatMap (R Statistical Software) with hierarchical clustering were performed. The gene profile can be found in table 4, Supplementary Material.

The genes signaling interaction network was built using the virtual platform Gene Mania, the genes upregulated to 10x or more in an automatized algorithm (Automatically Selected Weighting Method) for human species were used to set up the platform. As a base for modeling the signaling pathways was used the pattern Consolidated Pathways 2013.

2.11. Statistic Analysis

Data was described as a median and standard deviation. The inhibitory concentration of 50% for each of the formulations was assessed using non-linear regression, utilizing the D'Agostino & Pearson t-test to normalize the curves. The F test with Akaike (AIC) criteria was used to analyze the IC50% of 2 formulations simultaneously. The data from experiments with three or more groups were analyzed using one-way ANOVA with the Tukey test corrected to Bonferroni or the two-stage step-up method of Benjamine-Krieger-Yekutielle for false discovery rate. The data were analyzed with PRISM 6.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, USA).

3. Results

3.1. Lipid Core Nanocapsules Characterization

The LCN and MTX-LNC formulations have a milky liquid aspect with a Diameter $D_{4,3}$ (nm) expressed in Table 2 and figure 2.

Table 2. Average Diameter of the volume formulations

Formulations	Diameter $D_{4,3}$ (nm)
LNC	245/152
MTX-LNC	264/313

3.2. Drugs Dosage

To confirm the amount of Methotrexate contained in the formulation, the Nanocapsules were filtered and analyzed via CLAE, according to the method described by OLIVEIRA et al, 2013. The results are presented in Table 4. A calibration curve was constructed, with a mother solution of MTX (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluted in DMSO, the subsequent dilutions were with a mix of acetonitrile/tetrahydrofuran (4:6, v/v) (B. V. 5mL), which stay linear in the range of 2.5-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2=0.99$).

3.3. J774 and MØTHP-1 Macrophages viability is compromised when treated with LCN-MTX Nanocapsules.

Cells from both lineages (J774 e MØTHP-1), treated with the 4 concentrations (10, 100, 1000, and 5000nM) of the formulations specified in the methodology, in 2 different times (24 e 48 hours) were submitted to MTT assay to determine the percentage of metabolic active cells and the inhibitory concentration 50% ($\text{IC}_{50\%}$). The MTX-LNC was toxic for both cell lineages in all the study times while the MTX formulation only for J774 cells with 48 hours of stimulation (Figure 3C and D).

The $\text{IC}_{50\%}$ values for MTX and MTX-LNC in the time of 24 hours were respectively 17,188nM ($r^2=0.47$) and 175.2nM ($r^2=0.98$) for J774 and 11,290nM ($r^2=0.40$) and 679.4nM ($r^2=0,79$) for MØTHP-1. After 48 hours of stimulus 878.3nM ($r^2=0.72$) and

5.16nM ($r^2=-1.22$) for J774 and 17.365nM ($r^2=0.40$) and 194.2nM ($r^2=0.86$) for MØTHP-1 (Figure 3D).

The obtained values of IC_{50%} for MTX and LCN-MTX in 24 hours were respectively as follow: 17.188nM ($r^2=0.47$) and 175.2nM ($r^2=0.98$) for J774 (Figure 3A) and 11,290nM ($r^2=0.40$) and 679.4nM ($r^2=0.79$) in MØTHP-1 (Figure 3 B). In 48 hours were: 878.3nM ($r^2=0.72$) and 5.16nM ($r^2=-1.22$) for J774 (Figure 2C) and 17,365nM ($r^2=0.40$) and 194.2nM ($r^2=0.86$) in MØTHP-1 (Figure 3 D). Based on the obtained results, the concentrations and times defined for subsequent experiments were: 200nM during 24 hours in J774 and 200nM for 48 hours in MØTHP-1.

3.4. MTX-LNC Nanocapsules increase iROS Production in J774 and MØTHP-1 Macrophages.

The cells from the two different cell lineages were treated with the aforementioned formulations. In the case of J774 cells the treatment with MTX (73.21±1.17 95% CI 71.34 – 75.07) and MTX-LNC (90.81±4.63 95% CI 83.44 – 98.18) result in an increased percent of ROS production when compared to Staurosporin (16.43±4.70 95% CI 8.95 – 23.91) with statistic difference between the groups ($p<0.0001$) (Figure 4A). The J774 cells resulted more sensible to LNC and MTX-LNC preparations compared to THP-1 cells, showing a higher increment in the iROS (Figure 4A and B). The MTX-LNC increases iROS compared to MTX ($p=0.021$) and LNC (52.67±16.53 95% CI 26.37 – 78.96) for J774 cells ($p<0.0001$) (Figure 4A). In the case of MØTHP-1 the MTX-LNC (52.67±16.53 95% CI 26.37 – 78.96) formulation induced more iROS than MTX (52.67±16.53 95% CI 26.37 – 78.96; $p<0.0001$) and Staurosporin (3.52±2.47, 95% CI 0.42 – 7.54, $p<0.0001$). The MTX-LNC also presented a greater ROS induction than LNC (29.37±2.80, 95% CI 24.92 – 33.81, $p=0.0007$) (Figure 4B). It should be remembered that we use an MTX concentration lower than IC_{50%} for both J774 and THP-1 cells.

3.5. MTX-LNC increase the Mitochondrial Membrane Electrical Potential ($\Delta\Psi_m$) in MØTHP-1 Macrophages.

Mitochondrial Membrane Electrical Potential ($\Delta\Psi_m$) was determined through the DiOC₆ dye-binding capacity to the mitochondrial membrane, the loss of the electric potential

result in lower fluorescence. Both of the cell lineages used in this study were sensible to LNC and MTX-LNC preparations to decrease in the $\Delta\Psi_m$ (Figure 5). The average of $\Delta\Psi_m$ was lower for MTX-LNC (-16.08 ± 5.57 , 95% CI $-24.89 - -7.16$) in J774 cell lines, but only a statistical trend for an association was observed compared to LNC (-14.85 ± 1.64 , 95% CI $-16.70 - -13.00$, $p=0.097$). Additionally, in THP-1 cell lines there was a significant difference between MTX-LNC (-16.08 ± 5.57 , 95% CI $-24.89 - -7.16$) and MTX (4.26 ± 0.88 , 95% CI $2.84 - 5.67$) treated cells when compared for the same concentrations of 200nM ($p<0,0001$). Additionally, there was also a significant difference between the MTX-LNC and LNC treatment (-1.74 ± 0.96 , 95% CI $-3.26 - -0.21$) in MØTHP-1 ($p=0.003$) (Figure 5A and B).

3.6. MTX-LNC induces more DNA Damage than MTX in MØTHP-1 Macrophages.

The Comet test was applied to determine the genotoxicity of the formulations in MØTHP-1. Through this assay, was determined the DNA damage in single cells, quantifying the damage in single and double strands. For this experiment the concentrations of 100nM and 200nM were used as comparators for DNA damage level. The MTX-LNC formulation was more efficient in inducing DNA damage than MTX in the concentration of 100nM (40.67 ± 6.43 , 70.67 ± 3.79 ; $p=0.0014$), but both of them were efficient in inducing DNA damage when compared to control(-) (13.67 ± 1.53), MTX 100nM (40.67 ± 6.43 ; $p=0.0039$), 200nM (43.83 ± 8.78 ; $p=0.0013$) and MTX-LNC 100nM (70.67 ± 3.79 ; $p=<0.0001$), 200nM (49.67 ± 8.74 ; $p=0.0002$) (Figure 6 A). As far a DNA damage frequency is concern was observe a damage level 1 frequency for MTX, a level 2 for MTX-LNC and level 4 for the positive control Doxorubicin (Figure 6 B).

