

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Bruna Lopes da Costa

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA DE IMPLANTES POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS
CONTENDO SIROLIMUS**

BELO HORIZONTE - MG

2018

Bruna Lopes da Costa

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA DE IMPLANTES POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS
CONTENDO SIROLIMUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, UFMG.

Coorientador: Prof. Dr. Renes de Resende Machado, UFMG.

BELO HORIZONTE - MG

2018

C837d Costa, Bruna Lopes da.
Desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica de implantes poliméricos biodegradáveis contendo sirolimus / Bruna Lopes da Costa. – 2018.
108 f. : il.

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.
Coorientador: Renes de Resende Machado.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Sirolimus – Teses. 2. Implante polimérico – Teses. 3. Polímeros na medicina – Teses. 4. Tecnologia de liberação controlada – Teses. 5. Ácido polilático-co-glicólico (PLGA) – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Machado, Renes de Resende. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

U.F.M.G.

FOLHA DE APROVAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
IMPLANTES POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO SIROLIMUS**

BRUNA LOPES DA COSTA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Armando da Silva Cunha Junior - Orientador
UFMG


Prof. Renes de Resende Machado - Coorientador
UFMG


Prof. Isabela da Costa Cesar
UFMG


Prof. Daniel Cristian Ferreira Soares
UNIFEI

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela vida e por me fortalecer durante a caminhada.

Ao **professor Dr. Armando da Silva Cunha Júnior**, que me apoiou e incentivou desde o primeiro período da faculdade. Agradeço as orientações, os conselhos e a confiança que sempre depositou em meu trabalho. Você sempre terá minha admiração e carinho! Muito obrigada!

Ao **professor Dr. Renes de Resende Machado**, que esteve presente durante toda esta caminhada. Obrigada pela atenção, pelas ideias e por todo auxílio. Um exemplo de professor, pesquisador e amigo.

Agradeço aos **membros da banca** pela presença e pela enriquecedora contribuição para a melhoria deste trabalho e para meu aprendizado.

À **Dra. Sílvia Ligório Fialho** pelo incentivo, apoio e assistência durante a realização deste trabalho. Obrigada pelas oportunidades e pelos valiosos ensinamentos. Profissional admirável, por quem tenho muita gratidão.

À professora **Dra. Elionai Cassiana de Lima Gomes** pelo apoio nos experimentos de caracterização, pela atenção e paciência. Agradeço as ideias, as conversas e os ensinamentos!

À **professora Dra. Rogéria Serakides**, pela ajuda nas análises de histologia.

Ao **professor Dr. Wagner da Nova Mussel**, pela ajuda nas análises de raios-x.

Ao farmacêutico **Dr. Vinícius**, pelos treinamentos e por todo suporte durante a realização deste trabalho.

Aos **alunos do Armando**, por dividirem os momentos difíceis! Pelas trocas de experiência e conhecimento e pelos momentos descontraídos do café. Pessoas competentes que foram muito importantes nesta caminhada!

Aos **colegas e funcionários da FUNED** por toda paciência, assistência e ensinamentos.

Aos **colegas, professores do Laboratório de Farmacologia**, à **Adelaide** e ao **Batista**, pela assistência nos experimentos com animais. Obrigada por todo suporte!

Obrigada aos **animais** que contribuíram com suas vidas para a execução deste trabalho.

Aos **colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica**, pela ajuda, companheirismo e pelos momentos de descontração. A todos os **professores do LTF** e ao **Marton** pelo apoio.

Aos **funcionários do Centro de Microscopia da UFMG**, por auxiliarem nas análises de MEV.

Aos meus pais, **Marcelus e Cristina**, que são os amores da minha vida. Obrigada pelos melhores exemplos, pelo suporte durante esses últimos 26 anos, pelo amor, por se doarem aos filhos. Eu reconheço e sou muito grata! Essa conquista é de vocês e por vocês! Eu os amo muito!

À minha irmã, **Marina**, pelo apoio constante. Por me mostrar que nunca caminhei sozinha. Obrigada por ser um exemplo e por todo carinho! Sem você este sonho não seria possível!

Ao **Philippe**, meu amor. Um exemplo de homem, de filho e amigo! Obrigada por ser meu alicerce e tornar essa caminhada mais leve e feliz. Obrigada por encarar esta etapa comigo, por ser meu parceiro! Você é uma parte de mim! Te amo!

Aos meus **familiares**: avós, tios e primos, pelo suporte e amor durante toda minha vida. Em especial à minha avó Dodola, que é uma pessoa incrível! Vocês são essenciais e eu amo muito cada um de vocês!

À **família do Philippe**, verdadeiros amigos. Pessoas que admiro e amo muito.

À **Marina**, irmã que a vida me deu. Você foi e sempre será fundamental em todas as etapas da minha vida! Você é paz, confiança, apoio e alegria! Obrigada! Te amo!

Aos meus **amigos**, pelos momentos de diversão, pelo carinho e apoio constantes. Por estarem sempre presentes e por me apresentarem diariamente uma parte muito boa e feliz da vida! Obrigada!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço também às **agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG** e ao **governo Federal Brasileiro** pelo financiamento dado a este projeto.

RESUMO

Sistemas poliméricos implantáveis são capazes de disponibilizar o fármaco diretamente no local de ação, em doses terapêuticas e por um período prolongado, dessa forma, representam uma forma farmacêutica inovadora de tratamento. O poli(ácido lático-co-ácido glicólico) é um polímero sintético biodegradável com alta biocompatibilidade e, por esse motivo, tem sido extensamente utilizado em sistemas de liberação de fármacos. O sirolimus, um antibiótico macrocíclico, apresenta atividade imunossupressora, uma vez que promove a inibição de uma quinase envolvida na proliferação de linfócitos. Contudo, a administração sistêmica de sirolimus está associada a incidência de efeitos adversos. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar o comportamento *in vivo* dos implantes à base de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) 50:50 contendo sirolimus. Os sistemas, sintetizados pela técnica de moldagem a quente, foram caracterizados por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, análises térmicas e difração de raios-X. Para avaliação do perfil de liberação *in vivo* dos implantes, camundongos Swiss foram submetidos a implantação subcutânea dos implantes contendo sirolimus 25% (p/p) e implantes sem o fármaco. O perfil de liberação do sirolimus a partir dos implantes foi determinado durante 42 dias e a biodegradação foi avaliada após 7, 14 e 28 dias por estereomicroscopia e microscopia eletrônica de varredura. Após 7 e 42 dias, a pele do local de implantação foi removida para avaliação histológica. A atividade anti-inflamatória dos sistemas foi avaliada em modelo de formação de tecido fibrovascular induzida pela implantação subcutânea de um *pellet* de algodão em camundongos. Os resultados demonstraram a estabilidade térmica dos constituintes até a temperatura de 190°C. Durante o processo de preparo dos implantes foram observadas alterações na estrutura cristalina do fármaco e amorfa do polímero e ausência de modificações químicas e incompatibilidade entre o sirolimus e o polímero. A avaliação biológica demonstrou que os implantes são capazes de liberar o sirolimus por tempo prolongado, em quantidade capaz de reduzir a resposta inflamatória crônica no modelo avaliado. Dessa forma, esses achados preliminares indicam que implantes desenvolvidos neste trabalho foram seguros para os animais experimentais e, podem ser uma alternativa promissora para a veiculação do sirolimus, a serem utilizados no manejo terapêutico de diferentes doenças crônicas, principalmente aquelas que apresentam um processo inflamatório associado.

Palavras chave: Sirolimus. Polímeros Biodegradáveis. Sistemas de Liberação de Fármacos.

ABSTRACT

The implantable polymeric systems are able to provide the drug directly at site of action at therapeutic doses over a prolonged period, representing an innovative dosage form of treatment. The poly-lactic-co-glycolic acid is a biodegradable synthetic polymer with high biocompatibility. For this reason, it has been used extensively in release drug delivery systems. Sirolimus is a macrocyclic antibiotic which has immunosuppressive activity. Its action involves the inhibition of a kinase involved in lymphocyte proliferation. Even though, sirolimus has undesirable characteristics regarding its administration by its side effects. Thus, the purpose of this report was the development, characterization and biological evaluation of poly-lactide-co-glycolide implants loaded with sirolimus. Implants were prepared by the hot molding technique and characterized by fourier transform infrared spectroscopy, thermal analysis and X-ray diffraction. To evaluate the in vivo release profile of the implants, Swiss mice received subcutaneous implants containing 25% (w / w) of sirolimus and implants without the drug. The drug levels were determined during a 42-day study period and the biodegradation was evaluated after 7, 14 and 28 days by stereomicroscopy and scanning electron microscopy. After 7 and 42 days of the in vivo release study, the skin of the implanted site was sampled for histopathological evaluation. The anti-inflammatory activity of the systems was evaluated in a model of fibrovascular tissue formation induced by the subcutaneous implantation of a cotton pellet, in mice. The results demonstrated the thermal stability of the constituents up to 190°C. Changes in the crystalline structure of the drug and in the amorphous structure of the polymer during the process of implants production were observed. No chemical modifications and incompatibility between the drug and the polymer were visualized. The biological evaluation showed that the implants are able to release sirolimus for a prolonged time, in an amount able to reduce the chronic inflammatory response in the evaluated model. Thus, these preliminary findings indicate that the implants developed in this study were safe for the experimental animals and may be a promising alternative for sirolimus delivery, to be used in the therapeutic management of different chronic diseases, especially which have an associated inflammatory process.

Key words: Sirolimus. Biodegradable Polymers. Drug Release Systems.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Perfis de liberação de um fármaco em função do tempo: convencional x controlada..... | 25 |
| Figura 2. Sistemas de liberação do tipo matricial e reservatório. | 27 |
| Figura 3. Estrutura química do poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA). | 29 |
| Figura 4. Mecanismo de hidrólise do PLGA. | 31 |
| Figura 5. Mecanismo de liberação do fármaco a partir de implantes a base de PLGA. (A) Implante antes de inserido no organismo, apresentando matriz homogênea e porosa. (B) <i>Burst</i> inicial. (C) Difusão do fármaco pela matriz polimérica. (D, E, F) Degradação do polímero com perda de massa, inicialmente central até completa degradação. | 32 |
| Figura 6. Perfil de liberação do fármaco fornecido por implantes a base de PLGA.. | 33 |
| Figura 7. Estrutura química do sirolimus (SRL). | 35 |
| Figura 8. Mecanismo de ação do SRL. | 37 |
| Figura 9. Fotografia do implante de PLGA 50:50 contendo 25% p/p de SRL..... | 49 |
| Figura 10. Curva TG do SRL, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio..... | 51 |
| Figura 11. Curva TG do PLGA 50:50, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio..... | 51 |
| Figura 12. Curva TG da mistura liofilizada, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio. | 52 |
| Figura 13. Curva TG do implante, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio..... | 53 |
| Figura 14. Curva DSC do SRL, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio..... | 54 |
| Figura 15. Curva DSC do PLGA 50:50, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio..... | 55 |
| Figura 16. Curva DSC da mistura liofilizada, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio. | 56 |
| Figura 17. Curva DSC do implante, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio..... | 56 |
| Figura 18. Difratoograma do PLGA 50:50. | 58 |
| Figura 19. Difratoograma do SRL..... | 58 |
| Figura 20. Difratoograma da mistura liofilizada. | 59 |
| Figura 21. Difratoograma do implante contendo 40% p/p de SRL..... | 59 |
| Figura 22. Difratoograma do SRL liofilizado. | 60 |
| Figura 23. Difratoograma do SRL liofilizado e aquecido a 120 °C..... | 60 |
| Figura 24. Difratoograma do PLGA 50:50 liofilizado..... | 61 |

| | |
|---|----|
| Figura 25. Difratoograma do implante de PLGA 50:50..... | 61 |
| Figura 26. Curva DSC do PLGA 50:50 liofilizado, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio. | 63 |
| Figura 27. Curva DSC do implante de PLGA 50:50, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio. | 63 |
| Figura 28. Espectro FTIR da molécula do SRL. | 65 |
| Figura 29. Espectro FTIR da molécula do PLGA 50:50..... | 66 |
| Figura 30. Espectro FTIR da mistura liofilizada..... | 67 |
| Figura 31. Procedimento cirúrgico para implantação dos sistemas poliméricos. (A) Incisão no dorso dos animais. (B) Implantação dos sistemas poliméricos contendo ou não SRL. (C) Sutura..... | 71 |
| Figura 32. Perfil de liberação do SRL a partir dos implantes de PLGA ao longo dos 42 dias do estudo de liberação <i>in vivo</i> . Cada ponto da curva representa a média ± DP de 4 animais. | 76 |
| Figura 33. (A) Imagem do implante contendo 25 % p/p de SRL antes de implantado no dorso do animal, obtida por estereomicroscopia. (B) Imagem do implante contendo 25 % p/p de SRL antes de implantado no dorso do animal, obtida por MEV em aumento de 150X. | 77 |
| Figura 34. (A) Imagem do implante contendo 25 % p/p de SRL após 7 dias de implantado no dorso do animal, obtida por estereomicroscopia. (B,C) Imagens do implante contendo 25 % p/p de SRL após 7 dias de implantado no dorso do animal, obtidas por MEV em aumento de 30X e 150X, respectivamente. | 78 |
| Figura 35. (A) Imagem do implante contendo 25 % p/p de SRL após 14 dias de implantado no dorso do animal, obtida por estereomicroscopia. (B,C) Imagens do implante contendo 25 % p/p de SRL após 14 dias de implantado no dorso do animal, obtidas por MEV em aumento de 30X e 150X, respectivamente. | 78 |
| Figura 36. (A) Imagem do implante contendo 25 % p/p de SRL após 28 dias de implantado no dorso do animal, obtida por estereomicroscopia. (B,C) Imagens do implante contendo 25 % p/p de SRL após 28 dias de implantado no dorso do animal, obtidas por MEV em aumento de 30X e 150X, respectivamente. | 78 |
| Figura 37. Fotomicroscopia da pele do animal após 7 dias da implantação do implante de PLGA 50:50. (A) 50X (B) 400X. Setas apontam os macrófagos espumosos. | 80 |
| Figura 38. Fotomicroscopia da pele do animal após 7 dias da implantação do implante contendo 25% p/p de SRL. (A) 50X (B) 400X. Setas apontam os macrófagos espumosos. | 80 |
| Figura 39. Fotomicroscopia da pele do animal após 42 dias da implantação do implante de PLGA 50:50. (A) 50X (B) 400X. # Célula gigante multinucleada do tipo Corpo Estranho. * Célula gigante multinucleada do tipo Langhans..... | 81 |
| Figura 40. Fotomicroscopia da pele do animal após 42 dias da implantação do implante contendo 25% p/p de SRL. (A) 50X (B) 400X. Setas apontam os macrófagos espumosos. Cabeças de seta apontam os linfócitos picnóticos. | 82 |

| | |
|--|----|
| Figura 41. <i>Pellet</i> de algodão do grupo controle após 7 dias de implantado do dorso do animal..... | 83 |
| Figura 42. Efeito induzido por implantes PLGA 50:50, com (25% p/p) ou sem SRL, sobre a formação de tecido fibrovascular em camundongos. Os animais dos grupos controle receberam veículo (solução salina estéril) ou dexametasona (2 mg/kg), por via oral, a cada dois dias. *** Indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0.001$). n=7. | 83 |
| Figura 43. Variações de massas corporais dos animais ao longo do estudo. n=7. ... | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Características físico-químicas do fármaco SRL. | 38 |
| Tabela 2. Peso médio e teor de SRL nos implantes desenvolvidos. | 50 |
| Tabela 3. Tratamentos dos quatro grupos de animais do estudo de formação de tecido fibrovascular induzida por implante subcutâneo de um pellet de algodão. | 74 |
| Tabela 4. Valores da quantidade de SRL liberado ao longo do estudo de liberação <i>in vivo</i> (mg e %; n = 4). | 76 |
| Tabela 5. Quantidade de SRL liberado a partir dos dois implantes inseridos nos animais ao longo dos 7 dias do estudo de formação de tecido fibrovascular induzida por implante subcutâneo de um pellet de algodão (mg e %; n = 7). | 84 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Formas farmacêuticas a base de PLGA. | 34 |
| Quadro 2. Formas farmacêuticas inovadoras para veiculação de SRL. | 41 |
| Quadro 3. Condições cromatográficas do método analítico. | 46 |
| Quadro 4. Bandas de absorção do SRL. | 65 |
| Quadro 5. Bandas de absorção do PLGA 50:50. | 66 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------------|---|
| Al ₂ O ₃ | Alumina |
| AP-1 | Proteína ativadora-1 (do inglês, <i>activator protein 1</i>) |
| CLAE | Cromatografia a líquido de alta eficiência |
| CH ₃ | Grupo metila |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| DAD | Detector de arranjo de diodos (do inglês, <i>diode array detector</i>) |
| DP | Desvio padrão absoluto |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| DRX | Difração de raios x |
| DSC | Calorimetria exploratória diferencial |
| EUA | Estados Unidos da América |
| EVA | Poli(etileno-co-acetato de vinila) |
| FARMATEC | Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Fármacos, Medicamentos e Cosméticos |
| FDA | Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i> |
| FKBP-12 | Proteína de ligação FK-12 (do inglês, <i>FK binding protein-12</i>) |
| FK506 | Tacrolimus |
| FLS | Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (do inglês, <i>fibroblast-like synoviocytes</i>) |
| FTIR | Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier |
| FUNED | Fundação Ezequiel Dias |

| | |
|----------------|---|
| HE | Hematoxilina e eosina |
| IL | Interleucina |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| mTOR | Alvo de rapamicina em mamífero (do inglês, <i>mammalian target of rapamycin</i>) |
| NF- κ B | Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês, <i>nuclear factor κB</i>) |
| OH | Grupo hidroxila |
| PCL | Poli- ϵ -caprolactona |
| PEG | Poli(etilenoglicol) |
| PGA | Poli(ácido glicólico) |
| PLA | Poli(ácido láctico) |
| PLGA | Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) |
| PVA | Poli(álcool vinílico) |
| SRL | Sirolimus |
| T _g | Temperatura de transição vítrea |
| T _c | Temperatura de cristalização |
| T CD4+ | Linfócito T auxiliar |
| TG | Termogravimetria |
| TGF- β | Fator de crescimento transformante beta (do inglês, <i>Beta transforming growth factor</i>) |
| THP-1 | Linhagem celular de monócito humano |
| TNF | Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumoral necrosis factor</i>) |
| UFG | Universidade Federal de Goiás |

| | |
|------|--|
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| UV | Ultravioleta |
| v.i. | Viscosidade inerente |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>) |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---------|---------------------------|
| % | Porcentagem |
| °C | Grau Celsius |
| g/mol | Grama por mol |
| µg/mL | Micrograma por mililitro |
| g | Grama |
| ng/mL | Nanograma por mililitro |
| kDA | Quilodaltons |
| dl/g | Decilitros por grama |
| % (p/p) | Porcentagem peso por peso |
| mL | Mililitro |
| mg | Miligrama |
| mm | Milímetro |
| µm | Micrometro |
| nm | Nanometro |
| µL | Microlitro |
| mL/min | Mililitro por minuto |
| °C/min | Grau Celsius por minuto |
| mA | Miliampère |
| kV | Quilovolt |
| θ | Teta |
| s | Segundos |
| rpm | Rotação por minuto |

| | |
|------------------|-------------------------------|
| cm^{-1} | Centímetro a menos um |
| CPS | Contagem por segundo |
| h | Horas |
| % (v/v) | Porcentagem volume por volume |
| mg/kg | Miligramma por quilograma |
| cm | Centímetro |
| mL/kg | Mililitro por quilograma |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO | 21 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 24 |
| 1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS | 25 |
| 1.1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS | 26 |
| 1.1.1. Sistemas poliméricos implantáveis | 27 |
| 1.1.1.1. O poli(ácido lático-co-ácido glicólico) | 29 |
| 1.1.1.1.1. Aplicações clínicas de sistemas de liberação a base de PLGA | 33 |
| 2. SIROLIMUS | 35 |
| 2.1. HISTÓRIA..... | 35 |
| 2.2. MECANISMO DE AÇÃO | 36 |
| 2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS | 37 |
| 2.4. UTILIZAÇÃO CLÍNICA DO SRL..... | 39 |
| OBJETIVOS | 42 |
| 1. OBJETIVO GERAL | 43 |
| 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 43 |
| PARTE I: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS IMPLANTES | 44 |
| 1. MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 1.1. MATERIAIS | 45 |
| 1.2. MÉTODOS | 45 |
| 1.2.1. Desenvolvimento dos implantes contendo SRL..... | 45 |
| 1.2.2. Determinação do peso médio e da uniformidade de doses unitárias..... | 46 |
| 1.2.3. Análise Termogravimétrica (TG) | 47 |
| 1.2.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)..... | 47 |
| 1.2.5. Difração de raios-X (DRX) | 47 |
| 1.2.6. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) | 48 |
| 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 49 |
| 2.1. DESENVOLVIMENTO DOS IMPLANTES CONTENDO SRL | 49 |
| 2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS IMPLANTES DESENVOLVIDOS..... | 50 |
| 2.2.1. Análise Termogravimétrica (TG) | 50 |
| 2.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)..... | 53 |
| 2.2.3. Difração de raios-X (DRX) | 57 |
| 2.2.4. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) | 64 |

| | |
|---|-----------|
| 3. CONCLUSÃO..... | 68 |
| PARTE II: AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS IMPLANTES | 69 |
| 1. MATERIAIS E MÉTODOS | 70 |
| 1.1. MATERIAIS | 70 |
| 1.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS | 70 |
| 1.3. MÉTODOS | 71 |
| 1.3.1. Estudo de liberação <i>in vivo</i> | 71 |
| 1.3.2. Estudo de biodegradação <i>in vivo</i> | 72 |
| 1.3.3. Histologia..... | 73 |
| 1.3.4. Formação de tecido fibrovascular induzida por implante subcutâneo de um <i>pellet</i> de algodão | 73 |
| 1.3.5. Análise estatística..... | 74 |
| 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 75 |
| 2.1. ESTUDO DE LIBERAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO <i>IN VIVO</i> | 75 |
| 2.2. HISTOLOGIA..... | 79 |
| 2.3. FORMAÇÃO DE TECIDO FIBROVASCULAR INDUZIDA POR IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE UM <i>PELLET</i> DE ALGODÃO .. | 82 |
| 3. CONCLUSÃO..... | 88 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS..... | 89 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 91 |

INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação sólidos, na forma de implantes, representam uma forma farmacêutica inovadora de grande potencial no tratamento de algumas doenças, uma vez que são capazes de promover: 1) a manutenção de níveis terapêuticos seguros e eficazes por um período de tempo prolongado; 2) a liberação do fármaco diretamente no local de ação, protegendo os compostos da inativação antes de atingirem o local de ação e; 3) a diminuição ou eliminação dos efeitos adversos provocados quando os mesmos são administrados pela via sistêmica (NIDHI *et al.*, 2016; PEYMAN, GANIBAN, 1995; VELEZ, WHITCUP, 1999; YASUKAWA *et al.*, 2004).

Os implantes são preparados a partir de diferentes polímeros, os quais podem ser biodegradáveis ou não-biodegradáveis. Os polímeros não-biodegradáveis apresentam uma liberação relativamente constante do fármaco, o que é desejável, mas não são absorvidos pelo organismo, sendo necessária a remoção posterior. Já os polímeros biodegradáveis apresentam vantagens sobre os anteriores, pois são totalmente metabolizados e absorvidos pelo organismo, não necessitando de remoção subsequente, após a completa liberação do fármaco, o que proporciona maior adesão do paciente ao tratamento (YASUKAWA *et al.*, 2001).

O sirolimus (SRL), um antibiótico macrocíclico produzido por *Streptomyces hygroscopicus*, é um agente imunossupressor indicado para a profilaxia da rejeição de órgãos em transplantes renais (GEISLER *et al.*, 2008; SEHGAL, 1998; VÉZINA *et al.*, 1975). Esse agente inibe a proliferação de linfócitos T, bem como a produção de anticorpos, por meio da inibição da ativação do alvo da rapamicina em mamífero (mTOR), uma quinase crítica para a progressão do ciclo celular (SEHGAL, 1998; ZAZA *et al.*, 2013).

Na literatura especializada podem ser encontrados diversos estudos que demonstram diferentes funções terapêuticas do SRL, dentre elas ações antifúngica, anti-inflamatória, imunossupressora, citostática e anti-angiogênica, com uso potencial no tratamento de múltiplas doenças (ELSAID *et al.*, 2014; GUBA *et al.*, 2002; SEHGAL, 2003). No entanto, a administração sistêmica do SRL está associada a ocorrência de efeitos adversos, tais como: anemia, retardo da cicatrização de feridas, proteinúria, mielosupressão, dislipidemia e diabetes mellitus tipo 2 (FUHRMANN *et al.*, 2014; JÓŹWIAK, KSIĄZEK, 2013). A incidência desses efeitos adversos em pacientes que receberam transplante renal e estão em terapia com SRL é frequente, o que requer um maior cuidado durante a terapia a fim de se evitar possíveis doenças

graves decorrentes da terapia imunossupressor (ZAZA *et al.*, 2013). Na maioria dos casos, a presença de efeitos adversos está relacionada com o tempo de tratamento, bem como, com a dose administrada. Assim, considerando as características inerentes aos sistemas de liberação controlada de fármacos, o desenvolvimento de implantes contendo SRL pode ser uma alternativa promissora para a veiculação desse fármaco.

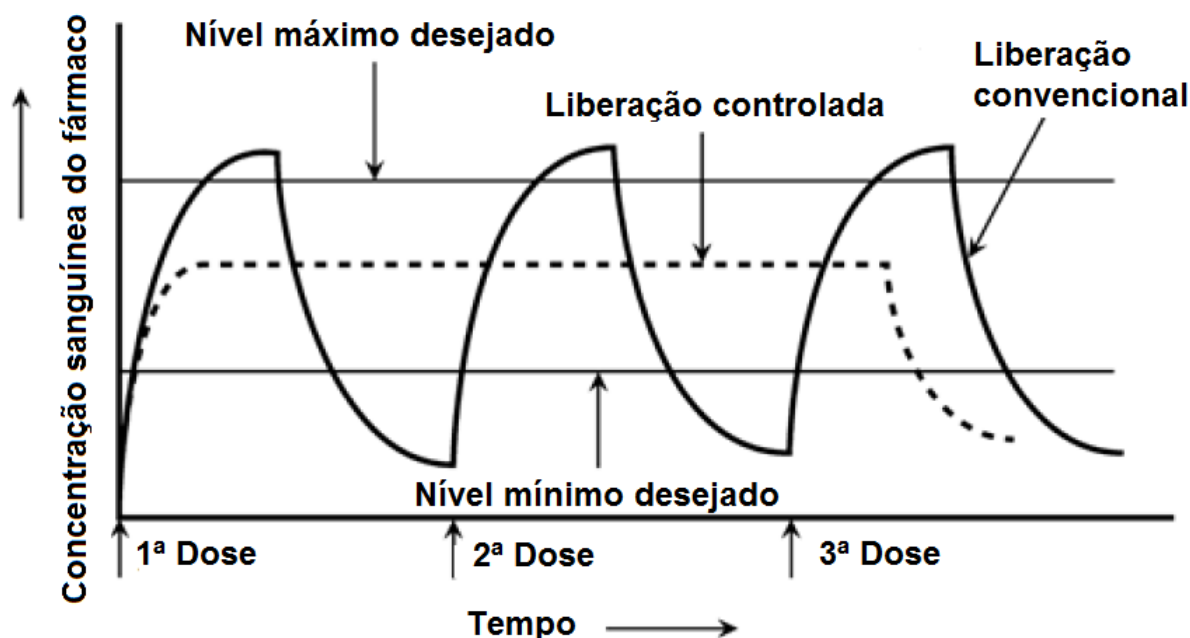
Nesse contexto, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação do comportamento *in vivo* de implantes à base do polímero biodegradável poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA 50:50, contendo SRL, a fim de proporcionar uma forma farmacêutica inovadora de veiculação desse fármaco, a qual poderá ser aplicada na terapia de diferentes doenças.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Sistemas de liberação de fármacos

Sistemas de liberação de fármacos são caracterizados por disponibilizar o princípio ativo incorporado na forma farmacêutica, para a absorção pelo organismo (ANSEL *et al.*, 2000). Após administração, o fármaco pode ser liberado de forma convencional ou controlada (**Figura 1**). A forma convencional consiste na liberação rápida, logo após a administração do medicamento, fornecendo um pico da concentração sanguínea do fármaco, que pode alcançar níveis acima daquele desejado para a ação terapêutica, resultando na ocorrência de efeitos adversos. O pico da concentração do ativo é seguido da sua redução, que normalmente atinge níveis subterapêuticos, requerendo assim, administrações repetidas do medicamento. Por outro lado, a liberação controlada permite a manutenção da concentração sanguínea do fármaco dentro da faixa terapêutica, contribuindo para uma melhor posologia do medicamento e menor incidência de efeitos adversos (DASH, CUDWORTH II, 1998; STAMATIALIS *et al.*, 2008).

Figura 1. Perfis de liberação de um fármaco em função do tempo: convencional x controlada.



Fonte: Adaptado de STAMATIALIS *et al.*, 2008.

1.1. Sistemas de liberação controlada de fármacos

Os sistemas de liberação controlada de fármacos modulam a liberação do fármaco após sua administração, e/ou permitem a condução do ativo até o sítio específico de ação, a fim de melhorar a resposta farmacológica promovida pelo medicamento (PEZZINI *et al.*, 2007). Há diferentes formas de liberação controlada de fármacos, dentre elas a retardada, a prolongada e a direcionada. Na forma retardada, a liberação do ativo não acontece logo após a administração do medicamento, mas num momento tardio predeterminado, após o qual a liberação ocorre de forma praticamente imediata (BHUSAL *et al.*, 2016; MANADAS *et al.*, 2002). A forma prolongada descreve basicamente os sistemas que promovem a liberação do fármaco por tempo prolongado. E a forma direcionada, por sua vez descreve os sistemas que objetivam o acúmulo do ativo em um local específico (BHUSAL *et al.*, 2016).

A modulação da liberação do fármaco, bem como o direcionamento ao local de ação promovidos pelos sistemas de liberação controlada, além de protegerem o fármaco de possível inativação antes de atingir o local requerido (NIDHI *et al.*, 2016), disponibilizam concentrações terapêuticas seguras e eficazes no local desejado por tempo prolongado, sem oscilações significativas da concentração sanguínea, evitando níveis subterapêuticos ou tóxicos (COSTA, LOBO, 1999; PEZZINI *et al.*, 2007; STAMATIALIS *et al.*, 2008). Nesse contexto, contribuem para uma menor incidência de efeitos adversos e uma melhor posologia do tratamento, com administrações menos frequentes do medicamento, em comparação com os sistemas de liberação convencional. Essas características favorecem o aumento da adesão do paciente ao tratamento, resultando na maior eficácia do mesmo (NIDHI *et al.*, 2016; PEZZINI *et al.*, 2007).

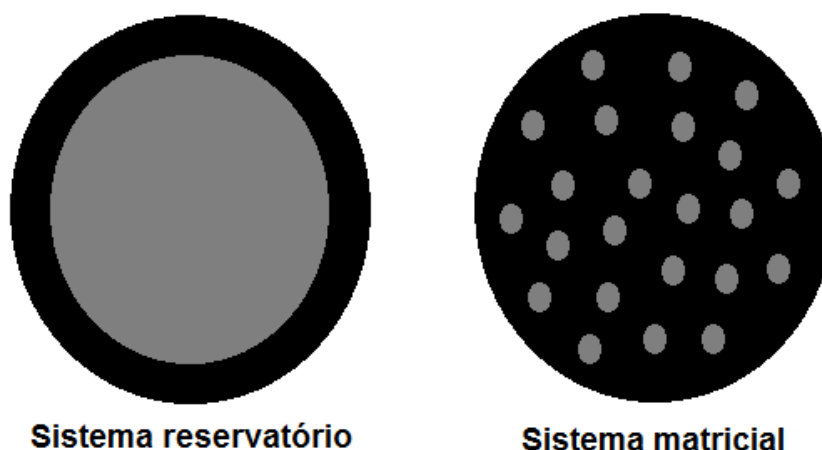
A síntese dos sistemas de liberação controlada consiste na associação, química e/ou física, dos fármacos à materiais transportadores, tais como polímeros naturais ou sintéticos, lipídios, fosfolipídios e compostos organometálicos, os quais modulam a liberação do fármaco. Assim, alguns dos atuais exemplos de sistemas de liberação controlada incluem: as micro ou nanopartículas poliméricas, metálicas e lipídicas; os lipossomas e os sistemas poliméricos implantáveis (implantes) (LIU *et al.*, 2016; RAWAT *et al.*, 2006).

1.1.1. Sistemas poliméricos implantáveis

Os sistemas de liberação sólidos, na forma de implantes, visam a liberação do fármaco diretamente no local de ação e por tempo prolongado. Ao serem inseridos diretamente no local de ação, liberam o ativo localmente evitando a sua possível inativação antes de atingir o local requerido, desse modo, permitem a administração de menores doses do medicamento, o que contribui para uma menor incidência de efeitos secundários indesejáveis (NIDHI *et al.*, 2016). Além disso, são sistemas que fornecem o fármaco na dose requerida e durante o período de tempo desejado, uma vez que, podem ser removidos caso necessário (BHUSAL *et al.*, 2016). Assim, sistemas poliméricos implantáveis representam uma forma farmacêutica inovadora de grande potencial no tratamento de algumas doenças.

De acordo com a distribuição do fármaco na matriz polimérica, os implantes podem estruturar-se em sistemas reservatórios ou matriciais (sistemas monolíticos) (**Figura 2**). Os sistemas reservatórios, são caracterizados pela presença do fármaco, disperso ou em solução, no interior da cavidade revestida pelo polímero. O revestimento polimérico forma uma membrana, a qual controla a taxa de liberação do fármaco. Já os sistemas matriciais são aqueles cujo fármaco encontra-se disperso na matriz polimérica e a sua liberação é mediada pela difusão através dos poros da matriz, pela degradação do polímero ou pela combinação desses dois mecanismos (FIALHO *et al.*, 2003; YASUKAWA *et al.*, 2004).

Figura 2. Sistemas de liberação do tipo matricial e reservatório.



Os implantes podem apresentar diferentes formas, incluindo discos, bastões ou membranas e duração de ação que varia de meses a anos, dependendo do tipo de polímero empregado e das propriedades do fármaco veiculado (SHAH *et al.*, 2010; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011). Esses sistemas devem ser biocompatíveis com o organismo, portanto, seus componentes devem ser quimicamente inertes, não carcinogênicos, hipoalergênicos e mecanicamente estáveis (ATHANASIOU *et al.*, 1996; FIALHO *et al.*, 2003). Assim, podem ser preparados a partir de diferentes materiais, dentre eles, os polímeros não biodegradáveis e biodegradáveis.

Os polímeros não biodegradáveis comumente utilizados são o poli(álcool vinílico), PVA, o poli(etileno-co-acetato de vinila), EVA e o silicone (THRIMAWITHANA *et al.*, 2011). Em implantes não biodegradáveis, a liberação do fármaco ocorre por meio da sua difusão através da membrana polimérica (FIALHO *et al.*, 2003), além de ser uma difusão lenta, o que permite um maior tempo de liberação do fármaco a partir dos implantes, não há um *burst* inicial de liberação, resultando numa cinética controlada. Entretanto, por não serem biodegradáveis requerem a retirada do dispositivo após completa liberação do fármaco, normalmente por um método invasivo, que causa desconforto ao paciente (KIMURA, OGURA, 2001; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011; YASUKAWA *et al.*, 2004).