3.7. MTX-LNC induced a greater Caspase 8 activity than MTX in MØTHP-1 but caspase 2 and 9 activity was similar

As way to determine whether the intrinsic or extrinsic apoptosis pathways is mainly activated by MTX-LNC, the caspase 2, 8, and 9 activity was determined. The MØTHP-1 cells were treated with the different formulations as described in the methodology. The caspase 8 activity was greater in cells treated with MTX-LNC ($9,122\pm 791$ 95% CI $7,8631 - 10,381$) than in treated with MTX ($8,000\pm 363.7$ 95% CI $7,421 - 8,579$), $p=0.0024$. For the caspase 2 activity there was not any difference between the groups MTX

(2,784±200.6 95% CI 2,464 – 3,103) vs MTX-LNC (2,961±189.6 95% CI 2,660 – 3,263, $p=0.8974$) as well as for caspase 9 MTX (2,169±299.0 95% CI 2,222 – 3,017) vs MTX-LNC (2,961±189.6 95% CI 2,660 – 3,263, $p = 0.554$) (Figure 7). These findings suggest that the apoptosis extrinsic pathway is mainly activated in MTX-LNC induced apoptosis.

3.8. MTX-LNC induced a greater Caspase 3 activity and Annexin V+ cells than MTX in MØTHP-1

Flow cytometry helped to determine the number of MØTHP-1 cells with active caspase in the presence of both formulations. The cellular population of interest was selected according to their morphologic characteristics and the efficacy of the controls was analyzed by the peak's displacement (Figure 8A and B). The active caspase-3 percentage was greater in cells treated with MTX-LNC in the studied concentration when compared with MTX (16,03±1.67 95% CI 13.37 – 18.68; 4.31±1.06 95% CI 2.62 – 5.99, respectively), $p<0.0001$. The MTX-LNC treated cells were statistically different from LNC (9.43±1.31 95% CI 7.36 – 11.54), $p<0.0001$ (Figure 8C). Additionally, the annexin V+ cells was higher in MTX-LNC cells (26.03±0.74 95% CI 24.86 – 27.21) than in MTX (14.28±0.92 95% CI 12.87 – 15.74), $p<0.0001$. The MTX-LNC induces more annexin V+ cells than LNC (16.80±0.54 95% CI 15.94 – 17.66) formulations, $p<0.0001$ (Figure 8D). These data provide additional information showing the downstream activation of apoptosis pathway after initiation by caspase-8 and the executioner caspase-3 activation

3.10. Analysis of Apoptosis Transcriptome and Signaling Pathways

The PCR array transcriptome results were normalized for housekeeping genes and then analyzed and the results are expressed as foldchange, considering up-regulated the genes with a foldchange over 2. In Figure 9 is shown a scatterplot graph comparing the normalized expression of each one of the genes from both of the selected groups (MTX-LNC vs MTX) to visualize widely the gene's expression. The gene *TNFRSF25* belonging to the extrinsic pathway of apoptosis is more upregulated (foldchange 84.29).

A total of 68 (80%) genes are upregulated in the cells treated with MTX-LNC when compared to the cells treated with MTX, 45 (53%) genes are 2-10x more expressed, 7 (8.3%) 10-20x are more expressed, 16 (19.1%) genes are 20x more expressed (*Casp14*,

CIDEA, *CYCS*, *FASLG*, *IGF1R*, *IL-10*, *LTA*, *TNFRSF11B*, *TNFRSF25* and *TNFRSF9*). Other genes of the extrinsic pathway (*FASLG*, *TRADD*, *CRADD*) and pro-apoptotic genes (*BAD*, *BCL2L10*) are also upregulated. The complete list of the upregulated genes is in Figure 10A, Table 3 (Supplementary Material).

The genes *BAD*, *BAG1*, *BCL2L10*, *CASP6*, *CD27*, *CD40LG*, and *NAIP* present a foldchange greater than 10X, and *NOD1*, *NOL3*, *TNFSF8*, *TPS3*, and *TRAF2*, present a foldchange over 20x (Figure 16A). In Figure 10B are exhibited the genes more expressed in cells treated with MTX-LNC compared to MTX. The other heat map with none supervised clusterization of the genes with greater expression is found in Figure 10C.

The genes with a fold change greater than 10x were used to set up the genetic interaction and signaling pathways network (Figure 11). An automatized algorithm from the platform Gene Mania established the weight of each gene expressed and identified the signaling pathways involved for the human species. The PCR array transcriptome results suggest that the upregulation of the cellular receptor *TNFRSF25* (DR3) can induce the dimerization and activation of the caspase 8 through the activation of *TRADD*, representing the major mechanism to explain the effects of MTX-LNC induced apoptosis in MØTHP-1.

4. Discussion

New drug delivery systems are the new era in treatment, these formulations can achieve easily the target tissues and their administration results in a better prognosis for many diseases. The intravenous administration used by nano-encapsulated formulations is a fast administration way, with multiple benefits like the avoidance of phase 1 metabolism^{5,23,24}. Drugs widely used like methotrexate have been incorporated into these delivery systems with excellent results, proving improvement in cytokines profile, leucocytes infiltration, and clinical disease evolution in experimental models of RA^{15,25,26}. We showed in this work that extrinsic pathway is linked in apoptosis in THP1 cells, and that is induced by both MTX-LNC and LNC formulations, possible triggered by iROS concentration and DR3 downstream pathway activation, and these effects are mainly induced by MTX-LNC formulation than LNC alone.

Methotrexate is the most common treatment for Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and other inflammatory conditions, which is used as monotherapy or combined with other DMARDs, besides its variable bioavailability after administration, the effects of the treatment with Methotrexate in RA are observed 3-6 weeks after treatment initiation. The new nano-encapsulated formulations and other lipid-based drug delivery systems have proved to reduce the time for an effective response, the bio-availability, and also the side effects which include mucosal ulceration, nausea, liver cirrhosis, and acute pneumonia-like syndrome with the chronic use of methotrexate^{1,10,14,27}. Methotrexate is used in rheumatic and non-rheumatic diseases treatment, is an antifolic agent and folic acid is essential for cell replication, this drug interferes directly with the progression of the cell cycle, leading to cell death²⁸.

Apoptosis is a silent programmed cell death, in which the cell ceases of growing and dividing, resulting in the formation of apoptotic vesicles which are further phagocytosed^{8,29}. This process is initiated by cysteine aspartic proteases, known as caspases 8 and 9, and then executed by effector caspases 3, 6, and 7. In Rheumatoid Arthritis the apoptosis of synovial cells, especially macrophages results in a reduction of the synovial edema and slowing down in the progression of the disease, this is an ambitious target for many anti-rheumatic drugs, achieved by others that like methotrexate directly interfere with cells dividing and growing³⁰. However, Lipid-core Nanocapsules themselves are capable to induce cell death but Lipid core Nanocapsules containing methotrexate exacerbate this quality³¹. Recent researches showed that methotrexate Lipid core Nanocapsules increase the expression of pro-apoptotic genes like those belonging to the FOXO family, and here is shown that also increases the activity of initiators caspase 8 and effector caspase 3 which is greater than the Methotrexate formulation¹⁴.