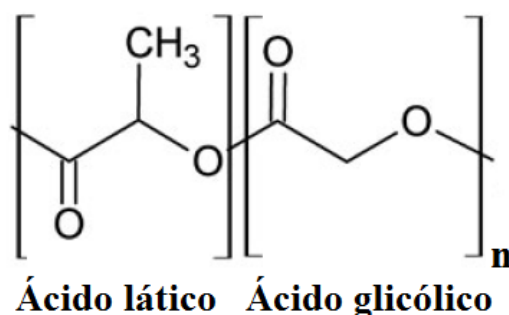
Dessa forma, pesquisas com polímeros biodegradáveis têm crescido, uma vez que, por meio de reações enzimáticas, eles são convertidos em seus monômeros ou subprodutos, os quais são eliminados pelo próprio organismo. Assim, não exigem uma remoção subsequente, proporcionando melhor adesão e aceitação do paciente ao tratamento (KIMURA, OGURA, 2001; SHAH *et al.*, 2010). Os sistemas biodegradáveis devem ser estáveis, gerar subprodutos não tóxicos e a cinética de degradação dos polímeros *in vivo* deve manter-se constante, a fim de promover uma liberação controlada do fármaco. Nesse contexto, diversas variáveis devem ser consideradas no desenvolvimento de implantes biodegradáveis dentre elas: a quantidade de fármaco veiculada, a área superficial e o volume do implante, a composição e peso molecular do polímero, as características físico-químicas do fármaco e as características do local de implantação, como pH e temperatura, os quais podem promover um aumento ou uma redução na velocidade de degradação do polímero e, conseqüentemente, de liberação do fármaco (DASH, CUDWORTH II, 1998; KIM *et al.*, 2014; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

Os poliésteres sintéticos, tais como a poli- ϵ -caprolactona (PCL) e os polímeros e copolímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico, como o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido glicólico) (PGA) e os diferentes tipos de PLGA, são, atualmente, os polímeros biodegradáveis normalmente utilizados no preparo de sistemas de liberação biodegradáveis (FIALHO *et al.*, 2003; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

1.1.1.1. O poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

O PLGA (**Figura 3**) é um copolímero sintético dos monômeros de ácido láctico e ácido glicólico que tem sido extensamente utilizado em tecnologia farmacêutica, devido a capacidade de se biodegradar no organismo humano gerando subprodutos biocompatíveis, passíveis de serem eliminados através do metabolismo. Sua utilização na síntese de sistemas de liberação de fármacos já foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) (AMJADI *et al.*, 2013; JAIN *et al.*, 1998).

Figura 3. Estrutura química do poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA).



n = número de monômeros de ácidos láctico e glicólico

Fonte: Adaptado de BLASI *et al.*, 2007.

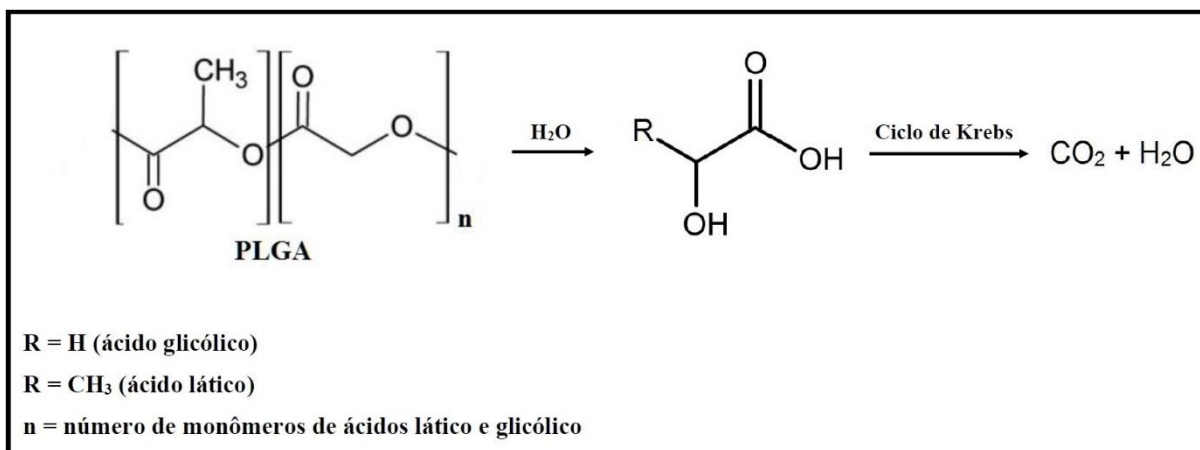
Esse polímero pode ser sintetizado através da condensação direta (poliesterificação) dos monômeros de ácido láctico e glicólico ou por meio da abertura e polimerização dos dímeros cíclicos desses ácidos. Durante o processo, pode-se controlar a massa molecular e as proporções de ácido láctico e glicólico do polímero a ser obtido (FIALHO *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 1998). As diferentes proporções entre ácido láctico e glicólico resultam em polímeros com velocidade de degradação distintos, quanto maior a proporção de ácido láctico (que possui grupo metila, $-\text{CH}_3$), maior a

hidrofobicidade do copolímero e por conseguinte, menor a sua velocidade de degradação. Dessa forma, a velocidade de degradação do PLGA 85:15 (85% de ácido lático e 15% de ácido glicólico) é menor que a do PLGA 75:25 (75% de ácido lático e 25% de ácido glicólico) que, por sua vez, é menor que a do PLGA 50:50 (50% de ácido lático e 50% de ácido glicólico) (FIALHO *et al.*, 2003). Outros fatores que também influenciam a velocidade de degradação do polímero são a massa molecular e o grau de cristalinidade, os quais podem alterar as propriedades mecânicas e o mecanismo de hidrólise do polímero (FIALHO *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 1998).

O grau de cristalinidade do polímero pode ser avaliado por meio da temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero, a qual determina o ponto de transição entre uma estrutura rígida (estado vítreo) e uma estrutura mais maleável (BLASI *et al.*, 2005 e 2007; JAIN *et al.*, 1998). Esse parâmetro também é dependente das proporções de ácido lático e glicólico na estrutura, sendo o PLGA que apresenta maior T_g , aquele com maior proporção de ácido lático e, então, o que degrada mais lentamente (JAIN *et al.*, 1998 e 2000). Os diferentes tipos de PLGA apresentam temperatura de transição vítrea na faixa de 45°C - 60°C, temperatura acima da fisiológica (37°C), assim, no organismo, possuem estrutura rígida, o que lhes confere resistência mecânica adequada para serem utilizados em sistemas de liberação de fármacos (FIALHO *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 1998).

Outras características do PLGA que favorecem a sua utilização em tecnologia farmacêutica, são a biodegradabilidade e biocompatibilidade. A biodegradação (**Figura 4**) desse polímero ocorre por erosão, por meio da clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando os ácidos lático e glicólico. Esses ácidos são metabólitos naturais do organismo, os quais são eliminados na forma de gás carbônico e água através do ciclo de Krebs. Desse modo, não apresentam toxicidade, conferindo biocompatibilidade ao polímero (FIALHO *et al.*, 2003).

Figura 4. Mecanismo de hidrólise do PLGA.



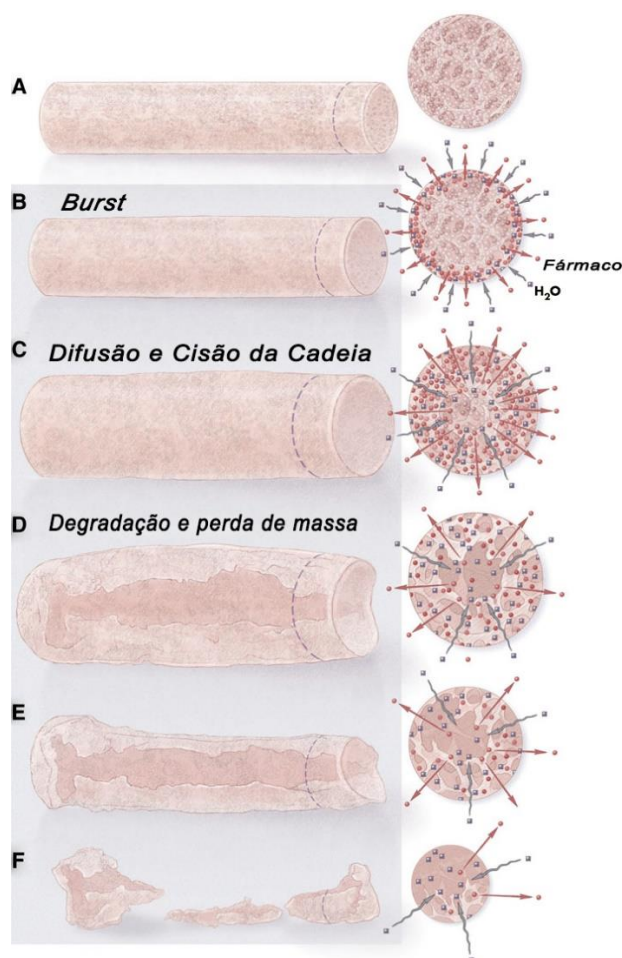
Fonte: Adaptado de FIALHO *et al.*, 2003.

Com base nisso, o PLGA tem sido frequentemente utilizado na síntese de sistemas de liberação de fármacos, dentre eles, os sistemas poliméricos implantáveis, que podem ser obtidos por meio de três principais técnicas: a moldagem, que consiste na submissão da mistura homogênea de pós (contendo o polímero e o fármaco) ao aquecimento e/ou pressão, em um molde que apresenta a forma do implante; a extrusão, na qual a mistura de pós é propulsionada continuamente pelo equipamento, passando por regiões de alta temperatura e pressão, onde ela é fundida e compactada na forma final do implante; e a preparação de filmes, que pode ser realizada pelo aquecimento e pressão da mistura de pós ou, mais comumente, pela solubilização dos componentes do implante em solvente comum apropriado, seguida da deposição dessa solução sobre uma superfície lisa e não-adesiva, onde haverá a evaporação e, então, a formação do filme sobre a superfície (KIMURA, OGURA, 2001; YASUKAWA *et al.*, 2004).

Em sistemas matriciais a base de PLGA, a liberação do fármaco se dá pela difusão do fármaco através da matriz polimérica associada a degradação do polímero. O processo de degradação do PLGA ocorre em três fases, sendo que inicialmente há a cisão da cadeia polimérica, sem perda de massa e ausência de formação dos subprodutos, seguida da fase média, na qual há significativa perda de massa acompanhada da formação dos produtos de degradação e da fase final, que há a completa degradação do polímero (JAIN *et al.*, 1998). LEE e colaboradores (2010), propuseram um mecanismo de liberação do fármaco a partir de implantes a base de PLGA (**Figura 5**), o qual sugere que logo após a implantação dos sistemas no

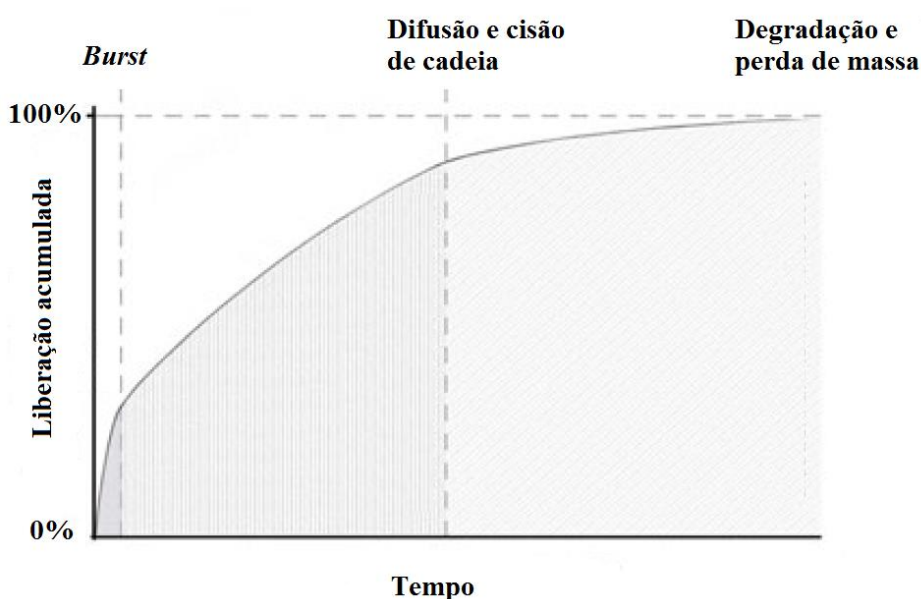
organismo, há uma brusca liberação do fármaco que encontra-se na superfície do implante (*burst*). Em seguida, inicia-se a degradação do polímero, com a cisão da cadeia polimérica, que aumenta a área da superfície e a porosidade dos sistemas, resultando numa maior penetração dos fluidos do local de implantação, favorecendo a difusão e consequente liberação do fármaco (denominada fase de difusão e cisão de cadeia). Por fim, inicia-se a perda de massa, primeiramente no núcleo dos sistemas, que se estende até a completa degradação do polímero (fase de degradação e perda de massa). Nessa última fase observa-se alterações na forma dos implantes e a liberação do fármaco está associada a degradação polimérica, podendo em alguns sistemas de liberação, haver um *burst* final.

Figura 5. Mecanismo de liberação do fármaco a partir de implantes a base de PLGA. (A) Implante antes de inserido no organismo, apresentando matriz homogênea e porosa. (B) *Burst* inicial. (C) Difusão do fármaco pela matriz polimérica. (D, E, F) Degradação do polímero com perda de massa, inicialmente central até completa degradação.



Sistemas implantáveis a base de PLGA são capazes de liberar o fármaco por tempo prolongado, como apresentado na **Figura 6**. Porém, em geral, apresentam um perfil de liberação adequado para o tratamento de doenças de início agudo e que requerem doses contínuas mais baixas ao longo de vários meses, uma vez que esses sistemas fornecem uma liberação inicial rápida com elevada concentração de fármaco, seguida de liberação prolongada contínua com doses mais baixas (LEE *et al.*, 2010).

Figura 6. Perfil de liberação do fármaco fornecido por implantes a base de PLGA.



Fonte: Adaptado de LEE *et al.*, 2010.

1.1.1.1.1. Aplicações clínicas de sistemas de liberação a base de PLGA

O PLGA tem sido utilizado em diferentes aplicações médicas, tais como fios de sutura, implantes/próteses médicas e sistemas de liberação de fármacos (JAIN *et al.*, 1998). Atualmente, sistemas poliméricos a base de PLGA para veiculação de diferentes fármacos, estão sendo estudados e outros já foram aprovados pelo FDA, para utilização na terapia de variadas condições clínicas, como doenças oculares e câncer. No quadro 1, estão apresentadas algumas formas farmacêuticas a base de PLGA que já foram aprovadas para utilização médica pelo FDA.

Quadro 1. Formas farmacêuticas a base de PLGA.

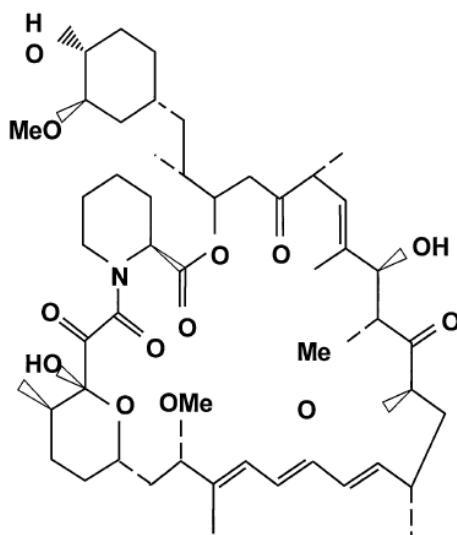
| Forma farmacêutica | Aplicação | Referência |
|---|---|--|
| Ozurdex® - Implante intravítreo em forma de bastão a base de PLGA, contendo dexametasona. | Indicado para o tratamento de uveíte posterior não infecciosa, edema macular diabético ou associado a oclusão da veia retinal. | FDA; BARRY <i>et al.</i> , 2014; LEE <i>et al.</i> , 2010. |
| Risperdal® Consta® - microesferas de PLGA contendo risperidona. | Indicado para o tratamento da esquizofrenia e outros distúrbios psiquiátricos. | FDA; WAAL <i>et al.</i> , 2012. |
| Bydureon™ - microesferas a base de PLGA contendo exenatida. | Indicado para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2. | FDA; CAI <i>et al.</i> , 2013. |
| Eligard® - implantes de formação <i>in situ</i> a base de PLGA contendo leuprolida. | Indicado para o tratamento de câncer de próstata. | FDA; SCHWENDE MANA <i>et al.</i> , 2014. |
| Zoladex® - implantes cilíndricos a base de PLGA contendo goserrelina. | Indicado para o tratamento de câncer de próstata. | FDA; SCHWENDE MANA <i>et al.</i> , 2014. |
| Signifor® Lar – microesferas de PLGA contendo um análogo da somatostatina. | Indicado para o tratamento de pacientes com acromegalia que tiveram uma resposta inadequada à cirurgia e/ou para os quais a cirurgia não é uma opção. | FDA; MCKEAGE, 2015. |
| Synergy™ - stent coronário com revestimento de PLGA, contendo everolimus. | Indicado para melhorar o diâmetro luminal em pacientes com distúrbios coronários. | FDA; MENNUNI <i>et al.</i> , 2016. |

2. Sirolimus

2.1. História

O SRL (**Figura 7**), é um antibiótico macrocíclico, cuja descoberta se iniciou em 1965, quando um grupo de pesquisadores canadenses que realizavam a busca por novos fármacos bactericidas de origem natural, coletaram amostras do solo de Vai Atare, região de Rapa Nui, também conhecida como Ilha da Páscoa, no Chile, a partir da qual foram isoladas bactérias da linhagem *Streptomyces hygroscopicus* (ABRAHAM *et al.*, 2010; SEHGAL *et al.*, 1975; SEHGAL, 2003; VÉZINA *et al.*, 1975).

Figura 7. Estrutura química do sirolimus (SRL).



Fonte: SEHGAL, 2003.

A partir do micélio do microrganismo foi isolado o princípio ativo, um composto cristalino denominado rapamicina (etimologia: RAPA [Rapa Nui] – mycin), o qual demonstrou potente ação antifúngica, especialmente contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* e ação antibacteriana limitada, sendo eficaz apenas contra algumas espécies de bactérias gram positivas, tais como *Sarcina lutea* e *Staphylococcus aureus* (VÉZINA *et al.*, 1975). O antibiótico recebeu o nome genérico sirolimus e o nome comercial Rapamune® (SEHGAL, 2003).

Entretanto, o interesse sobre o SRL cresceu quando pesquisadores japoneses descobriram outro fármaco derivado do *Streptomyces*, o FK506

(tacrolimus), o qual apresentou atividade imunossupressora elevada e cuja estrutura era muito semelhante à do SRL (ABRAHAM *et al.*, 2010; JOHNSTON *et al.*, 2005). Dessa forma, a fim de investigar a atividade farmacológica de SRL, foram realizados estudos que demonstraram sua potente ação imunossupressora. Foi então que na década de noventa o uso de SRL foi aprovado pelo FDA, como agente imunossupressor indicado para a profilaxia da rejeição de órgãos em pacientes que receberam transplantes renais e, mais recentemente, em 2003, o FDA aprovou o uso de stents revestidos com SRL para uso em angioplastia (KAHAN, 2004; MACDONALD *et al.*, 2000).

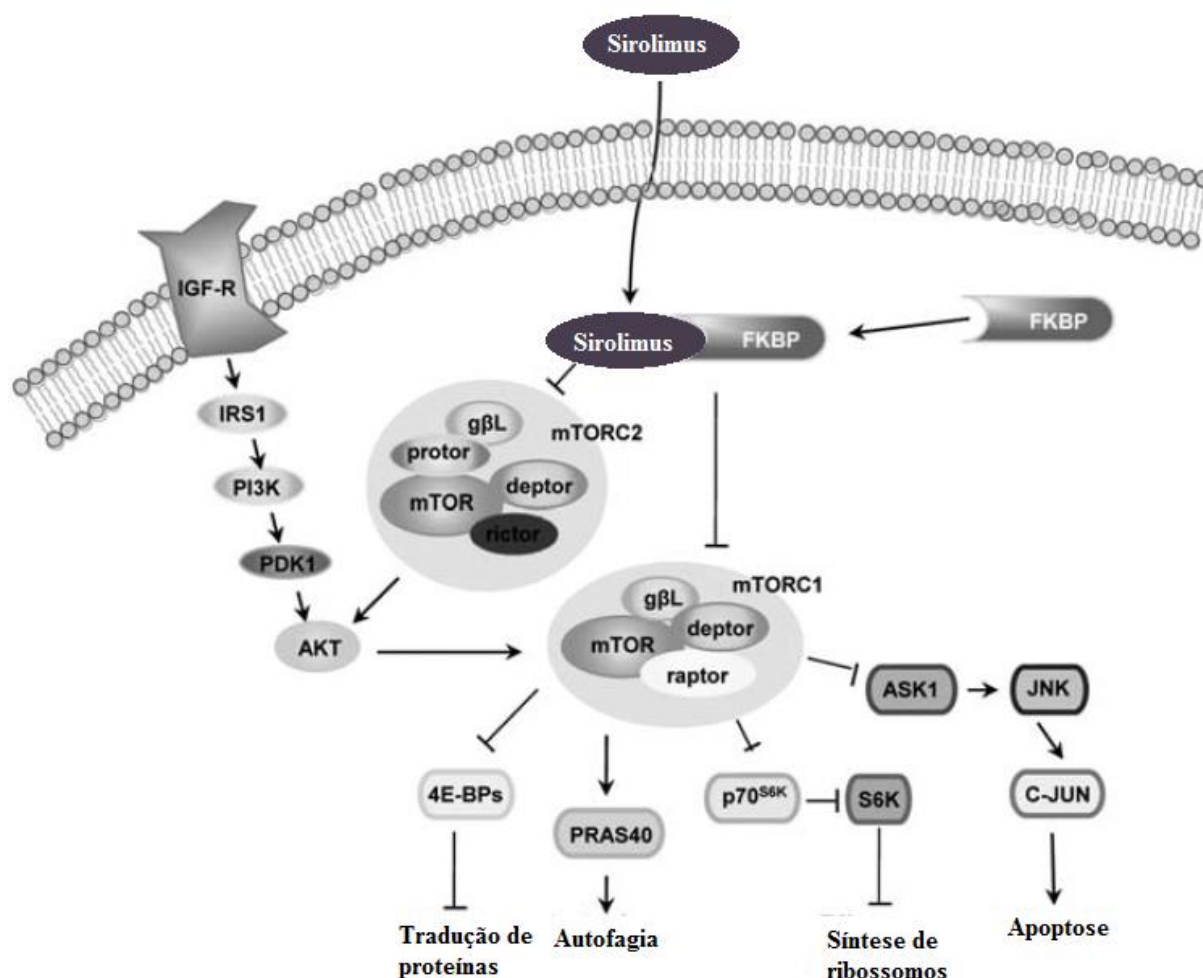
Atualmente, diversos estudos vêm sendo realizados, a fim de comprovar a atividade anti-inflamatória, citostática e anti-angiogênica do SRL, demonstrando seu potencial efeito no tratamento de câncer e diversas doenças inflamatórias crônicas (GUBA, 2002; MITA *et al.*, 2003; ONYESOM *et al.*, 2013).

2.2. Mecanismo de ação

Fármacos como o SRL, o tacrolimus e a ciclosporina A exercem sua atividade imunossupressora após interagirem com proteínas citosólicas específicas (imunofilinas). Diferentemente dos mecanismos de ação da ciclosporina A e do tacrolimus, o mecanismo do SRL (**Figura 8**) não altera a atividade da calcineurina (MACDONALD *et al.*, 2000).

O SRL interage com a proteína de ligação FK-12 para formar um complexo FKBP 12-SRL, o qual inibe a ativação de mTOR, uma quinase crítica para a progressão do ciclo celular. A inibição de mTOR pelo SRL, suprime principalmente, a ativação das proteínas S6K e 4E-BP1, as quais estão envolvidas na síntese de fatores associados ao crescimento e proliferação celulares. Desse modo, há a supressão da expressão de citocinas e receptores dos fatores de crescimento das células T, resultando no bloqueio da progressão do ciclo celular na fase de transição de G1→S e, então, na ação imunossupressora do SRL (ABRAHAM *et al.*, 2010; GUBA *et al.*, 2002; JOHNSTON *et al.*, 2005; SEHGAL, 1998; ZAZA *et al.*, 2013).

Figura 8. Mecanismo de ação do SRL.



Fonte: Adaptado de PARK *et al.*, 2010.

2.3. Características físico-químicas

O SRL (**Tabela 1**) se apresenta como um sólido branco, cristalino que apresenta fusão em temperatura de 183 – 185 °C. É uma molécula de elevada massa molecular (914,2 g/mol), lipofílica (Log P_{O/A} = 5,77), que não contém grupos funcionais ionizáveis no intervalo de pH entre 1 e 10, praticamente insolúvel em água (2,6 µg/mL) e solúvel na maioria dos solventes orgânicos (SEHGAL, 2003; SIMAMORA *et al.*, 2001; YÁÑEZ *et al.*, 2008).

Tabela 1. Características físico-químicas do fármaco SRL.

| Sirolimus | |
|-----------------------------|--|
| Aspecto | Sólido branco |
| Temperatura de fusão | 183 – 185 °C |
| Massa molecular | 914,2 g |
| Log P_{O/A} | 5,77 |
| Fórmula molecular | C ₅₁ H ₇₉ NO ₁₃ |
| Solubilidade em água | 2.6 µg/mL |

Estudos que avaliaram o perfil farmacocinético do SRL mostraram que, após administração oral, o fármaco é pouco, embora rapidamente absorvido: apresenta baixa biodisponibilidade (<15%) e o pico da concentração do fármaco ocorre entre vinte minutos e duas horas após dose única. É metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 3A4 16 dando origem a diversos metabólitos, incluindo hidroxil, desmetil e hidroxidesmetil sirolimus, os quais apresentam atividade imunossupressora pouco estudada. O tempo de meia-vida é relativamente longo, cerca de 62 horas (ocorrendo em um intervalo de 35 a 95 horas). O SRL liga-se principalmente aos eritrócitos (~95%). Sua eliminação ocorre, principalmente, pela via fecal, sendo eliminado em pequena quantidade na urina. No uso como imunossupressor, a monitorização terapêutica dos níveis sanguíneos de SRL é recomendada e o intervalo de concentração de 5-15 ng/mL deve ser mantido (JOZWIAK *et al.*, 2006; KAYSER, 2004; MACDONALD *et al.*, 2000; TREPANIER *et al.*, 1998).

Devido às características físico-químicas (lipofilia) e farmacocinéticas (afinidade pelos eritrócitos) do fármaco, ele apresenta baixa biodisponibilidade e biodistribuição (YÁÑEZ *et al.*, 2008), o que torna a administração de SRL crítica, uma vez que, elevadas doses devem ser administradas para que o efeito terapêutico desejado seja alcançado. Dessa forma, efeitos adversos são frequentemente observados, o que limita a utilização clínica desse fármaco. Assim, há uma constante busca por alternativas para administração de SRL, incluindo o preparo de sistemas de liberação de fármacos, como microesferas poliméricas e lipossomos, objetivando melhorar o comportamento farmacocinético, a biodisponibilidade, a solubilidade e o perfil de liberação do fármaco (ONYESOM *et al.*, 2013).

2.4. Utilização clínica do SRL

O SRL, descoberto na década de 60, é atualmente utilizado como imunossupressor, na profilaxia da rejeição de transplantes renais (MACDONALD *et al.*, 2000) e como componente de stents arteriais, a fim de melhorar o diâmetro luminal em pacientes com distúrbios coronários (JOZWIAK *et al.*, 2006; KAHAN, 2004). Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de melhorar a eficácia e segurança de stents arteriais contendo SRL (BOZSAK *et al.*, 2015; PRADO *et al.*, 2015; SOJITRA *et al.*, 2015).

A atividade anti-inflamatória do SRL vem sendo relatada em diversos estudos. Em 2014, pesquisadores sugeriram que a redução da expressão das citocinas inflamatórias, IL-6 e IL-1 β , promovida pela administração intra-articular de SRL, retarda a progressão da osteoartrite em camundongos (MATSUZAKI *et al.*, 2014). Li e colaboradores (2015), em um estudo *in vitro* demonstraram que SRL é capaz de aumentar a secreção do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) por linfócitos T CD4+. Essa proteína é capaz de mediar a apoptose, estimular o crescimento de fibroblastos e a produção de matriz extracelular e apresentar atividade anti-inflamatória, sugerindo, dessa forma, que SRL pode ser eficaz no tratamento de diversas condições inflamatórias. Em 2016, outros pesquisadores também demonstraram a ação anti-inflamatória de SRL, por meio da comprovação da eficácia e segurança da terapia intravítrea de SRL em indivíduos com uveíte não infecciosa do segmento posterior do olho (NGUYEN *et al.*, 2016; NGUYEN, SADIQ *et al.*, 2016).

Guba e colaboradores (2002) avaliaram a influência do SRL na síntese do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) por células de adenocarcinoma e em modelo de metástase de câncer colorretal no fígado de camundongos. Foi demonstrado que SRL diminui a produção do VEGF, bem como, inibi a resposta endotelial à estimulação com VEGF, resultando em inibição do crescimento tumoral e da angiogênese. Em outros estudos, relataram também que, por meio do bloqueio de mTOR, promovido por SRL, pode-se inibir o crescimento e proliferação das células tumorais. A mTOR é uma serina/treonina cinase (289 kDA) pertencente à família PIK3/AKT, cuja função envolve o controle da progressão e dos *check points* do ciclo celular que regem as respostas celulares a danos e recombinação de DNA. Como a via PIK3/AKT/mTOR encontra-se ativada ou com atividade aumentada em diversas células tumorais, sugere-se que fármacos inibidores da mTOR, como o SRL, podem

apresentar eficácia promissora na terapia de diferentes cânceres (BJORNSTI, HOUGHTON, 2004; MITA *et al.*, 2003; ONYESOM *et al.*, 2013). Diante disso, estudos clínicos e pré-clínicos têm avaliado o potencial desse fármaco em diversos tipos de câncer, tais como, vascular (STACCHIOTTI, *et al.*, 2016), colorretal (KHONDEE *et al.*, 2015), de fígado (PARK *et al.*, 2016), de intestino (KUMAR, LOKESH, 2014), de tireóide (MANOHAR *et al.*, 2015), de bexiga (PINTO-LEITE *et al.*, 2016), de mama (ELOY *et al.*, 2016; PARHI, SAHOO, 2015) e de próstata (IMRALI *et al.*, 2016).

No entanto, a administração sistêmica de SRL, frequentemente está associada a incidência de efeitos adversos que limitam a eficácia do tratamento. Com base nisso, a literatura relata diversos trabalhos que propõem formas farmacêuticas alternativas para administração de SRL, as quais objetivam melhorar o comportamento farmacocinético, a biodisponibilidade, a solubilidade e o perfil de liberação do fármaco (**Quadro 2**). A inclusão do SRL em sistemas como lipossomas, micropartículas e nanopartículas tem sido frequentemente estudada, entretanto ainda existem grandes desafios, dentre eles obter uma eficiência de encapsulação satisfatória e uma liberação do SRL com cinética controlada, por tempo prolongado. Parhi e Sahoo (2015) ao prepararem nanopartículas lipídicas carreadoras de SRL, obtiveram uma eficiência de encapsulação de apenas 48% e uma liberação por 21 dias, contudo, nos primeiros 3 dias de estudo aproximadamente 40% do fármaco já havia sido liberado. Ding e colaboradores (2015), desenvolveram um *scaffold* revestido com microesferas poliméricas contendo SRL com o objetivo de avaliar a capacidade desse sistema de regenerar o nervo ciático de ratos. Os resultados do estudo de liberação *in vitro* demonstraram que o sistema desenvolvido liberou aproximadamente 40% do SRL incorporado nos primeiros 4 dias e 100% do fármaco em apenas 14 dias.

Desse modo, apesar dos recentes avanços descritos na literatura, ainda são recorrentes as dificuldades envolvidas no desenvolvimento de formas farmacêuticas alternativas para administração do SRL, o que torna evidente o interesse científico pela busca de novos sistemas de liberação que possibilitem a veiculação de SRL de forma controlada e por tempo prolongado.

Quadro 2. Formas farmacêuticas inovadoras para veiculação de SRL.

| Forma farmacêutica | Referência |
|--|---------------------------------|
| Hidrogel de gelatina incorporado com micelas de SRL para administração intra-articular. | MATSUZAKI <i>et al.</i> , 2014. |
| Filmes de PCL contendo SRL para administração intraocular. | LANCE <i>et al.</i> , 2015. |
| <i>Scaffold</i> revestido com microesferas a base de PLGA contendo SRL para administração local. | DING <i>et al.</i> , 2015. |
| Microesferas a base de PLA-PEG e PLA contendo SRL para administração local (subcapsular) renal. | FALKE <i>et al.</i> , 2015. |
| Micelas conjugadas com o peptídeo LTTHYKL (ligante para neoplasia colorretal), contendo SRL, para administração sistêmica. | KHONDEE <i>et al.</i> , 2015. |
| Nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ e carboximetilquitosana contendo SRL para administração sistêmica. | LI, G <i>et al.</i> , 2015. |
| Micropartículas de sílica, com superfície modificada, contendo SRL para administração intravítrea. | NIETO <i>et al.</i> , 2015 |
| Lipossomas contendo paclitaxel e/ou SRL para administração sistêmica. | ELOY <i>et al.</i> , 2016. |
| Stent coronário revestido com PLGA contendo SRL, para intervenção coronária percutânea. | ROLEDER <i>et al.</i> , 2016. |
| Nanopartículas lipídicas contendo SRL para administração oral. | YU <i>et al.</i> , 2016. |
| Nanopartículas a base de albumina de soro humano contendo SRL para administração sistêmica. | WANG <i>et al.</i> , 2016. |

PLA-PEG: Poli(ácido láctico)-Polietilenoglicol.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar um implante biodegradável a base do copolímero PLGA 50:50 contendo SRL, bem como, avaliar a atividade anti-inflamatória em modelo experimental de inflamação crônica em camundongos.

2. Objetivos específicos

- Desenvolver os sistemas poliméricos à base do copolímero PLGA 50:50 contendo SRL.
- Caracterizar quimicamente os sistemas desenvolvidos por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, análises térmicas e difração de raios-X.
- Avaliar o perfil de liberação *in vivo* dos sistemas desenvolvidos.
- Avaliar a biodegradação *in vivo* dos sistemas desenvolvidos a partir das imagens obtidas por estereomicroscopia e microscopia eletrônica de varredura.
- Realizar a análise histológica do tecido do local de implantação dos sistemas.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos sistemas obtidos em modelo de inflamação crônica de formação de tecido fibrovascular.

PARTE I: Desenvolvimento e caracterização dos implantes

1. Materiais e métodos

1.1. Materiais

SRL (massa molecular 914,2 g/mol) foi cedido pelo Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Fármacos, Medicamentos e Cosméticos (FARMATEC) da Universidade Federal de Goiás (UFG) (Goiás, Brasil). PLGA 50:50, Resomer® RG 503 H, viscosidade inerente (v.i.) = 0.32 - 0.44 dl/g, foi fornecido pela Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co (Ingelheim, Alemanha). Metanol e acetonitrila foram obtidos da Merck Brasil (São Paulo, Brasil). Água ultrapura foi produzida por um sistema Milli-Q, Millipore (Massachusetts, EUA). Outros produtos químicos utilizados eram grau analítico.

1.2. Métodos

1.2.1. Desenvolvimento dos implantes contendo SRL

Os implantes biodegradáveis foram desenvolvidos pela técnica de moldagem a quente, descrita por Fialho e Silva Cunha (2005). O polímero PLGA 50:50 foi utilizado como matriz polimérica e o SRL, na proporção de 25% ou 40% (p/p), foi empregado como fármaco.

Primeiramente, o polímero e o fármaco foram solubilizados em quantidade suficiente de acetonitrila (2,0 mL para cerca de 100 mg da mistura física), gerando uma mistura homogênea, a qual foi congelada em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizada (liofilizador modelo K105, Liobrás) por um período de 24 horas, a fim de se extrair o solvente orgânico e obter uma mistura homogênea sólida. Por fim, a mistura liofilizada homogênea de pós foi moldada a quente utilizando uma placa de Teflon® aquecida na temperatura entre 100 e 120°C. Os implantes foram preparados na forma de bastões de forma a ter cerca de 6,0 mg e aproximadamente 1,5 mm de diâmetro e 4,5 mm de comprimento.

1.2.2. Determinação do peso médio e da uniformidade de doses unitárias

Com o objetivo de avaliar o peso médio dos sistemas desenvolvidos, 10 implantes selecionados aleatoriamente foram pesados e o resultado foi expresso em função da média \pm desvio padrão absoluto (DP) e relativo (DPR).