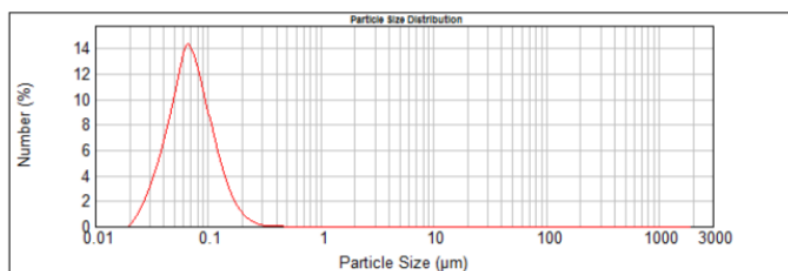
This research shows that the lipid core nano-encapsulated methotrexate is toxic for J774 and THP-1 macrophages and induces level 2 DNA damage. The aforementioned is favorable for the cessation of inflammation since macrophages are key cells of the Rheumatoid Arthritis pathogenesis. Macrophages that participate in bone erosion and pannus formation, are abundant cells in synovial fluid and membrane.

5. Conclusions

In this study, we show that Methotrexate lipid core Nanocapsules are more effective than Methotrexate upregulating genes belonging to different proapoptotic pathways. The Lipid-Core Nanocapsules provide to Methotrexate greater results decreasing also the resistance to the drug, which is related in some cases to the variable amount of drug that reaches the cell's cytoplasm. In conclusion, Lipid Core Nanocapsules are more effective than Methotrexate in the activation of the proapoptotic pathway in Murine and human macrophages, which could lead to the obtention of greater results in the management of Rheumatoid Arthritis (Figure 12).

Figures

(a) LNC Branca



(b) LNC-MTX

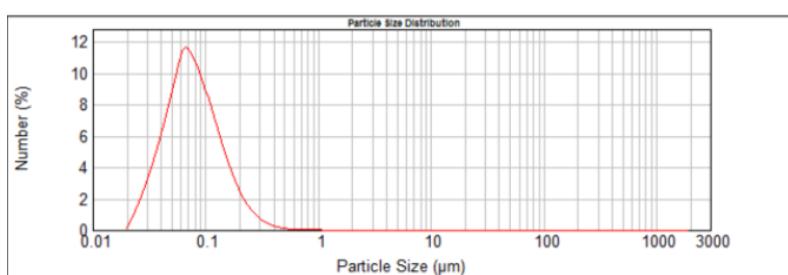


Figure 2. LNC Characterization. Particle size analysis by photons correlation spectroscopy. A) LNC; B) MTX-LNC

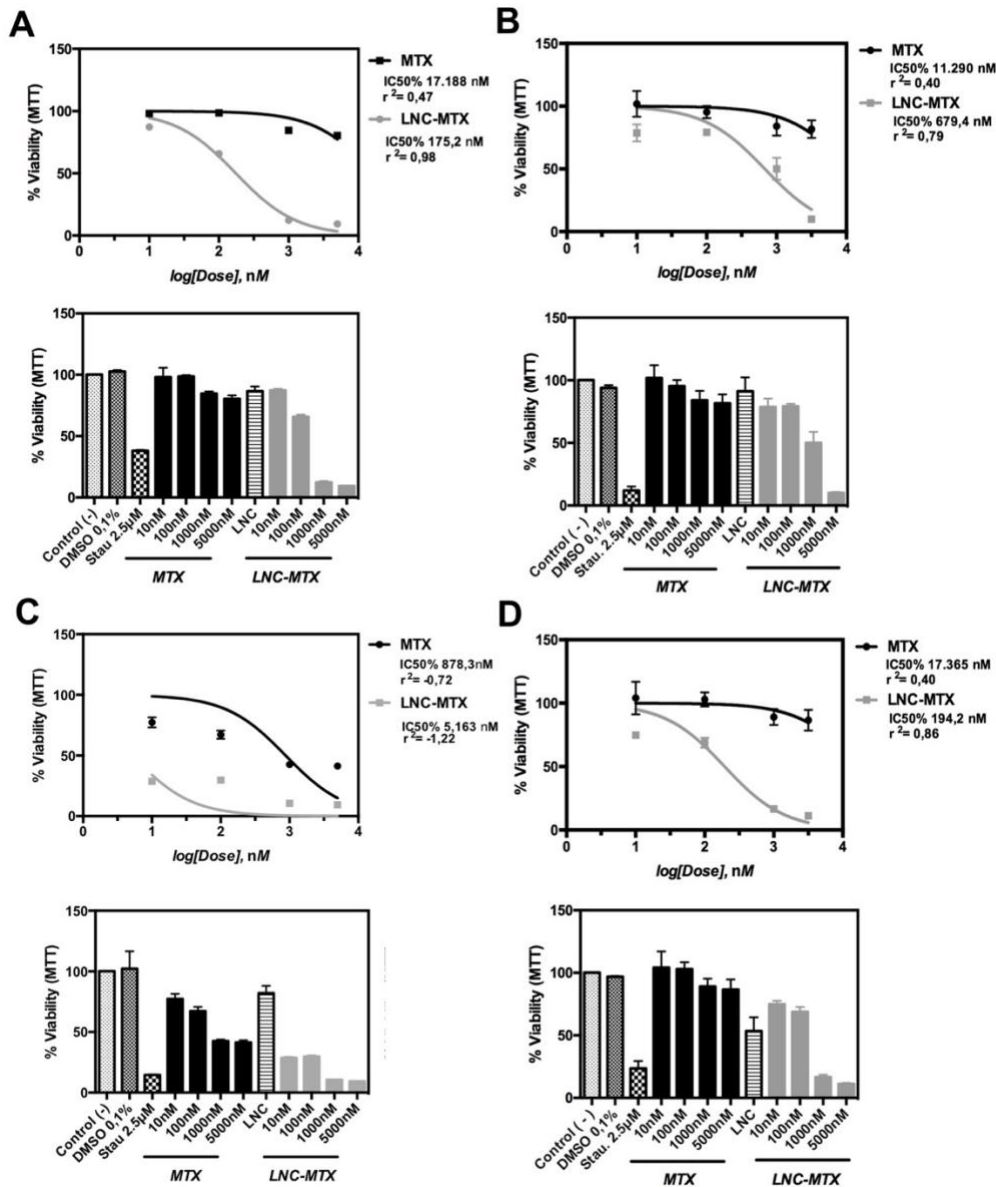


Figure3. Determination of IC 50% for cell viability. A) IC 50% of J774 Macrophages stimulated during 24 hours with the MTX and MTX-LNC compared to a 24 hours stimulus with DMSO 0.1%, Staurosporin 2.5µM, and medium. B) IC 50% of THP1 Macrophages stimulated during 24 hours with the MTX and MTX-LNC compared to a 24 hours stimulus with DMSO 0.1%, Staurosporin 2.5µM, and medium. C) IC 50% of J774 Macrophages stimulated during 48 hours with the MTX and MTX-LNC compared to a 48 hours stimulus with DMSO 0.1%, Staurosporin 2.5µM, and medium. D) IC 50% of J77 Macrophages stimulated during 48 hours with the MTX and MTX-LNC compared to a 48 hours stimulus with DMSO 0.1%, Staurosporin 2.5µM, and medium.

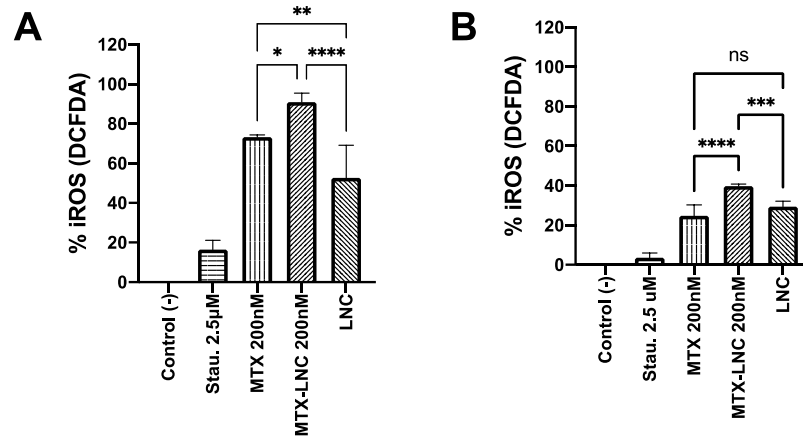


Figure 4. iROS production in J774 and MØTHP-1 Macrophages. A) iROS production in J774 Macrophages stimulated with MTX and LNC compared to treated with Staurosporin 2.5uM and Medium. B) iROS production in MØTHP-1 Macrophages stimulated with MTX and LNC compared to treated with Staurosporin 2.5uM and Medium.