A fim de determinar a uniformidade da distribuição do fármaco nos implantes, os 10 implantes pesados anteriormente foram solubilizados em 10 mL de acetonitrila. Como padrão, foi preparada uma solução de 1,5 mg de SRL puro diluídos em 10 mL de acetonitrila. Os resultados foram expressos em função da média \pm DP e DPR. A quantidade de SRL presente nos sistemas foi determinada por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um método previamente desenvolvido e validado pelo grupo de pesquisa (dados não publicados), cujas condições cromatográficas estão apresentadas no quadro 3.

Quadro 3. Condições cromatográficas do método analítico.

| Parâmetro | Condições |
|-----------------------|--|
| Equipamento | Cromatógrafo líquido LabChrom Elite UV / VIS, Merck Hitachi, Malta, New York. Equipado com bomba L-2130, injetor automático L-2200, forno L-2300 e detector DAD (do inglês - <i>diode array detector</i>) L-2400. |
| Coluna | C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m (Modelo Luna®, Phenomenex). |
| Comprimento de onda | 278 nm |
| Volume de injeção | 20 μ L |
| Fluxo | 1,0 mL/min |
| Temperatura da coluna | 50°C |
| Tempo de corrida | 5 minutos |
| Fase móvel | Acetonitrila (grau CLAE) : Metanol (grau CLAE) (20:80) |
| Solução diluente | Acetonitrila (grau CLAE) |
| Tempo de retenção | Cerca de 3,0 minutos |

1.2.3. Análise Termogravimétrica (TG)

As curvas da análise termogravimétrica (TG) foram obtidas utilizando uma termobalança modelo DTG60 da Shimadzu. Amostras de aproximadamente 3 mg de SRL, PLGA 50:50, mistura liofilizada e implantes contendo 40% p/p de SRL foram colocadas em cadinhos de alumina (Al_2O_3) e analisadas em atmosfera dinâmica de nitrogênio (fluxo de 50 mL/min), sob um programa de aquecimento de 25°C a 500°C, com razão de aquecimento de 10 °C / min. As análises de TG da mistura liofilizada e dos implantes foram realizadas com uma maior proporção do fármaco (40% p/p), a fim de aumentar o sinal referente ao SRL e permitir uma avaliação mais segura.

1.2.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram realizadas utilizando o calorímetro modelo Q2000 (TA Instruments, EUA). Amostras de cerca de 2 mg (SRL, PLGA 50:50, PLGA 50:50 liofilizado, implante de PLGA 50:50, mistura liofilizada e implantes contendo 40% p/p de SRL) foram pesadas e seladas em cadinho semi-hermético de alumínio de 40 μ L. As curvas foram obtidas na faixa de temperatura de 25 a 250°C, usando uma razão de aquecimento de 10 °C / min, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (fluxo de 50 mL/min). As análises de DSC da mistura liofilizada e dos implantes foram realizadas com uma maior proporção do fármaco (40% p/p), a fim de aumentar o sinal referente ao SRL e permitir uma avaliação mais segura.

1.2.5. Difração de raios-X (DRX)

Neste trabalho, as amostras (PLGA 50:50, PLGA 50:50 liofilizado, implante PLGA 50:50, SRL, SRL liofilizado, SRL liofilizado e aquecido a 120°C, mistura liofilizada e implantes contendo 40% p/p de SRL) foram analisadas em um difratômetro da Shimadzu. Foi utilizada uma fonte de cobre ($Cu K\alpha$) como alvo para emissão dos raios X, uma corrente de 30 mA e voltagem de 40 kV. A varredura iniciou em 2θ na posição 5° até a posição 40°, com passo de 0,02° e tempo de coleta de 1,2s. As análises usaram uma geometria de focagem paralela abaixo de 30 rpm para evitar qualquer orientação preferencial existente. As análises de difração de raios x (DRX)

da mistura liofilizada e do implante foram realizadas com uma maior proporção do fármaco (40% p/p), a fim de aumentar o sinal referente ao SRL e permitir uma avaliação mais segura.

1.2.6. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum One - FTIR. As amostras de SRL, PLGA 50:50 e mistura liofilizada contendo 40% p/p de SRL foram pressionadas contra um cristal de seleneto de zinco, e os espectros foram obtidos no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} . A análise de FTIR da mistura liofilizada foi realizada com uma maior proporção do fármaco (40% p/p), a fim de aumentar o sinal referente ao SRL e permitir uma avaliação mais segura.

2. Resultados e Discussão

2.1. Desenvolvimento dos implantes contendo SRL

Os implantes obtidos pelo método de moldagem a quente, apresentaram-se como um sistema monolítico, homogêneo e de formato cilíndrico, medindo em média 1,5 mm de diâmetro e 4,5 mm de comprimento (**Figura 9**).

Figura 9. Fotografia do implante de PLGA 50:50 contendo 25% p/p de SRL.



Para um $n=10$, o peso médio dos implantes foi $6,02 \pm 0,07$ mg e o teor de SRL foi de $24,45 \pm 0,41$ % p/p (**Tabela 2**). O teor do fármaco nesses implantes encontrou-se dentro da faixa esperada e correspondeu a 97,8 % do valor teórico estipulado. O teor médio de SRL abaixo de 25 % p/p possivelmente é decorrente de perdas durante o processo de preparo dos sistemas poliméricos, principalmente na etapa de liofilização. Além disso, foram observados baixos valores de DP e DPR, sugerindo que a distribuição do fármaco na mistura foi uniforme, o que permitiu a obtenção dos implantes com uma pequena variação da concentração de SRL.

Tabela 2. Peso médio e teor de SRL nos implantes desenvolvidos.

| Implantes | Peso unitário, mg | Teor de SRL, % p/p |
|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 6,07 | 24,14 |
| 2 | 6,03 | 24,10 |
| 3 | 6,09 | 24,03 |
| 4 | 5,91 | 24,71 |
| 5 | 5,96 | 24,76 |
| 6 | 6,00 | 24,70 |
| 7 | 6,09 | 25,25 |
| 8 | 6,10 | 24,09 |
| 9 | 6,03 | 24,57 |
| 10 | 5,93 | 24,15 |
| Média | 6,02 | 24,45 |
| Desvio Padrão | 0,07 | 0,41 |
| DPR % | 1,15 | 1,66 |

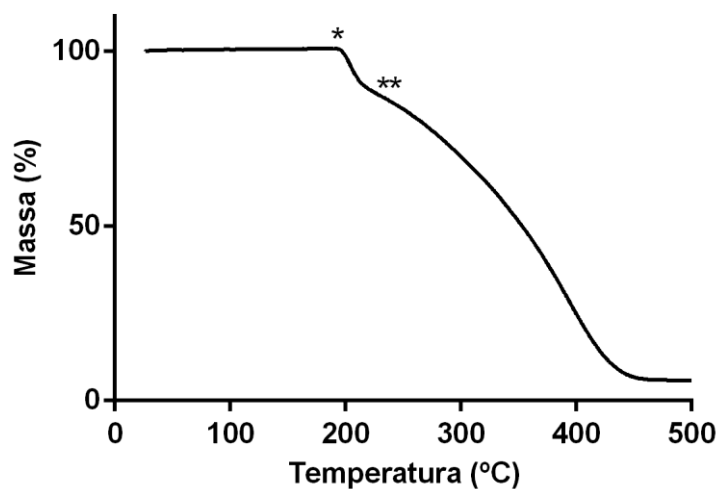
2.2. Caracterização dos implantes desenvolvidos

2.2.1. Análise Termogravimétrica (TG)

A TG é uma técnica que permite acompanhar a perda e/ou ganho de massa de uma amostra em função da temperatura. Para isso, o material é submetido a um programa de aquecimento sob atmosfera controlada. A TG é uma análise térmica largamente utilizada na caracterização de materiais, uma vez que, permite a determinação de pureza e de umidade, a identificação de pseudopolimorfismo e a avaliação da estabilidade e do perfil de degradação de uma amostra (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Desse modo, as análises de TG foram realizadas a fim de se avaliar o perfil de degradação das matérias-primas dos implantes e, então, a estabilidade térmica delas durante o preparo dos sistemas poliméricos implantáveis.

A curva TG do SRL (**Figura 10**) demonstrou que o fármaco é termicamente estável até aproximadamente 198 °C. As curvas indicam que a decomposição térmica do SRL ocorre em duas etapas: a primeira entre 198,58 °C e 234,50 °C com perda de massa de cerca de 14,30% e a segunda entre 234,50 °C e 456,10 °C com uma maior perda de massa, de aproximadamente 78,07%. Já a decomposição térmica do polímero PLGA 50:50 (**Figura 11**), ocorre em uma única etapa, entre 265,07 °C e 380,40 °C com perda de massa de 99,85%.

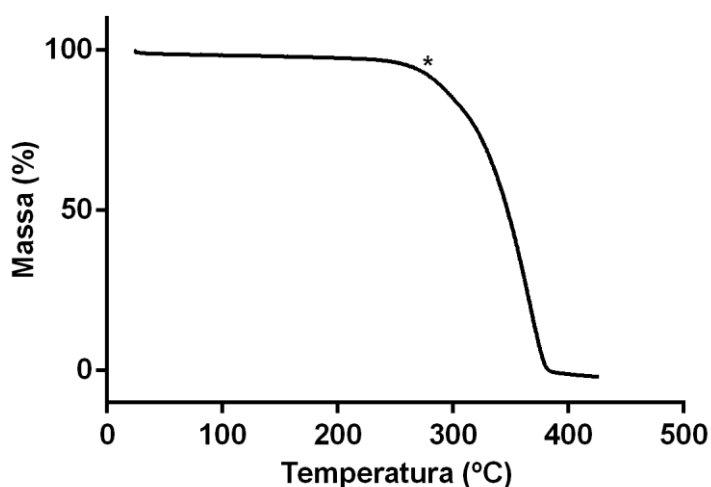
Figura 10. Curva TG do SRL, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio.



* 198,58 °C

** 234,50 °C

Figura 11. Curva TG do PLGA 50:50, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

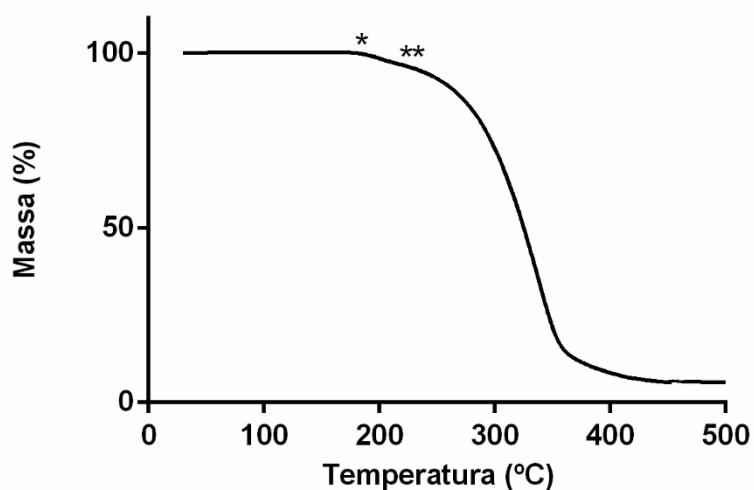


* 265,07 °C

Nas curvas TG da mistura liofilizada e do implante (**Figuras 12 e 13**, respectivamente) foi possível identificar duas etapas de degradação: a primeira entre 190 °C e 215 °C com perda de massa de cerca de 3,50%, provavelmente referente a primeira fase de degradação do SRL e a segunda entre 215 °C e 450 °C com perda de massa de cerca de 90%, possivelmente relacionada à sobreposição dos eventos térmicos da segunda fase de degradação do SRL (234,50 °C e 456,10 °C) e da

degradação do PLGA (entre 265,07 °C e 380,40 °C). Esses resultados demonstraram que não houve alteração significativa na estabilidade térmica do fármaco e do polímero, uma vez que tanto a mistura liofilizada como o implante apresentaram os eventos térmicos entre faixas de temperatura semelhantes e com perdas de massa aproximadas aos apresentados pelas matérias-primas puras. Além disso, na análise da mistura liofilizada não há perda de massa associada a solvente orgânico residual, o que permite concluir que o processo de liofilização foi eficiente e que os implantes não apresentam resíduo de solvente, portanto, são viáveis para a aplicação biológica.

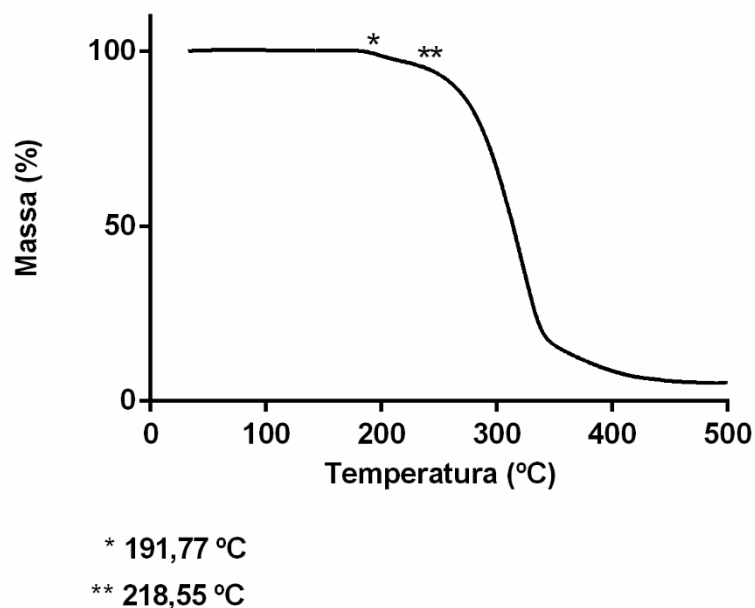
Figura 12. Curva TG da mistura liofilizada, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio.



* 187,98 °C

** 210,63 °C

Figura 13. Curva TG do implante, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio.



Pode-se ainda inferir que o método de moldagem a quente, o qual utiliza aquecimento de 100 – 120 °C foi adequado para o preparo dos implantes, uma vez que as curvas TG demonstraram que tanto o SRL quanto o PLGA 50:50 são termicamente estáveis nessa faixa de temperatura.

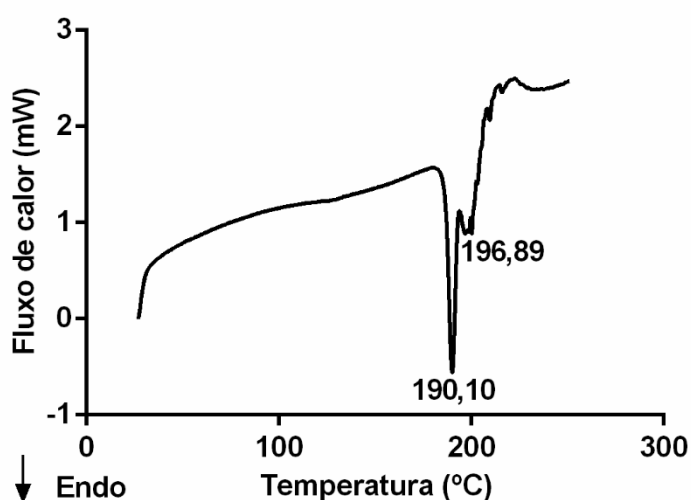
2.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A DSC é uma análise térmica amplamente utilizada na caracterização de materiais. Essa técnica baseia-se na medição da diferença de energia envolvida entre um material de referência e a amostra, por meio do monitoramento das características físicas e químicas de uma substância em função da programação controlada da temperatura, sob uma atmosfera específica (OLIVEIRA *et al.*, 2011). As curvas DSC obtidas fornecem dados que permitem identificar a temperatura de transição vítrea (T_g), a temperatura de fusão e a temperatura de cristalização (T_c) das substâncias, assim, a partir disso, é possível inferir informações acerca da estabilidade dos materiais, da compatibilidade entre componentes de uma formulação farmacêutica, da presença de interações entre fármacos e polímeros ou de alterações estruturais na amostra (OLIVEIRA *et al.*, 2011; SCHAFFAZICK, GUTERREZ, 2003). Dessa forma, as análises de DSC foram realizadas a fim de se avaliar a estabilidade dos materiais,

a compatibilidade ou a presença de interações entre o fármaco e o polímero e a ocorrência de alterações estruturais na amostra.

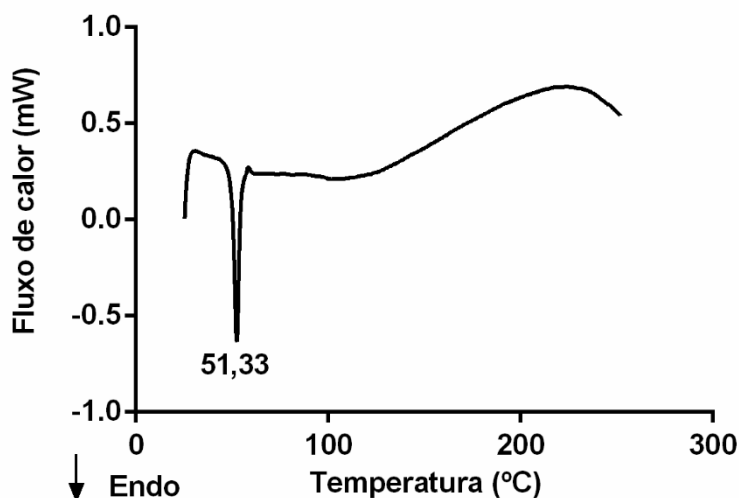
Na **Figura 14**, está representada a curva DSC do SRL. O resultado apresentou dois picos endotérmicos sobrepostos na região de 190 a 200 °C que foram atribuídos à fusão do fármaco e podem indicar a presença de duas formas cristalinas polimórficas. Esses dados também foram observados em outros estudos descritos na literatura (ELSAID *et al.*, 2012 e 2014; ROUF *et al.*, 2011). Além disso, os eventos térmicos após o segundo pico endotérmico sugerem degradação do fármaco, o que juntamente com os resultados da TG, demonstram que a fusão do SRL é seguida de sua degradação.

Figura 14. Curva DSC do SRL, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio.



A curva DSC do PLGA 50:50 (**Figura 15**) apresentou um pico endotérmico em 51,33 °C, que corresponde à temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero (FIALHO *et al.*, 2003).

Figura 15. Curva DSC do PLGA 50:50, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio.