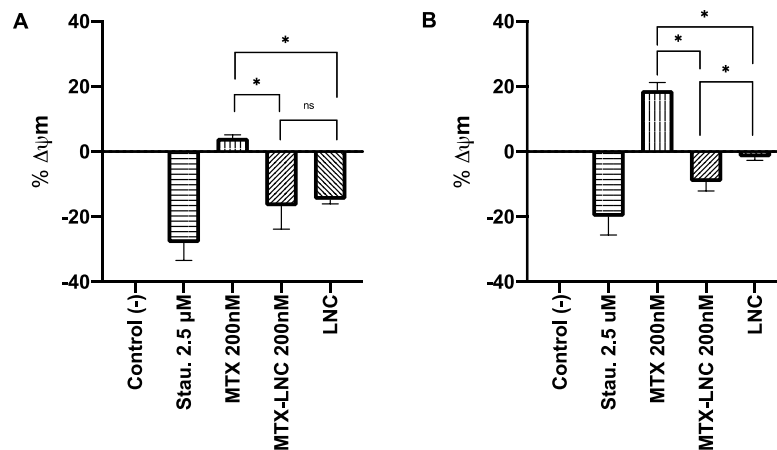


Figure 5. Electric Mitochondrial Membrane Potential. A) Comparison of Mitochondrial Membrane Potential of J774 macrophages treated during 24 hours with MTX, MTX-LNC at the same concentrations, staurosporine 2.5 uM, and medium. B) MØTHP-1 Treated during 48 hours with MTX and MTX-LNC at the same concentrations, Staurosporine 2.5 uM, and Medium.

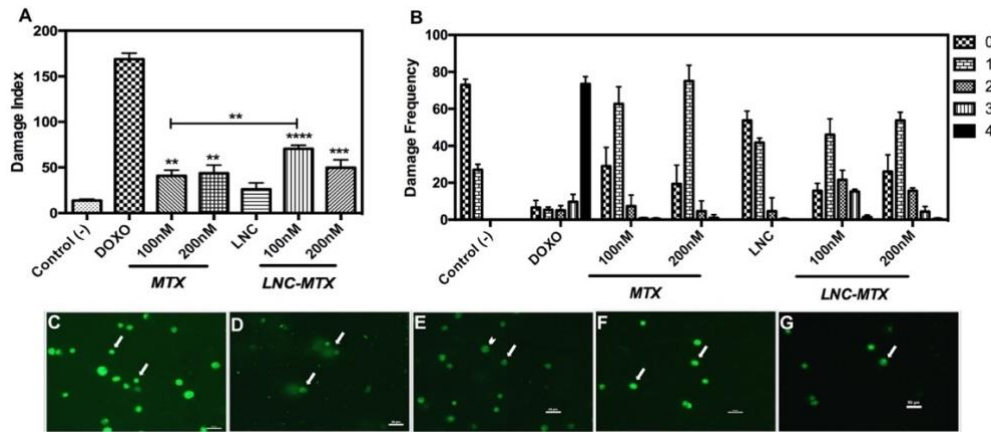


Figure 6. Comet Assay for Mitochondrial DNA damage. A) DNA damage index of M ϕ THP-1 Macrophages treated with MTX and LCN-MTX at 100nM and 200nM compared to Doxorubicin and medium containing only LNC. B) DNA damage frequency in at 4 different levels in M ϕ THP-1 treated with MTX, MTX-LNC, doxorubicin, and LNC. C) Fluorescence Microscopy analysis of the M ϕ THP-1 cells treated with LCNs. D) Fluorescence Microscopy analysis of the M ϕ THP-1 cells treated with Doxorubicin E) Fluorescence Microscopy analysis of the M ϕ THP-1 cells treated with LCN F) Fluorescence Microscopy analysis of the M ϕ THP-1 cells treated with MTX G) Fluorescence Microscopy analysis of the M ϕ THP-1 cells treated with MTX-LNC.

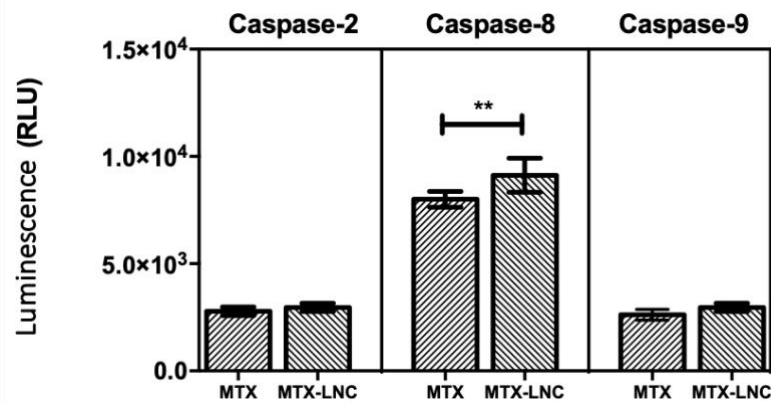


Figure7. Caspases 2, 8, and 9 activity after. A) Representation of the median Luminescence of the Macrophages treated with MTX or MTX-LNC.

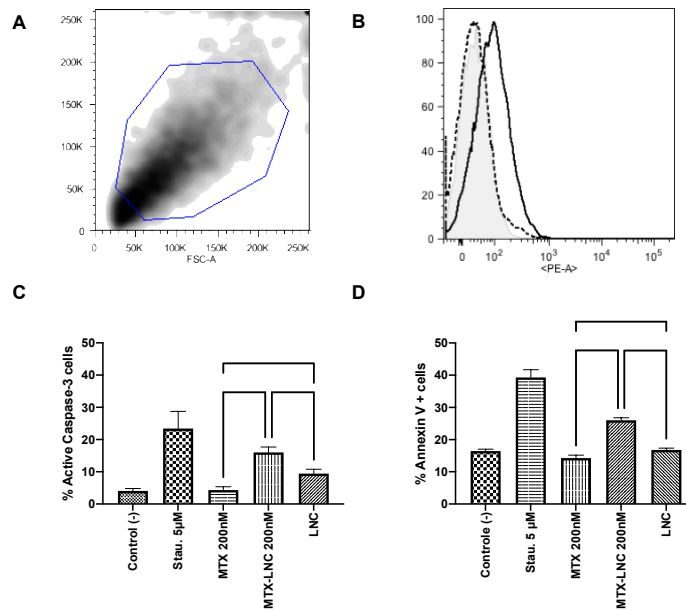


Figure 8. Flow Cytometry Analysis of Caspase 3 activity and Annexin V+ cells in M ϕ THP-1 macrophages after 48 hours of treatment. A) Morphologic Distribution in M ϕ THP-1 macrophages according to their morphologic Characteristics. B) Controls displacing according to Caspase 3 activity in a histogram representation. C) Caspase 3 activity and D) in M ϕ THP-1 macrophages treated with MTX and LCN-MTX compared with the different controls.

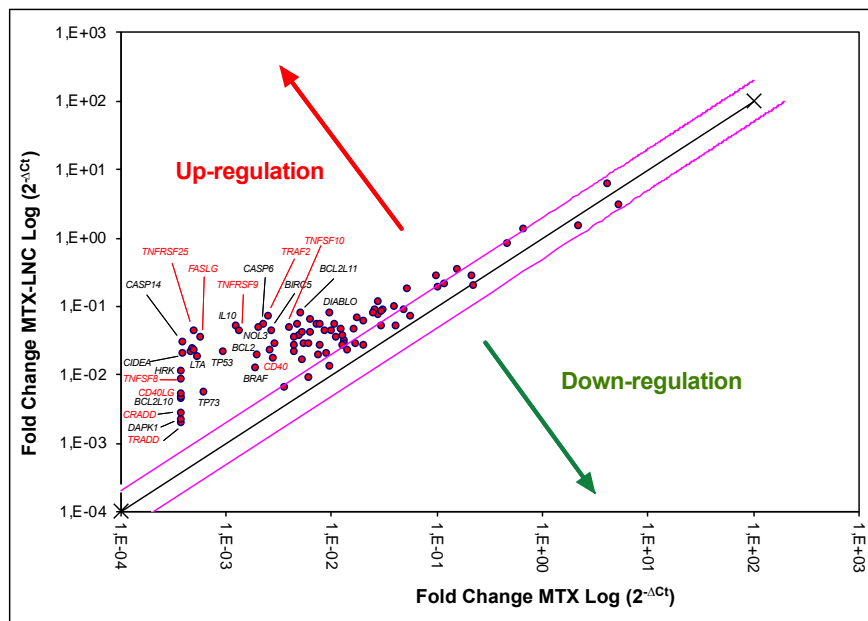


Figure 9. ScatterPlot of the genes expression of macrophages treated with MTX vs LCN-MTX. Logarithmic expression of upregulated and downregulated genes with a cutoff established in a foldchange of 2.0 in M ϕ THP-1 Macrophages treated with MTX and LCN-MTX.

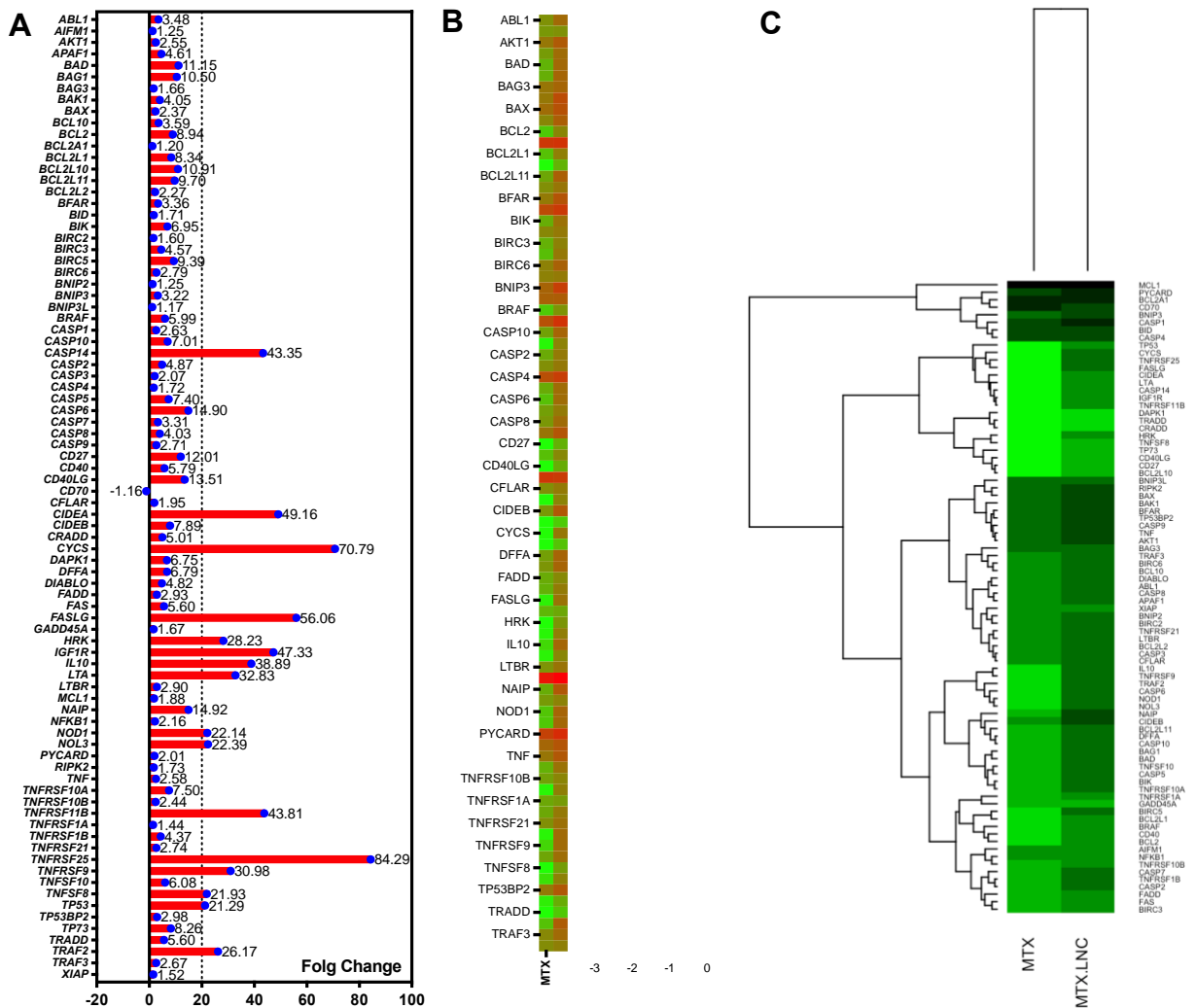


Figure 10. Genetic transcriptome expression of the apoptotic genes in Macrophages treated with MTX vs MTX-LNC. A) FoldChange of genes in Macrophages under the treatment with MTX vs MTX-LCN. B Heat Map with a logarithmic expression of the genes. C) Heat Map with logarithmic clusterization of gene expression in macrophages treated with the different formulations.