As curvas DSC da mistura liofilizada e do implante (**Figuras 16 e 17**, respectivamente) mostraram eventos endotérmicos possivelmente referentes à Tg do polímero e à fusão do fármaco. No entanto, ambas as curvas apresentaram um deslocamento da Tg do PLGA para uma temperatura mais baixa, o que pode estar relacionado com a dispersão do fármaco na matriz polimérica ou com alguma interação físico-química estabelecida entre o SRL e o PLGA.

Considerando que a Tg é a temperatura que determina a transição do polímero de uma estrutura rígida para uma estrutura mais maleável (BLASI *et al.*, 2005 e 2007; JAIN *et al.*, 1998), sugere-se que o posicionamento do SRL entre as cadeias poliméricas do PLGA, as desestabiliza, resultando em uma menor organização das mesmas e, portanto, em uma menor energia necessária para iniciar um movimento entre elas (BLASI *et al.*, 2005 e 2007; KANG *et al.*, 2015; NAIR *et al.*, 2001).

Nair e colaboradores (2001) sugeriram que o deslocamento da Tg do polímero em uma mistura, está relacionado com a interação estabelecida entre o fármaco e o polímero, sendo que se a interação fármaco-polímero for mais forte que a interação fármaco-fármaco ou polímero-polímero o valor da Tg será maior do que o esperado, uma vez que, o estabelecimento dessa interação mais forte diminui a mobilidade da cadeia polimérica. Por outro lado, se a interação fármaco-polímero for mais fraca que as interações entre si, o valor da Tg será em temperaturas mais baixas do que a esperada. Com base nisso, a redução do valor da Tg observado pode sugerir

que o PLGA 50:50 e o SRL estabeleceram uma interação física fraca, a qual possivelmente não interfere na liberação do SRL a partir dos implantes.

Figura 16. Curva DSC da mistura liofilizada, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

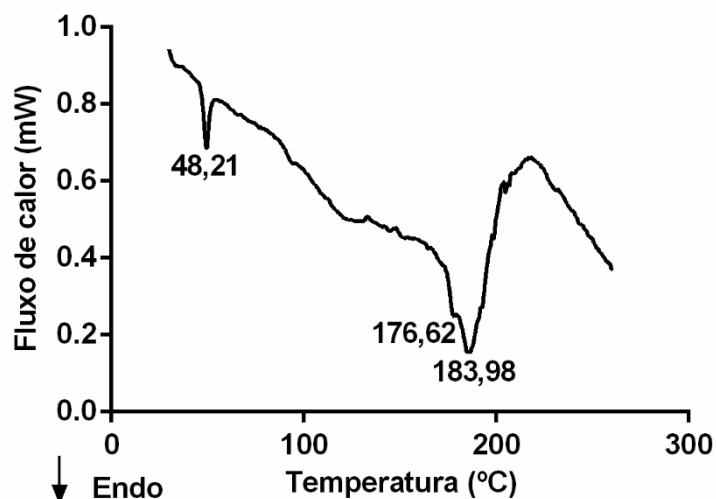
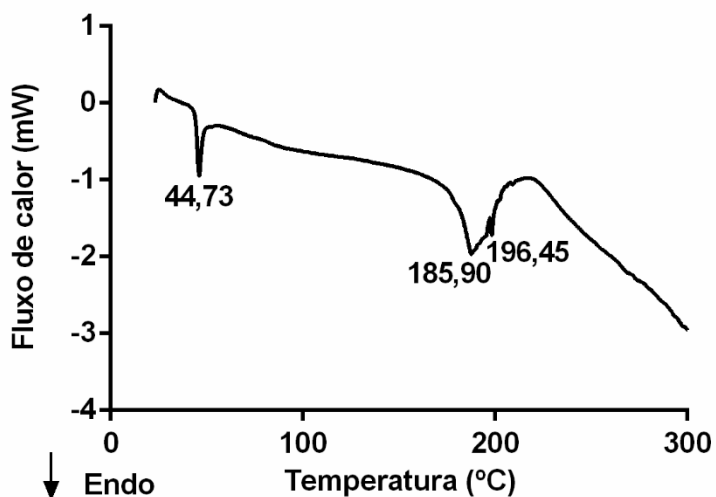


Figura 17. Curva DSC do implante, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio.



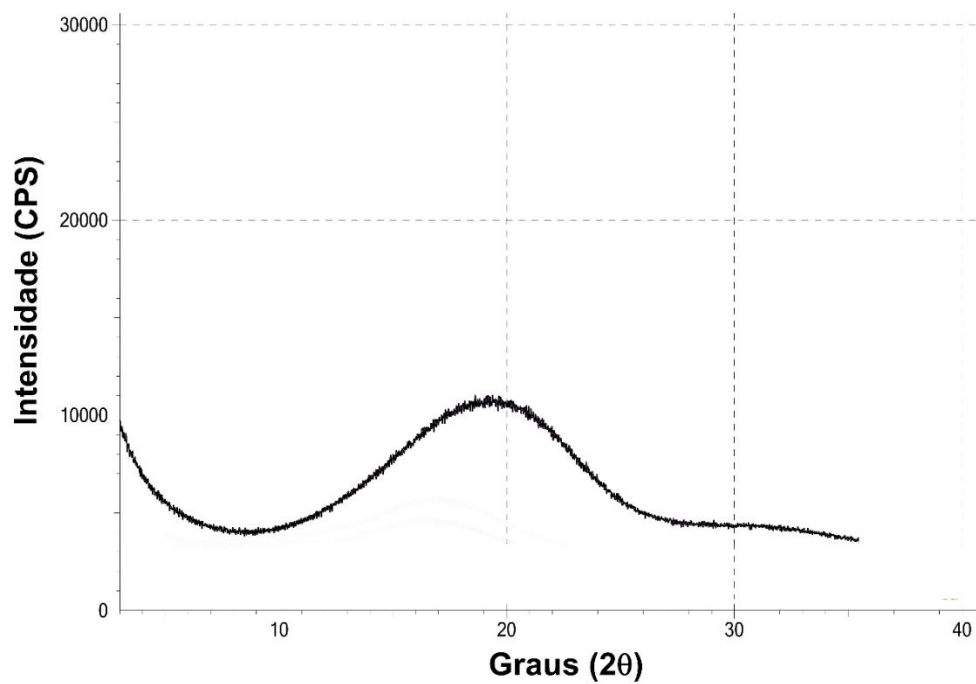
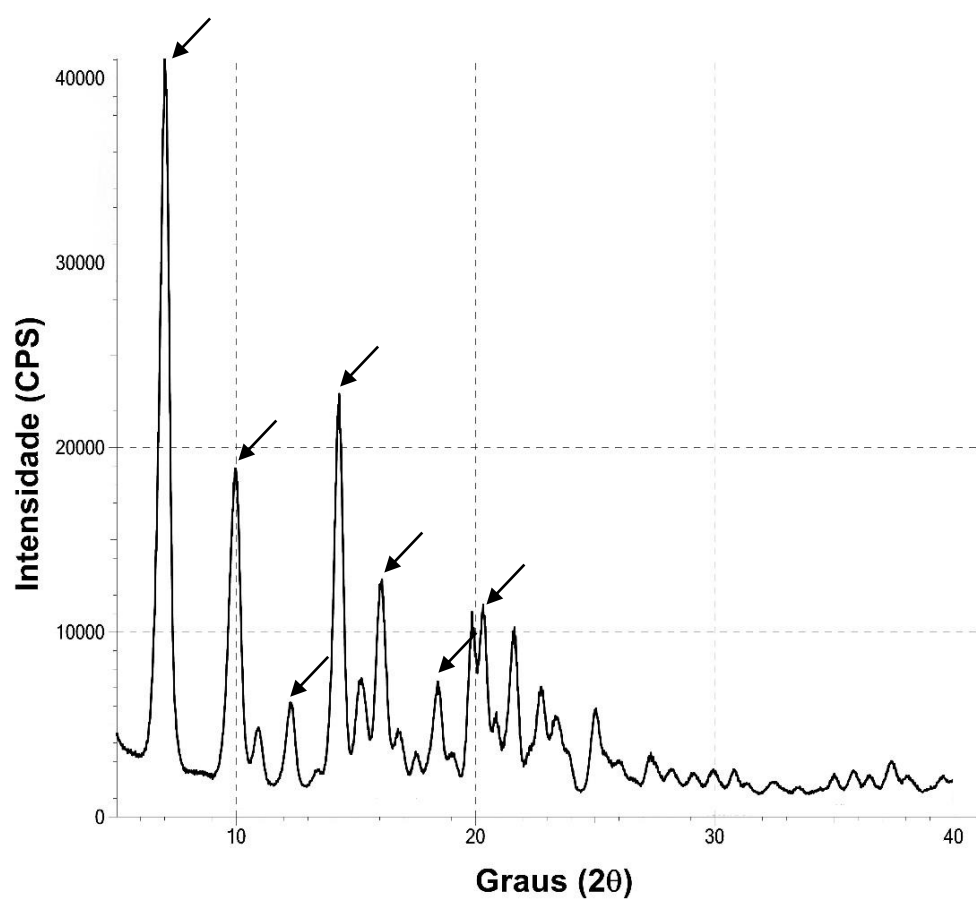
Contudo, nas análises da mistura liofilizada e dos implantes os picos endotérmicos, em temperaturas compatíveis com a fusão do SRL, apresentam o formato alterado e com menor intensidade em relação à análise do fármaco puro. Esse fato pode estar associado à menor proporção do fármaco na amostra (40% p/p), ou pode ser resultado de uma alteração da estrutura cristalina do SRL ou de alguma interação química estabelecida entre o SRL e o PLGA 50:50. Desse modo, a fim de

se avaliar a influência do método de preparo dos implantes sobre os seus constituintes e verificar o estabelecimento de interação química significativa entre o fármaco e o polímero foram realizadas as análises de DRX e FTIR.

2.2.3. Difração de raios-X (DRX)

A técnica de DRX permite descrever a disposição dos átomos de uma substância no espaço, sendo possível determinar sua estrutura cristalina. O método de DRX é baseado em um fenômeno da Física Ondulatória chamado de interferência, o qual é caracterizado pelos desvios sofridos por uma onda quando a mesma se encontra com uma fenda ou um obstáculo da mesma ordem de grandeza do seu comprimento de onda. Quando essa interferência sofrida pelo feixe gera uma dispersão de feixes em direções específicas, há uma difração. Na análise de DRX um feixe de raios X é incidido sob diferentes ângulos na amostra, havendo uma reflexão parcial dos mesmos quando eles se chocam com os planos atômicos da estrutura analisada. Assim, para determinados ângulos de incidência, são gerados sinais com intensidades diferentes que indicam a posição dos átomos da substância no espaço, permitindo determinar sua estrutura cristalina (AZEVEDO, 2010). As análises de DRX foram realizadas com o objetivo de avaliar a influência do método de preparo dos implantes nas estruturas do fármaco e do polímero, auxiliando na investigação da causa da antecipação da Tg do PLGA, bem como, da modificação do aspecto e da intensidade dos picos da fusão do SRL.

O difratograma do polímero (**Figura 18**) revelou sua natureza amorfa. O difratograma do fármaco puro (**Figura 19**) evidenciou sua natureza cristalina, apresentando picos em $2\theta = 6,99, 9,93, 12,25, 14,27, 16,03, 18,40, 19,81, 20,28$ e $21,59$, resultado que também foi observado em outros estudos da literatura (ELSAID *et al.*, 2012 e 2014; KANG *et al.*, 2015).

Figura 18. Difratoograma do PLGA 50:50.**Figura 19.** Difratoograma do SRL.

A análise da mistura liofilizada (**Figura 20**) não apresentou picos evidentes de forma cristalina na amostra, demonstrando que na mistura liofilizada os componentes estão no estado amorfo. Já a análise do implante (**Figura 21**) mostrou picos sugestivos de composto semicristalino. Com base nesses resultados e sabendo que a liofilização está associada à amorfização de amostras cristalinas (EINFALT *et al.*, 2013), sugere-se esse processo é responsável por tornar o SRL amorfo. A presença de picos no difratograma do implante pode estar relacionada à um processo de recristalização do SRL ou à semicristalização do PLGA 50:50, induzidos pelo aquecimento utilizado no preparo dos implantes (LOO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2016).

Figura 20. Difratograma da mistura liofilizada.

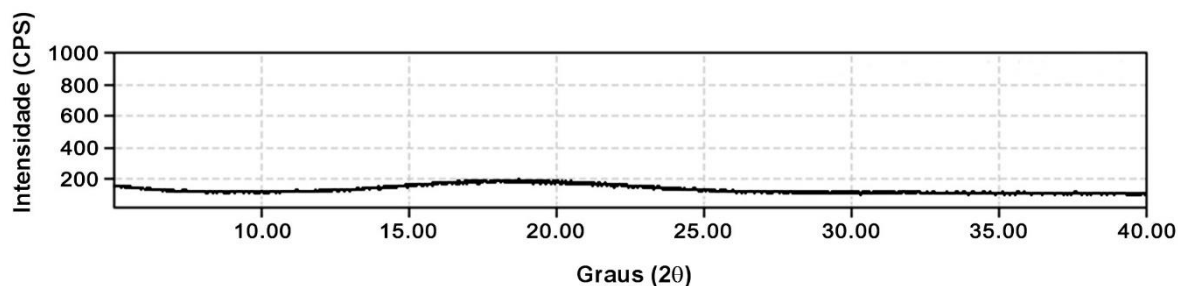
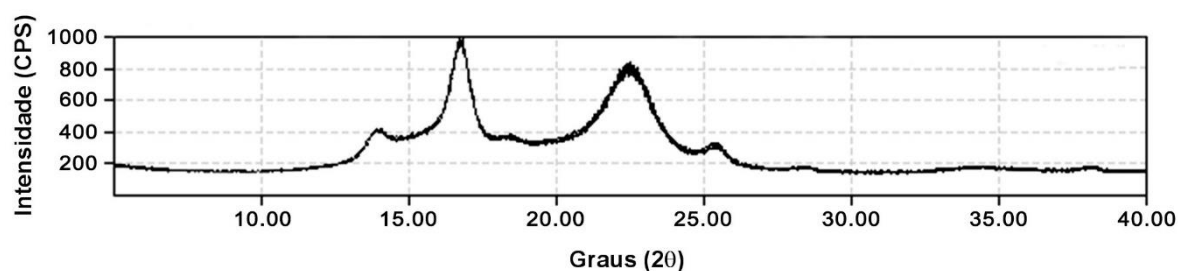


Figura 21. Difratograma do implante contendo 40% p/p de SRL.



Com o objetivo de confirmar a hipótese da amorfização do SRL durante a liofilização e de investigar a origem dos picos sugestivos de cristalinidade na análise dos implantes, foram realizadas as análises de DRX do SRL liofilizado, SRL liofilizado e aquecido a 120°C, PLGA 50:50 liofilizado e implante de PLGA 50:50 puro. Os difratogramas do SRL liofilizado e do SRL liofilizado e aquecido a 120 °C (**Figuras 22 e 23**, respectivamente), confirmaram que o fármaco se torna amorfo após a liofilização e que o mesmo permanece amorfo após o aquecimento, ou seja, nos implantes desenvolvidos neste trabalho o SRL se encontra no estado amorfo. Já os

difratogramas do PLGA 50:50 liofilizado e do implante de PLGA 50:50 (sem o fármaco) (**Figuras 24 e 25**, respectivamente), demonstraram que o polímero permanece amorfo após a liofilização, entretanto, os processos de moldagem e aquecimento utilizados no preparo dos implantes induzem sua semicristalização. Tendo em vista esses resultados e considerando que o difratograma do implante de PLGA 50:50 puro apresenta picos semelhantes aos observados no difratograma do implante contendo 40% p/p de SRL, é possível atribuir os picos apresentados nessas análises ao processo de semicristalização do polímero.

Figura 22. Difratograma do SRL liofilizado.

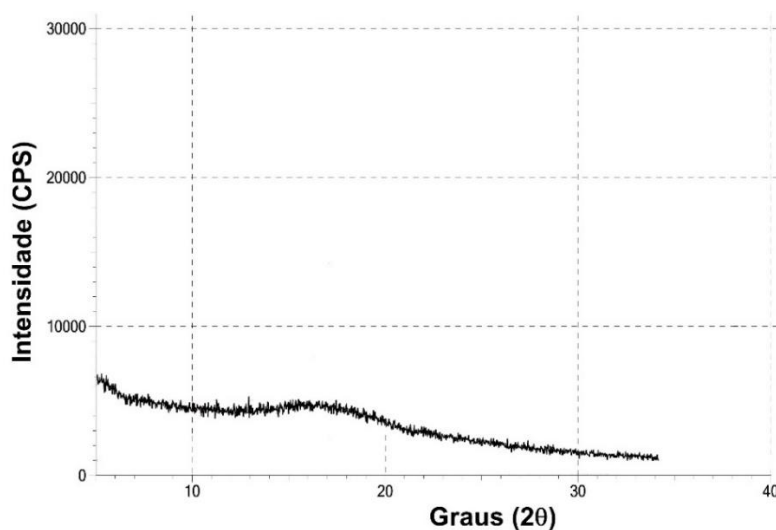


Figura 23. Difratograma do SRL liofilizado e aquecido a 120 °C.