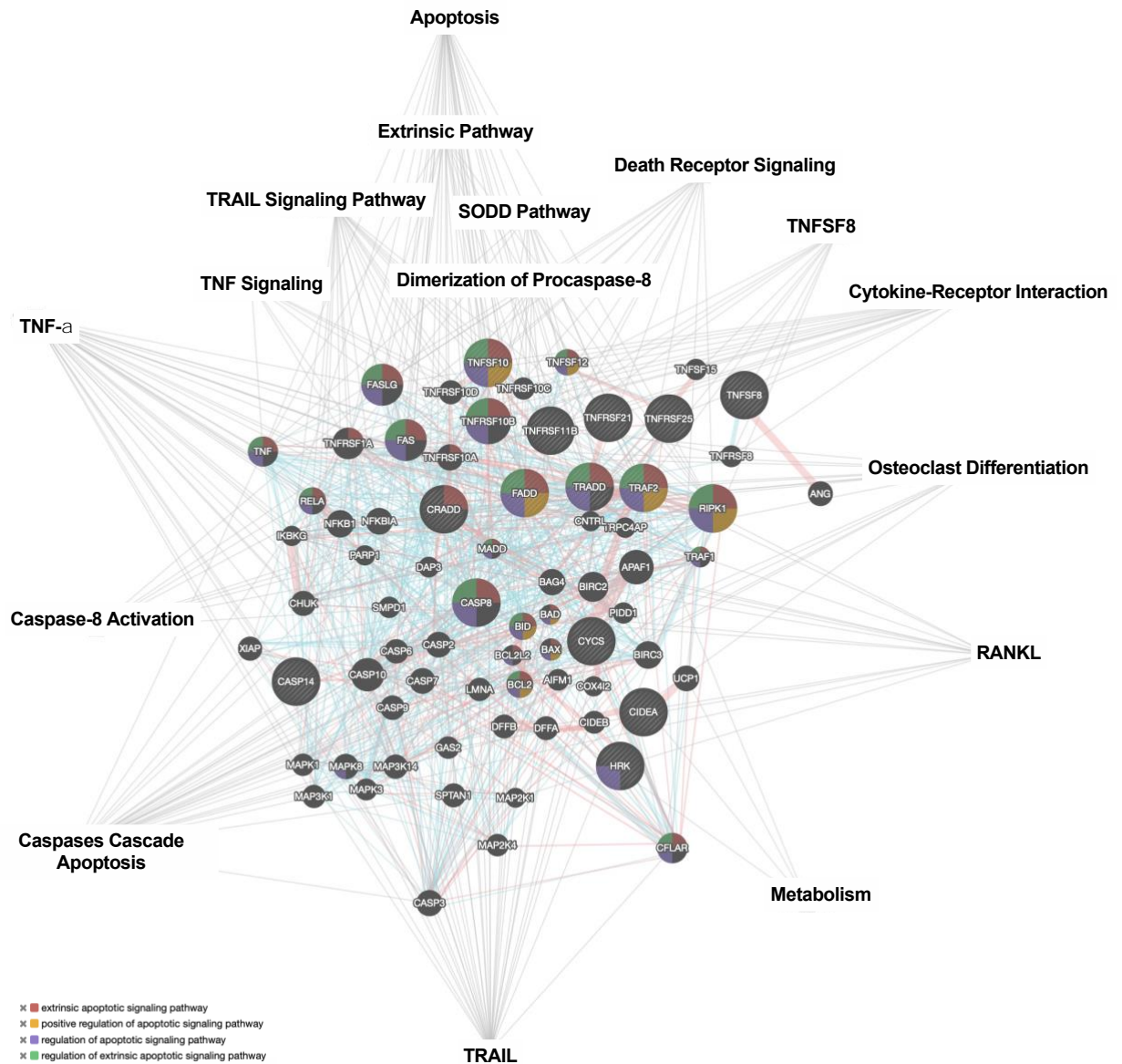


Figure 11. Genes interaction Network. A) Genes map considering the genes with a foldchange over 10.

Table 3. Signaling pathways represented in the genes interaction network

Apoptosis Signaling Pathways represented in the interaction model

Apoptosis Extrinsic Pathway
 Apoptosis –Ceramide Pathway
 Cell death receptor signaling pathway
 Procaspase-8 Dimerization
 Caspase-8 activation
 Caspases fall
 TRAIL Receptor signaling
 SODD signaling
 RANKL
 Osteoclasts Signaling
 TNF-alfa
 Cytokine-Receptor interaction

Apoptosis

Suggested Mechanism for Methotrexate
Loaded Lipid-Core Nanocapsules

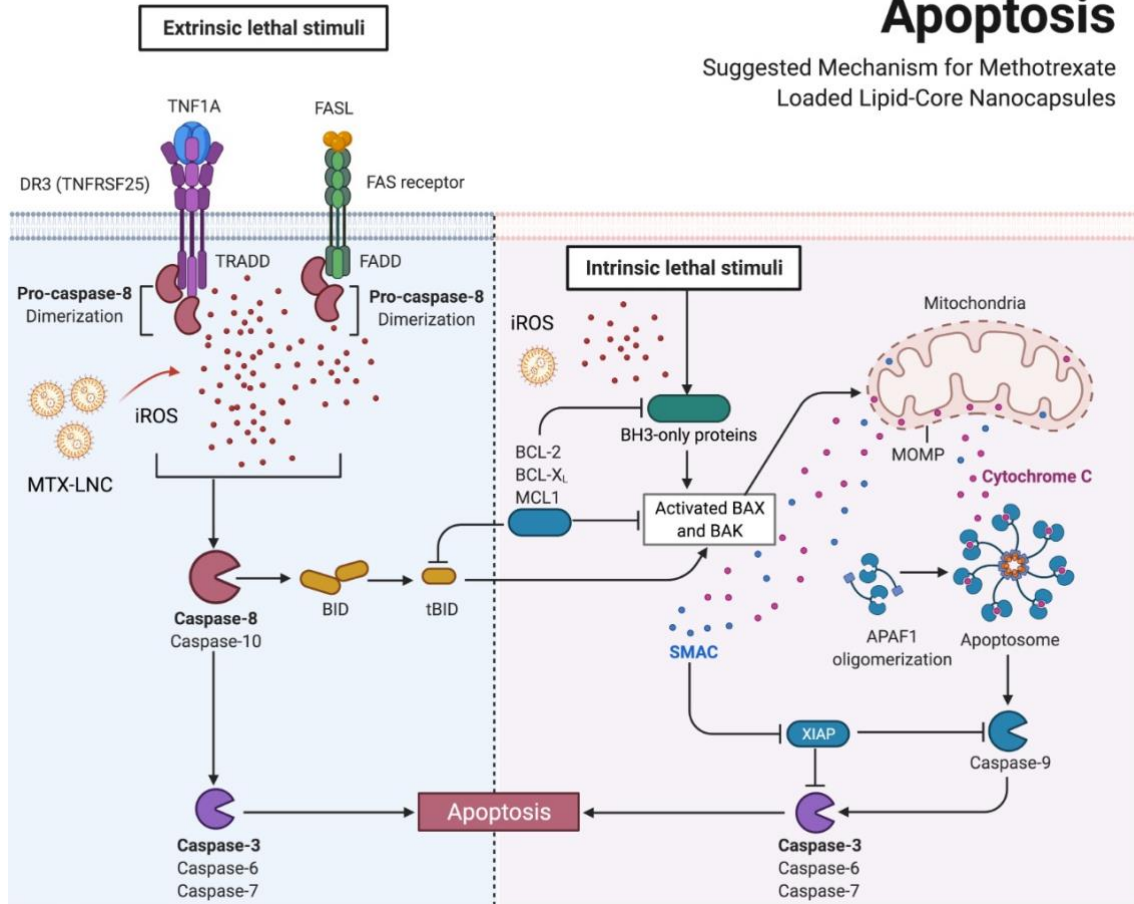


Figure 12. Graphical Abstract

Supplementary Material

Table 4. Gene profile

Simbolo do Gene	Nomeclatura	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		Fold Change
		MTX-LNC	MTX	
ABL1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	0,043	0,012	3,48
AIFM1	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1	0,012	0,010	1,25
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	0,073	0,029	2,55
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	0,041	0,009	4,61
BAD	BCL2-associated agonist of cell death	0,046	0,004	11,15
BAG1	BCL2-associated athanogene	0,051	0,005	10,50
BAG3	BCL2-associated athanogene 3	0,051	0,030	1,66
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	0,114	0,028	4,05
BAX	BCL2-associated X protein	0,096	0,041	2,37
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	0,063	0,018	3,59
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	0,018	0,002	8,94
BCL2A1	BCL2-related protein A1	0,264	0,220	1,20
BCL2L1	BCL2-like 1	0,022	0,003	8,34
BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)	0,004	0,000	10,91
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	0,062	0,006	9,70
BCL2L2	BCL2-like 2	0,030	0,013	2,27
BIFAR	Bifunctional apoptosis regulator	0,087	0,026	3,36
BID	BH3 interacting domain death agonist	0,205	0,120	1,71
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	0,035	0,005	6,95
BIRC2	Baculoviral IAP repeat containing 2	0,027	0,017	1,60
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	0,020	0,004	4,57
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	0,028	0,003	9,39
BIRC6	Baculoviral IAP repeat containing 6	0,058	0,021	2,79
BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2	0,026	0,021	1,25
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	0,172	0,053	3,22
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	0,067	0,057	1,17
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	0,012	0,002	5,99
CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	0,265	0,100	2,63
CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	0,053	0,007	7,01
CASP14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	0,020	0,000	43,35
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	0,027	0,006	4,87
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	0,028	0,013	2,07
CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	0,180	0,104	1,72
CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase	0,040	0,005	7,40
CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	0,041	0,003	14,90
CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	0,026	0,008	3,31
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	0,041	0,010	4,03
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	0,086	0,032	2,71
CD27	CD27 molecule	0,005	0,000	12,01
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	0,017	0,003	5,79
CD40LG	CD40 ligand	0,005	0,000	13,51
CD70	CD70 molecule	0,197	0,227	0,87
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	0,026	0,013	1,95
CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a	0,019	0,000	49,16
CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b	0,077	0,010	7,89
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	0,002	0,000	5,01
CYCS	Cytochrome c, somatic	0,029	0,000	70,79
DAPK1	Death-associated protein kinase 1	0,003	0,000	6,75
DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	0,053	0,008	6,79
DIABLO	Diablo, IAP-binding mitochondrial protein	0,053	0,011	4,82
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	0,016	0,005	2,93
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	0,025	0,005	5,60
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	0,033	0,001	56,06
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	0,006	0,004	1,67
HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	0,011	0,000	28,23
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	0,023	0,000	47,33
IL10	Interleukin 10	0,049	0,001	38,89
LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	0,018	0,001	32,83
LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	0,033	0,011	2,90
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	1,280	0,682	1,88
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein	0,077	0,005	14,92
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	0,020	0,009	2,16
NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	0,052	0,002	22,14
NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	0,047	0,002	22,39
PYCARD	PYD and CARD domain containing	0,323	0,161	2,01
RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	0,085	0,049	1,73
TNF	Tumor necrosis factor	0,079	0,031	2,58
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	0,034	0,005	7,50
TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	0,018	0,008	2,44
TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	0,022	0,001	43,81
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	0,009	0,006	1,44
TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	0,027	0,006	4,37
TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	0,036	0,013	2,74
TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	0,043	0,001	84,29
TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	0,042	0,001	30,98
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	0,040	0,007	6,08
TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	0,008	0,000	21,93
TP53	Tumor protein p53	0,021	0,001	21,29
TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2	0,077	0,026	2,98
TP73	Tumor protein p73	0,005	0,001	8,26
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	0,002	0,000	5,60
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	0,068	0,003	26,17
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	0,044	0,016	2,67
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis	0,022	0,014	1,52

References

1. Shinde CG, Venkatesh MP, Kumar TMP, Shivakumar HG. Methotrexate: A gold standard for treatment of rheumatoid arthritis. *J Pain Palliat Care Pharmacother.* 2014;28(4):351-358. doi:10.3109/15360288.2014.959238
2. Chan ESL, Fernandez P, Cronstein BN. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2007;3(1):27-33. doi:10.1586/1744666X.3.1.27
3. Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(8):472-485. doi:10.1038/nrrheum.2016.91
4. Davignon JL, Hayder M, Baron M, et al. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatol (United Kingdom).* 2013;52(4):590-598. doi:10.1093/rheumatology/kes304
5. Duan W, Li H. Combination of NF-kB targeted siRNA and methotrexate in a hybrid nanocarrier towards the effective treatment in rheumatoid arthritis. *J Nanobiotechnology.* 2018;16(1):1-9. doi:10.1186/s12951-018-0382-x
6. Di Vito A, Donato G, Tomassoni D. Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation. *Biomed Res Int.* 2017;2017(11):1237-1239. doi:10.1155/2017/8417183
7. Alivernini S, MacDonald L, Elmesmari A, et al. Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 2020. doi:10.1038/s41591-020-0939-8
8. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582-592. doi:10.1002/cbin.11137
9. Kaczanowski S. Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol.* 2016;13(3):1-14. doi:10.1088/1478-3975/13/3/031001
10. Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Jt Bone Spine.* 2019;86(3):301-307. doi:10.1016/j.jbspin.2018.07.004
11. Jekic B, Maksimovic N, Damnjanovic T. Methotrexate pharmacogenetics in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2019;20(17):1235-1245. doi:10.2217/pgs-2019-0121
12. Liu L, Guo W, Liang XJ. Move to Nano-Arthrology: Targeted Stimuli-Responsive Nanomedicines Combat Adaptive Treatment Tolerance (ATT) of Rheumatoid Arthritis. *Biotechnol J.* 2019;14(1):1-35. doi:10.1002/biot.201800024
13. Ren J, Fang Z, Yao L, et al. A micelle-like structure of poloxamer-methotrexate conjugates as nanocarrier for methotrexate delivery. *Int J Pharm.* 2015;487(1-

- 2):177-186. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.04.014
14. Garg NK, Tyagi RK, Singh B, et al. Nanostructured lipid carrier mediates effective delivery of methotrexate to induce apoptosis of rheumatoid arthritis via NF- κ B and FOXO1. *Int J Pharm.* 2016;499(1-2):301-320. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.12.061
 15. Boechat AL, De Oliveira CP, Tarrago AM, et al. Methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules are highly effective in the control of inflammation in synovial cells and a chronic arthritis model. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:6603-6614. doi:10.2147/IJN.S85369
 16. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(6):469-471. doi:10.1101/pdb.prot095505
 17. Rai Y, Pathak R, Kumari N, et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-15. doi:10.1038/s41598-018-19930-w
 18. Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res.* 2010;44(6):587-604. doi:10.3109/10715761003709802
 19. Scialò F, Sriram A, Fernández-Ayala D, et al. Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Transport Extend Animal Lifespan. *Cell Metab.* 2016;23(4):725-734. doi:10.1016/j.cmet.2016.03.009
 20. Rottenberg H, Shaolong W. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 1998;1404(3):393-404. doi:10.1016/S0167-4889(98)00088-3
 21. Møller P. The alkaline comet assay: Towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;98(4):336-345. doi:10.1111/j.1742-7843.2006.pto_167.x
 22. Pu X, Wang Z, Klaunig JE. Alkaline comet assay for assessing DNA damage in individual cells. *Curr Protoc Toxicol.* 2015;2015(August):3.12.1-3.12.11. doi:10.1002/0471140856.tx0312s65
 23. Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *Int J Pharm.* 2009;379(2):201-209. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.026
 24. Kothamasu P, Kanumur H, Ravur N, Maddu C, Parasuramrajam R, Thangavel S. Nanocapsules: The weapons for novel drug delivery systems. *BioImpacts.* 2012;2(2):71-81. doi:10.5681/bi.2012.011
 25. Lee SM, Kim HJ, Ha YJ, et al. Targeted chemo-photothermal treatments of rheumatoid arthritis using gold half-shell multifunctional nanoparticles. *ACS Nano.* 2013;7(1):50-57. doi:10.1021/nn301215q

26. Qi R, Majoros I, Misra AC, et al. Folate receptor-targeted dendrimer-methotrexate conjugate for inflammatory arthritis. *J Biomed Nanotechnol.* 2014;11(8):1370-1384. doi:10.1166/jbn.2015.2077
27. Janakiraman K, Krishnaswami V, Rajendran V, Natesan S. Novel nano therapeutic materials for the effective treatment of rheumatoid arthritis-recent insights. 2020;(January).
28. Weinblatt ME. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2013;124:16-25.
29. Nagata S, Tanaka M. Programmed cell death and the immune system.
30. Baier A, Meineckel I, Gay S, Pap T. Apoptosis in rheumatoid arthritis. 2003:274-279.
31. Szwed M, Torgersen ML, Kumari RV, et al. Biological response and cytotoxicity induced by lipid nanocapsules. *J Nanobiotechnology.* 2020;18(1):1-19. doi:10.1186/s12951-019-0567-y
32. Savi L. A. Avaliação da genotoxicidade e das atividades anti-herpéticas e antioxidante de compostos fenólicos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2004.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a formulação MTX-LNC mostrou-se bastante eficiente no controle da inflamação articulado causada no modelo de Artrite FCA, demonstrando redução significativa a partir do 21^o dia. Ao analisar as estruturas, a formulação também apresentou eficácia na preservação das estruturas articulares analisadas (Espaço Articular, Membrana sinovial, Cartilagem articular e calcificada). Já nos testes *in vitro* com macrófagos Humanos, a formulação de interesse regulou positivamente genes pró-apoptóticos, aumentando a morte celular ao reduzir a resistência ao fármaco.