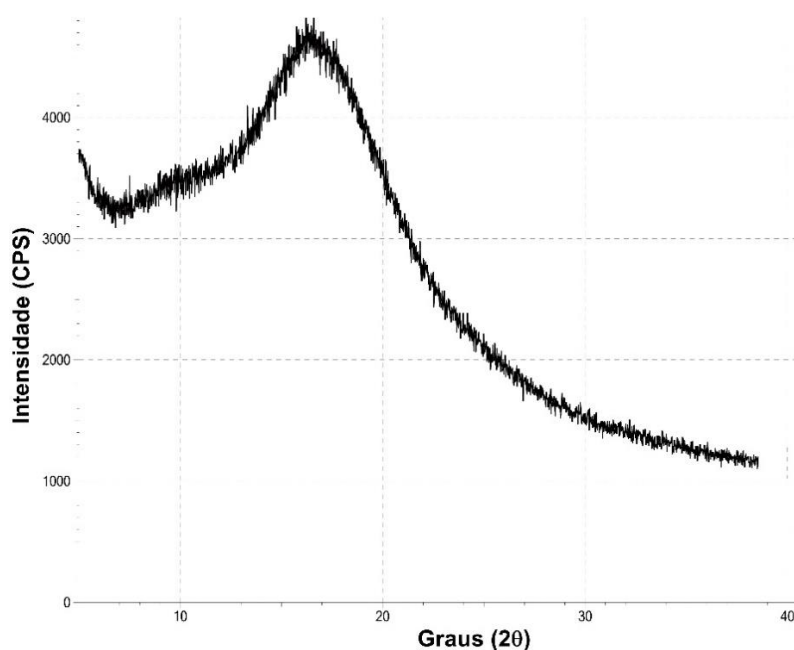
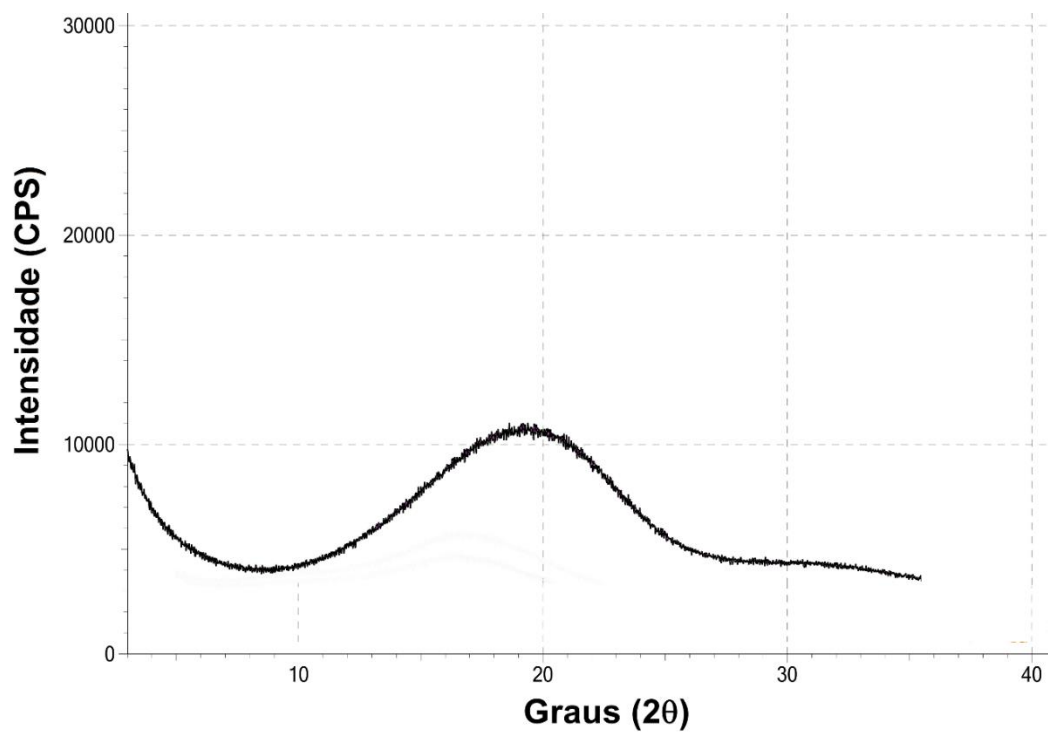
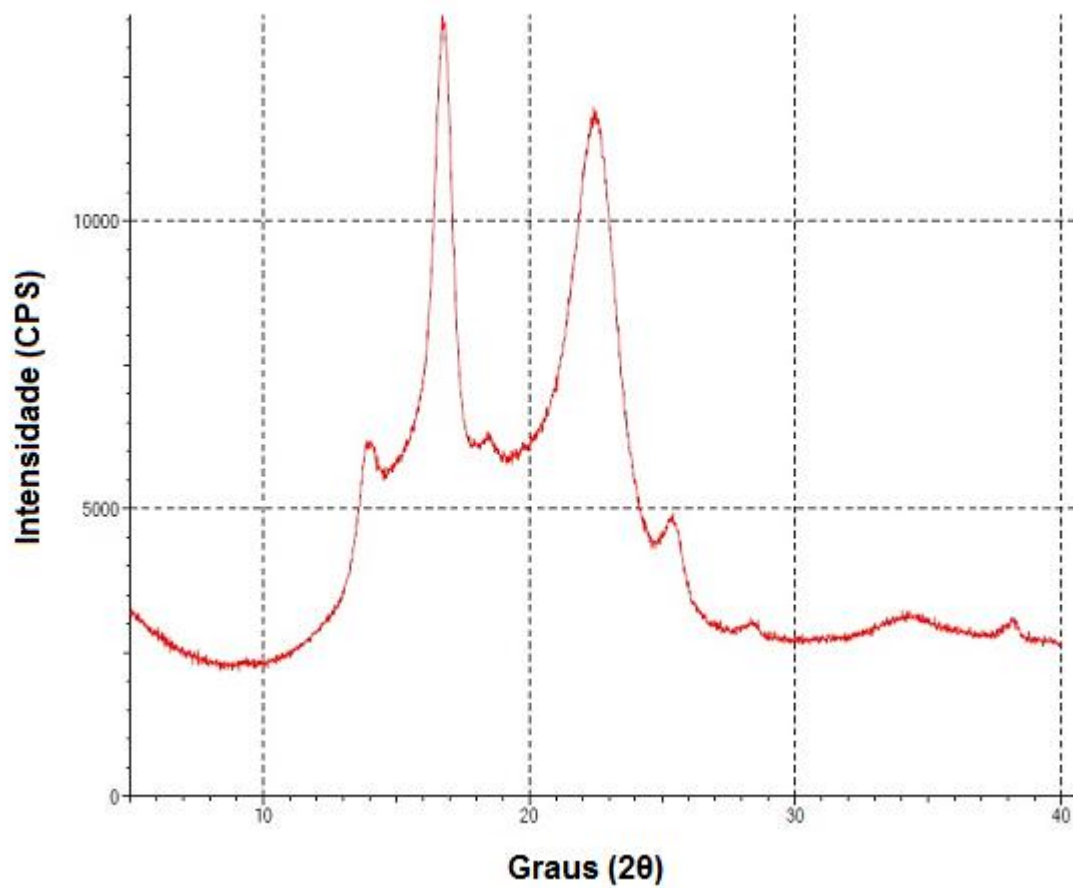


Figura 24. Difratoograma do PLGA 50:50 liofilizado.**Figura 25.** Difratoograma do implante de PLGA 50:50.

Loo e colaboradores (2005), observaram que o grau de cristalinidade do PLGA aumenta de acordo com o tempo de exposição do polímero ao aquecimento isotérmico à 115°C, sendo esse aumento da cristalinidade mais evidente após 30 minutos de aquecimento. No presente trabalho não foi possível evidenciar a semicristalização do polímero por meio da análise de DSC do PLGA 50:50 liofilizado (**Figura 26**), mesmo após isoterma a 120°C por 20 minutos (condição que mimetiza o processo de moldagem a quente dos implantes), uma vez que nenhum evento endotérmico foi visualizado em temperatura até 250°C. No entanto, a curva DSC do implante de PLGA 50:50 puro (**Figura 27**) apresentou um pico endotérmico em 210°C, possivelmente referente à fusão dos cristais do polímero, comprovando a semicristalização do PLGA 50:50. A faixa de temperatura utilizada na moldagem dos implantes é acima da Tg do PLGA 50:50, condição fundamental já que em temperaturas acima da Tg, o polímero encontra-se em um estado maleável permitindo sua moldagem. Entretanto, esse parâmetro de temperatura e o processo mecânico de moldagem, possivelmente forneceram condições favoráveis para o posicionamento das cadeias poliméricas em uma orientação ordenada estável, resultando no estabelecimento de regiões cristalinas na estrutura do polímero (LOO *et al.*, 2005). Desse modo, com base nos resultados apresentados, é possível inferir que a semicristalização do polímero foi induzida pela associação dos processos de moldagem e aquecimento.

Nesse contexto, pode-se sugerir que a antecipação da Tg do PLGA 50:50, observada na análise da mistura liofilizada e do implante (**Figuras 16 e 17**, respectivamente) possivelmente está relacionada com a dispersão do fármaco na matriz polimérica e com a alteração estrutural do polímero. Além disso, os eventos endotérmicos observados em torno de 190°C, supostamente são referentes à degradação do SRL, a qual ocorre em torno de 200°C, como demonstrado pelas análises de TG.

Figura 26. Curva DSC do PLGA 50:50 liofilizado, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

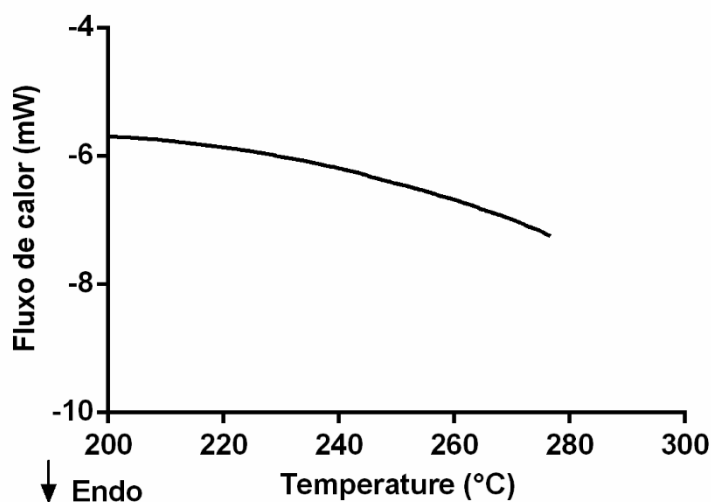
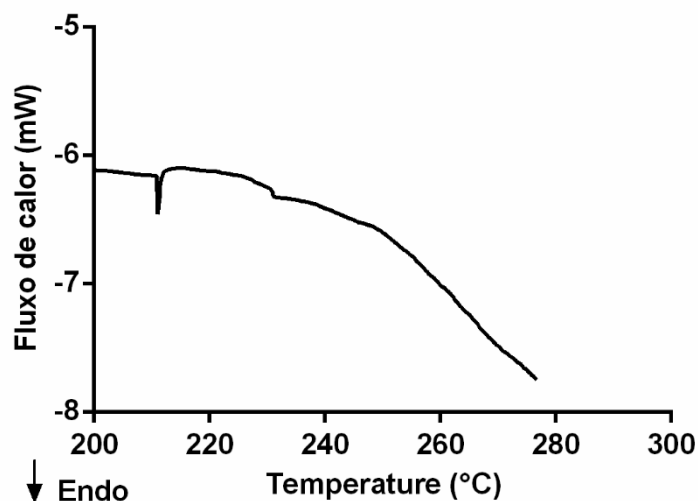


Figura 27. Curva DSC do implante de PLGA 50:50, obtida a 10 °C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio.



O aumento do grau de cristalinidade do polímero pode alterar suas propriedades mecânicas e o seu mecanismo de hidrólise e, conseqüentemente, a sua velocidade de degradação. Por exemplo, o aumento da cristalinidade do PLGA pode interferir no acesso às ligações éster por moléculas de água, retardando a degradação desse polímero (GRIFFITH, 2000; LOO *et al.*, 2005). Dessa forma, em sistemas poliméricos cuja liberação do fármaco é mediada pela degradação do polímero, como é o caso de sistemas a base de PLGA, pode-se haver uma alteração do perfil de liberação do fármaco.

Fármacos frequentemente alteram sua estrutura quando expostos a algum processo, como liofilização e aquecimento (EINFALT *et al.*, 2013; WANG, Y *et al.*, 2016). A forma amorfa possui estrutura desordenada e representa o estado sólido mais energético, portanto, apesar de apresentar menor estabilidade física, normalmente proporciona maior taxa de dissolução e biodisponibilidade do fármaco em relação ao fármaco no estado cristalino (HANCOCK, ZOGRAFI, 1997; EINFALT *et al.*, 2013). Carvalho *et al.*, 2014, compararam a farmacocinética do SRL amorfo e cristalino após administração pulmonar em ratos, e verificaram que o SRL tanto na forma amorfa quanto na forma cristalina permanece no pulmão durante o mesmo período de tempo. Ainda, observaram que o SRL amorfo apresenta maior biodisponibilidade sistêmica, possivelmente devido à sua maior solubilidade e velocidade de dissolução. Tendo por base esse dado, é possível que a amorfização do SRL durante o preparo dos implantes, favoreça a difusão do mesmo pelos poros e canais formados na matriz polimérica, contribuindo para uma liberação mais rápida do fármaco, a qual possivelmente seria significativamente lenta, devido à natureza cristalina e lipofílica do SRL.

Nesse contexto, as alterações estruturais sofridas tanto pelo SRL quanto pelo PLGA 50:50, podem influenciar a liberação do fármaco a partir dos implantes, porém, não inviabilizam a utilização desse sistema como forma farmacêutica alternativa para a veiculação do SRL.

2.2.4. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A FTIR é uma das principais técnicas espectroscópicas modernas utilizadas na identificação e elucidação estrutural de substâncias, a qual é realizada através do reconhecimento dos grupos funcionais presentes na molécula analisada, quando expostas a radiação na região do infravermelho (ISMAIL *et al.*, 1997; LOPES, FASCIO, 2004). As análises FTIR foram realizadas neste trabalho para identificar as matérias-primas constituintes dos implantes desenvolvidos, avaliar o estabelecimento de interações entre elas e estudar os efeitos do processo de preparo dos implantes sobre os grupos químicos dos componentes da mistura. A partir dos grupos químicos

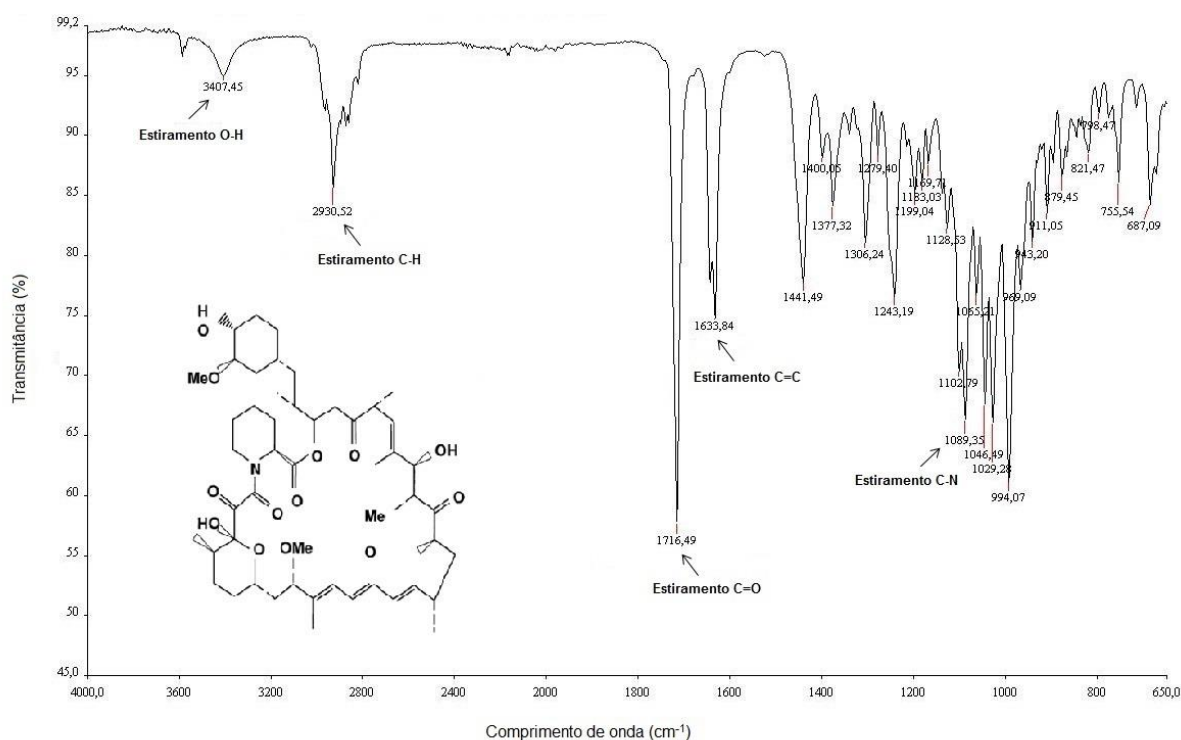
característicos da estrutura química de cada constituinte é possível identificar as diferentes bandas de absorção do espectro FTIR.

A molécula de SRL apresenta grupos álcool, éster, cetona e amida. Desse modo, segundo Bian e colaboradores (2012) seu espectro FTIR apresenta bandas de absorção em 3400 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 1718 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} e 1091 cm^{-1} , referentes aos estiramentos das ligações O-H, C-H, C=O, C=C e C-N, respectivamente. Os resultados encontrados na análise do SRL (**Figura 28**) confirmam os dados extraídos da literatura. Os valores das bandas de absorção referentes ao SRL estão descritos no quadro 4.

Quadro 4. Bandas de absorção do SRL.

| Grupo químico | Número de onda (cm^{-1}) | |
|-----------------|-------------------------------------|--------------|
| | Literatura | Experimental |
| Estiramento C=C | 1634 | 1633 |
| Estiramento C=O | 1718 | 1716 |
| Estiramento C-N | 1091 | 1089 |
| Estiramento C-H | 2930 | 2930 |
| Estiramento H-O | 3400 | 3407 |

Figura 28. Espectro FTIR da molécula do SRL.