ANEXOS

1- Artigo Submeti

1 **Risk factors associated with COVID-19 transmission in Manaus, Brazil**

2 Running title: **SARS-CoV-2 risk factors**

3

4 Bárbara Batista Salgado¹, Ivanildo Vieira Pereira Filho¹, Danielle Severino Sena da
5 Silva¹, Thiago Barros do Nascimento de Moraes¹, Maele Ferreira Jordão¹, Aguyda
6 Rayany Cavalcante Barbosa¹, Jessica Vanina Ortiz⁵, Isabelle Bezerra Cordeiro², Júlio
7 Nino de Souza Neto², Enedina Nogueira de Assunção², Rafaella Oliveira dos Santos¹,
8 Nani Oliveira Carvalho¹, Wladimir Braga Salgado Sobrinho¹, Cristiano Fernandes da
9 Costa⁶, Pedro Elias de Souza⁴, Bernardino Claudio de Albuquerque⁴, Christian A.
10 Ganoza⁷, Roger V. Araujo-Castillo⁸, Spartaco Astofi Filho², Jaila Dias Borges
11 Lalwani^{3#}, Pritesh Lalwani^{1#} and The DETECTCoV-19 study team

12

13 ¹Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fiocruz Amazônia, Manaus, Amazonas,
14 Brazil

15 ²Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Amazonas (UFAM),
16 Manaus, Amazonas, Brazil

17 ³Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Universidade Federal do Amazonas
18 (UFAM), Manaus, Amazonas, Brazil

19 ⁴Faculdade de Medicina (FM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus,
20 Amazonas, Brazil

21 ⁵Universidade Nilton Lins (UNINILTONLINS), Manaus, Amazonas, Brazil

22 ⁶Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS/AM), Manaus, Amazonas,
23 Brazil

24 ⁷Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana
25 Cayetano Heredia, Lima, Peru

2- Artigo Submetido

1 A genetic variant in the *TRAF1/C5* gene lead susceptibility to active pulmonary
2 tuberculosis by decreased TNF- α levels

3

4

5 Dhêmerson Souza de Lima^{1*}, Carolina Fadoul de Brito², Aguyda Rayany Cavalcante Barbosa²,
6 Mariana Brasil de Andrade Figueira², Julio César Maciel Bonet³, Rajendranath Ramasawmy^{4, 5}
7 Mauricio Morishi Ogusku⁶, Aya Sadahiro^{2, 3} and Antonio Luiz Boechat^{2*}

8

9 1. Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências
10 Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

11 2. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências
12 Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil.

13 3. Laboratório de Imunologia Molecular, Departamento de Parasitologia, Universidade
14 Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil.

15 4. Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Doutorado (FMT/HVD), Manaus,
16 AM, Brasil.

17 5. Universidade Nilton Lins, Manaus, AM, Brasi

18 6. Laboratório de Micobacteriologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
19 (INPA), Manaus, AM, Brasil.

20

21

22

23 Corresponding Authors:

24 Dhêmerson Souza de Lima: dhemersonsouzalima@gmail.com

25 Antonio Luiz Boechat: antonioluiz.boechat@gmail.com

26

27

28

29

30

31

32

33

34

3- Artigo em revisão.

Metatarsophalangeal joint of rats induced to arthritis: a stereological study

Or

Adjuvant-induced arthritis is associated with increased synovial membrane volume, loss of chondrocytes and increased mast cell infiltration in metatarsophalangeal joint of rats

¹Rafael Maciel dos Santos, ²Antonio Luiz Boechat, ³Silvânia da Conceição Furtado, ¹Aguyda Rayany Cavalcante Barbosa and ⁴Oscar Tadeu Ferreira da Costa

¹Basic and Applied Immunology Postgraduate Program, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.

²Department of Parasitology, Laboratory of Immunology. Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.

³Department of Morphology, Laboratory of Anatomy. Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.

⁴Department of Morphology, Research Group of Quantitative Microscopy, Federal University of Amazonas, General Rodrigo Octávio Jordão Ramos Avenue, 6200, Zip Code 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil.

Running title: Joint arthritis stereology.

Journal section: ?????????

Corresponding author: Costa, O.T.F: Tel.: +55 92 3305-4277, email: oscarcostaufam@gmail.com

4- Certificados

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CARREGADAS COM METOTREXATO PREVINEM A PERDA DE ESPAÇO ARTICULAR EM ARTRITE EXPERIMENTAL

Inscrito pelos autores:
ANTONIO LUIZ BOECHAT; CATIÚSCIA PADILHA DE OLIVEIRA; AGUYDA RAYANY CAVALCANTE BARBOSA; RAFAEL MACIEL DOS SANTOS; SÍLVIA STANISÇUASKI GUTERRES; ADRIANA RAFFIN POHLMANN; OSCAR TADEU FERREIRA COSTA

Foi premiado como um dos melhores trabalhos no XXXIV Congresso Brasileiro de Reumatologia, realizado no período de 13 a 16 de setembro de 2017.
 Categoria: **Concurso de Pôster**
 Classificação: **3º lugar**

Florianópolis, 16 de setembro de 2017


 Ivãno Alves Pereira
 Presidente do Congresso SBR 2017


 Georges Basile Christopoulos
 Presidente da SBR


 Adriana Fontes Zimmermann
 Diretora Científica do Congresso


 José Tupinambá Sousa Vasconcelos
 Diretor Científico da SBR

PROMOÇÃO:



SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

REALIZAÇÃO:



SOCIEDADE CASARIENSE DE REUMATOLOGIA



XXXIV Congresso Brasileiro de REUMATOLOGIA
 13 a 16 de setembro de 2017
 CentroSul - Florianópolis - SC
A REUMATOLOGIA E SUA INTERAÇÃO COM A MEDICINA INTERNA.



ERA 2020

26º Encontro de Reumatologia Avançada
 10 a 12 de dezembro **on-line**

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho nº CO.03 intitulado **“NANOCAPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CARREGADAS COM DICLOFENACO REDUZEM A SINOVITE E PRESERVAM CARTILAGEM ARTICULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRIT ”**, de autoria de Antonio Luiz Boechat, Nathalie Marte Ureña, Catiúscia Padilha de Oliveira, Aguyda Rayane Cavalcante Barbosa, Sílvia Stanisçuaski Guterres, Adriana Rafin Pohlmann, Oscar Tadeu Ferreira Costa, Antonio Luiz Boechat, foi premiado com o **Menção Honrosa** na categoria **TEMAS LIVRES – ÁREA BÁSICA**, no 26º Encontro de Reumatologia Avançada 2020 - on line, realizado entre os dias 10 a 12 de dezembro de 2020.


 Marcelo de Medeiros Pinheiro
 Presidente SPR - Biênio 2020-2021


 Alexandre Wagner S. de Souza
 Diretor Científico SPR - Biênio 2020-2021