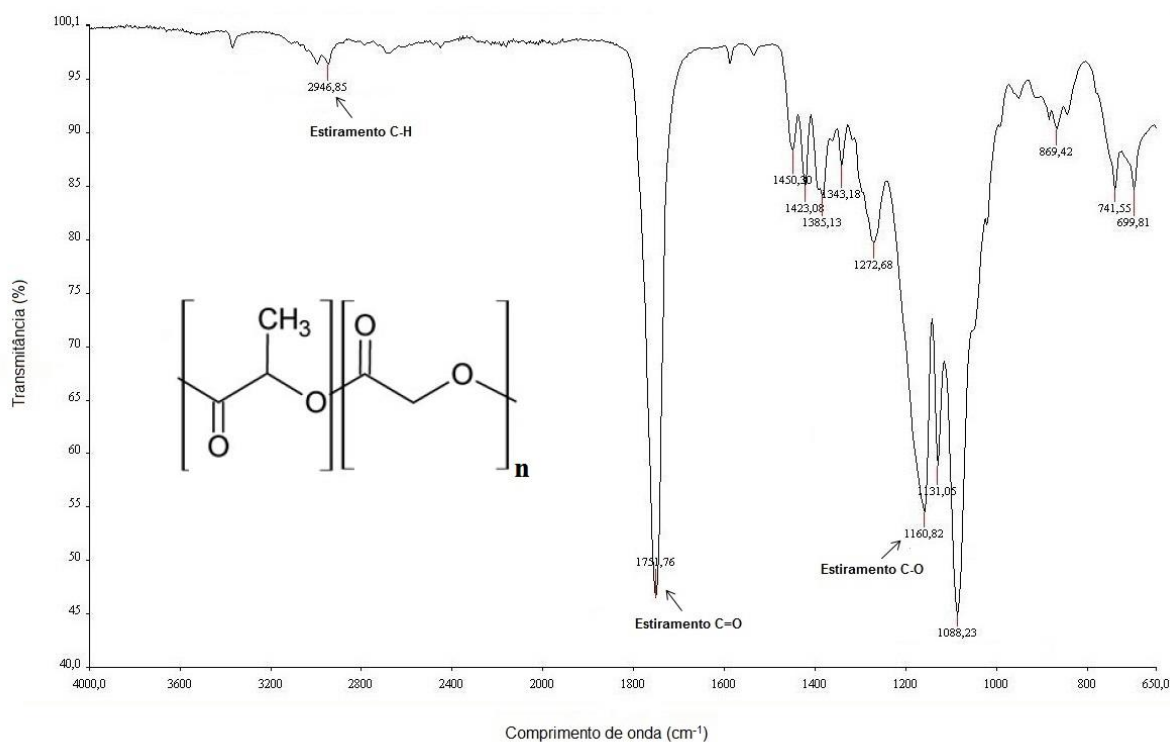


O PLGA 50:50, por ser um copolímero derivado dos ácidos lático e glicólico, não contém grupo hidroxila (OH) e apresenta basicamente o grupo éster. Assim, seu espectro FTIR apresenta bandas de absorção em 1758 cm^{-1} e $1091\text{-}1172\text{ cm}^{-1}$, referentes aos estiramentos das ligações C=O e C-O, respectivamente (PARK, M *et al.*, 2016). Pode-se observar ainda uma banda de absorção na região de $3000\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento de ligações C-H (KHARE *et al.*, 2014; SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Os resultados encontrados na análise do PLGA 50:50 (**Figura 29**) estão de acordo com os dados relatados na literatura. Os valores das bandas de absorção referentes ao PLGA 50:50 estão descritos no quadro 5.

Quadro 5. Bandas de absorção do PLGA 50:50.

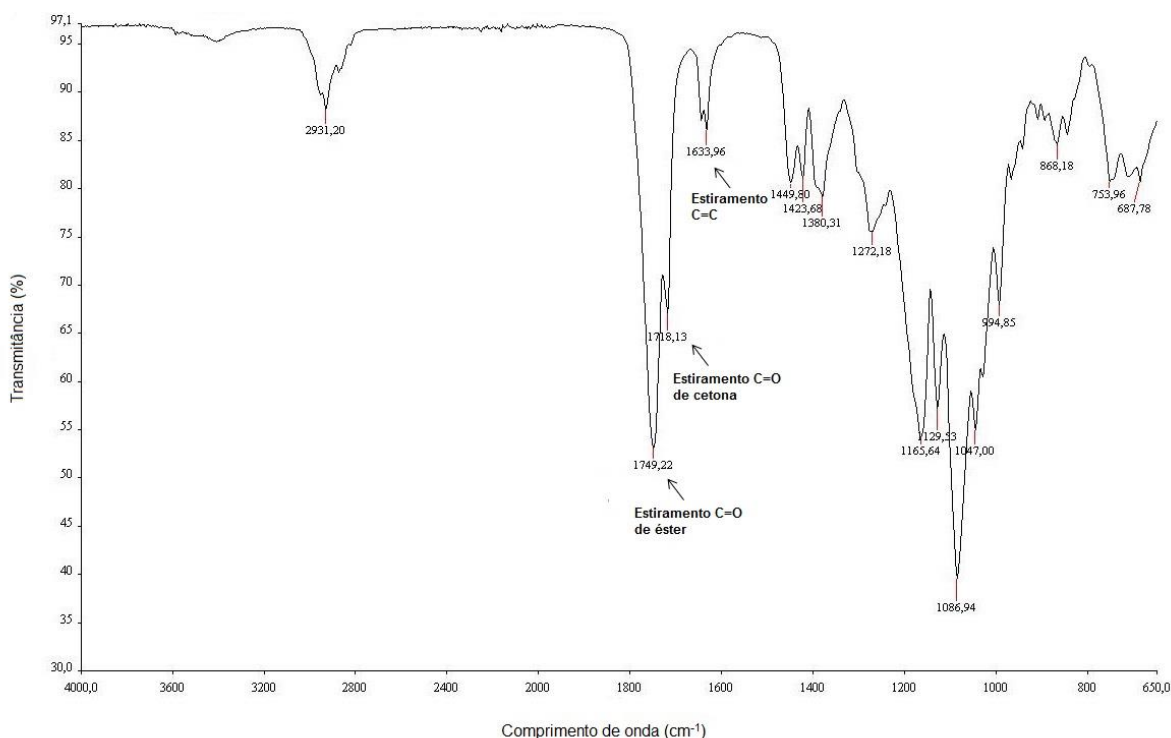
| Grupo químico | Número de onda (cm^{-1}) | |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------|
| | Literatura | Experimental |
| Estiramento C=O de éster | 1758 | 1751 |
| Estiramento C-O de éster | 1091-1172 | 1160 |
| Estiramento C-H | 3000-2840 | 2946 |

Figura 29. Espectro FTIR da molécula do PLGA 50:50.



O espectro FTIR da mistura liofilizada (**Figura 30**) se apresentou muito semelhante ao espectro do PLGA 50:50, provavelmente devido à maior proporção do polímero na mistura. No entanto, foram observadas duas bandas separadas que correspondem aos estiramentos das ligações C=O, uma a 1718 cm^{-1} referente à carbonila de grupos cetona presentes na estrutura do SRL e outra a 1749 cm^{-1} , referente à carbonila de grupos éster presentes na estrutura do PLGA 50:50 e do SRL. Além disso, foi observada também uma banda a 1633 cm^{-1} que corresponde aos estiramentos das ligações C=C referente às olefinas presentes na estrutura do SRL. Essas três bandas permitem confirmar que o fármaco foi incorporado nas cadeias poliméricas do PLGA 50:50. A manutenção das bandas características de cada componente da mistura, bem como a ausência de novas bandas de absorção, sugerem que o fármaco e o polímero não sofreram modificações químicas estruturais que sugiram o estabelecimento de interações químicas significativas entre eles.

Figura 30. Espectro FTIR da mistura liofilizada.



3. Conclusão

As técnicas de caracterização empregadas nesta etapa do trabalho permitiram inferir que o método utilizado no preparo dos implantes foi adequado e que eles apresentaram uniformidade e homogeneidade satisfatórias. As análises térmicas e as análises de DRX demonstraram que tanto o fármaco quanto o polímero sofrem uma alteração estrutural durante o preparo dos sistemas, o SRL torna-se amorfo e o PLGA 50:50 torna-se semicristalino. Por fim, as análises de FTIR contribuíram na confirmação da ausência de alterações químicas estruturais que fossem sugestivas de interações significativas estabelecidas entre o PLGA 50:50 e o SRL.

As alterações estruturais ocorridas durante o processo de obtenção dos sistemas poliméricos implantáveis podem influenciar a cinética de liberação do fármaco a partir dos implantes, porém, não inviabilizam a utilização desse sistema como forma farmacêutica alternativa para a veiculação do SRL. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que os implantes a base de PLGA 50:50 contendo SRL apresentaram características adequadas para a continuidade dos estudos.

PARTE II: Avaliação biológica dos implantes

1. Materiais e métodos

1.1. Materiais

SRL (massa molecular 914,2 g/mol) foi cedido pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (São Paulo, Brasil). Fosfato dissódico de dexametasona (pureza > 98%) foi obtido da Sigma-Aldrich (EUA). Cetamina e xilazina foram obtidas da Ceva Santé Animale (São Paulo, Brasil). PLGA 50:50, Resomer® RG 503 H, viscosidade inerente (v.i.) = 0.32 - 0.44 dl/g, foi fornecido pela Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co (Ingelheim, Alemanha). Metanol e acetonitrila foram obtidos da Merck Brasil (São Paulo, Brasil). Água ultrapura foi produzida por um sistema Milli-Q, Millipore (Massachusetts, EUA). Outros produtos químicos utilizados eram grau analítico.

1.2. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g), fêmeas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e acondicionados em salas com temperatura controlada (27 ± 1 °C), correspondente à zona de termoneutralidade para roedores. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 h com fornecimento de água e ração *ad libitum*. Os animais foram ambientados na sala de experimentação por pelo menos dois dias antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos realizados seguiram as recomendações para avaliação de dor experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG, protocolo número 172/2016).

1.3. Métodos

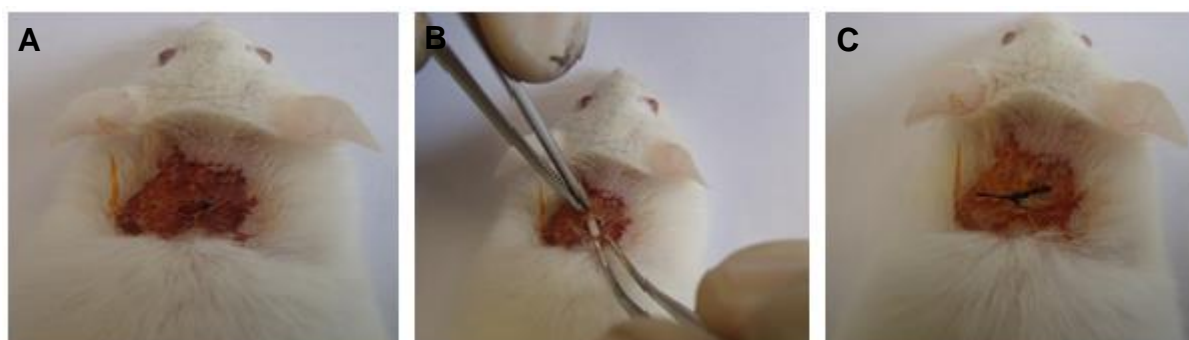
1.3.1. Estudo de liberação *in vivo*

Este estudo foi realizado com a finalidade de se determinar o perfil de liberação do SRL *in vivo* promovido pelos sistemas poliméricos implantáveis desenvolvidos.

Inicialmente, os animais foram anestesiados com solução contendo cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), via intraperitoneal. Antes do procedimento de inserção dos implantes, realizou-se a tricotomia e assepsia da pele com solução de iodo e álcool 70% (v/v). Os implantes foram inseridos na região subcutânea do dorso de 20 camundongos através de uma incisão de 1 cm e, em seguida foi realizada a sutura (**Figura 31**).

Após 3, 7, 14, 28 e 42 dias de inserção dos sistemas poliméricos, grupos de quatro animais foram eutanasiados e os implantes foram removidos dos animais para a quantificação indireta da liberação do fármaco. Para isso, os implantes coletados foram lavados com água Milli-Q, a fim de remover os resíduos biológicos da superfície dos implantes, dissolvidos em 5,0 mL de acetonitrila e a solução resultante filtrada em filtro esterilizante Millex-GV, 0.22 μm , PVDF, 33 mm e injetada no cromatógrafo para a quantificação da quantidade residual de SRL nos implantes por CLAE, de acordo com o método cujas condições estão descritas no quadro 3. A correção em relação ao peso dos implantes foi realizada.

Figura 31. Procedimento cirúrgico para implantação dos sistemas poliméricos. (A) Incisão no dorso dos animais. (B) Implantação dos sistemas poliméricos contendo ou não SRL. (C) Sutura.



1.3.2. Estudo de biodegradação *in vivo*

A fim de se avaliar as alterações morfológicas ocorridas na superfície dos implantes após serem inseridos nos animais, foi realizado o estudo de biodegradação. Implantes contendo SRL 25% (p/p) foram inseridos no dorso de nove animais, de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Após 7, 14 e 28 dias, os animais foram eutanasiados e os sistemas poliméricos foram removidos e analisados por estereomicroscopia e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Implantes não inseridos no dorso dos animais também foram analisados.

A estereomicroscopia é um tipo de microscopia óptica, cuja formação da imagem baseia-se nos efeitos da interação da luz com a matéria. A luz, ao incidir na amostra é refletida, formando a imagem e refratada, sendo os feixes de luz desviados aplicados ao conjunto de lentes do microscópio permitindo o aumento e a melhor resolução da imagem. Os estereomicroscópios diferem dos microscópios ópticos convencionais por serem compostos por dois conjuntos ópticos independentes, os quais permitem uma visão em três dimensões da amostra proporcionando uma melhor caracterização da sua morfologia (MANNHEIMER, 2002). A morfologia dos sistemas desenvolvidos foi avaliada sem qualquer preparação especial, com ampliação de 35X, utilizando um estereomicroscópio (SZ61TR, Olympus, Brasil), disponível na Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

A análise por MEV se baseia na emissão de um feixe de elétrons sobre a amostra, sendo que a interação estabelecida entre eles resulta na emissão de diversos sinais sob a forma de elétrons (secundários, retroespalhados, transmitidos, entre outros) ou fótons (fotoluminescentes e raios X), os quais ao serem captados por detectores são ampliados e analisados, permitindo a obtenção de uma imagem tridimensional (SUGA *et al.*, 2014). Antes da visualização, os implantes foram cuidadosamente lavados com água destilada e secos durante 72 horas num secador a vácuo à temperatura ambiente. Após a secagem, eles foram montados em *stubs* de alumínio e revestidos por pulverização com uma fina camada de ouro sob atmosfera de argônio (equipamento BALTEC MED020 Coating System). A superfície dos implantes foram vistas a uma ampliação de 30X e 150X, utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura FEG - Quanta 200 FEI, operando a 5 kV, disponível no Centro de Microscopia da UFMG.

1.3.3. Histologia

Com o objetivo de analisar a resposta dos camundongos frente a implantação dos sistemas poliméricos foi realizada a avaliação histológica do tecido do local de inserção dos implantes.

Os animais foram divididos em dois grupos de oito animais cada. No grupo 1, foram inseridos implantes contendo 25% (p/p) de SRL e no grupo 2, foram inseridos implantes de PLGA 50:50, sem o fármaco. O procedimento cirúrgico seguiu o mesmo protocolo, conforme descrito no estudo de liberação *in vivo*. Após 7 e 42 dias, quatro animais de cada grupo foram eutanasiados e a pele da região dorsal dos animais foi removida para avaliação histológica. As amostras mediam aproximadamente 1 cm a cada sentido a partir do implante. Após extraídos, os fragmentos de pele foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina líquida, cortados a 4 μ m e corados com hematoxilina e eosina (HE). A análise histológica foi realizada em microscópio óptico (Leica Microsystems, Alemanha) com aumento de 50x ou 400x.

1.3.4. Formação de tecido fibrovascular induzida por implante subcutâneo de um *pellet* de algodão

Com o objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória induzida pelo SRL liberado a partir dos implantes, investigamos essa atividade em modelo experimental de formação de tecido fibrovascular induzida por implante subcutâneo de um *pellet* de algodão em camundongos.

Após anestesia por via intraperitoneal com cetamina e xilazina (80 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente), um *pellet* de algodão esterilizado (10 mg) foi implantado na região dorsal dos animais. Em seguida, dois implantes contendo SRL (25% p/p) ou dois implantes sem o fármaco (PLGA 50:50) foram colocados assepticamente um em cada lado do *pellet* de algodão. Foram utilizados dois implantes contendo SRL para aumentar a fração do fármaco liberada, a qual depende da taxa de degradação do polímero.

Os animais foram divididos em quatro grupos de sete animais cada e os tratamentos foram realizados de acordo com o descrito na **Tabela 3**. A variação de peso dos animais também foi monitorada ao longo do estudo. Sete dias após a

implantação dos *pellets* de algodão e dos sistemas poliméricos, os animais foram eutanasiados e os implantes foram cuidadosamente removidos para quantificação indireta do fármaco liberado, do mesmo modo que no estudo de liberação *in vivo*. O *pellet* de algodão com o seu tecido fibrovascular circundante foi removido, seco a 37 °C durante 24 h e pesado. Os resultados de formação de tecido fibrovascular foram apresentados como a diferença entre a massa seca inicial e final de cada *pellet* de algodão.

Tabela 3. Tratamentos dos quatro grupos de animais do estudo de formação de tecido fibrovascular induzida por implante subcutâneo de um *pellet* de algodão.

| Grupo | Tratamento |
|--------------|---|
| 1 | Salina 10 mL/kg a cada dois dias, por via oral (controle negativo). |
| 2 | Dexametasona 2 mg/kg (em um volume de injeção de 10 mL/kg), a cada dois dias, por via oral (controle positivo). |
| 3 | 2 implantes contendo 25% p/p de SRL. |
| 4 | 2 implantes de PLGA, sem o fármaco. |

1.3.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls ou por meio da análise de variância de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 5%. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

2. Resultados e discussão

2.1. Estudo de liberação e biodegradação *in vivo*

O estudo de liberação *in vivo* foi realizado a fim de se avaliar o perfil de liberação do fármaco promovido pelo sistema polimérico implantável a base de PLGA 50:50 e o estudo de biodegradação foi feito com o intuito de mostrar as alterações morfológicas ocorridas na superfície dos implantes durante o estudo de liberação *in vivo*, auxiliando na determinação do mecanismo de liberação do fármaco proporcionado por eles.

Os valores da quantidade média de SRL liberado e o perfil de liberação a partir dos implantes, durante os 42 dias de estudo estão apresentados na **Tabela 4** e na **Figura 32**, respectivamente. O perfil de liberação *in vivo* de SRL obtido demonstrou que o fármaco foi lentamente liberado a partir dos implantes. Nos 3 primeiros dias de estudo foram liberados $0,16 \pm 0,01$ mg de SRL, que correspondem a 10,64% da quantidade inicial de fármaco presente nos implantes. Após 42 dias, foi atingida uma liberação de $0,58 \pm 0,20$ mg do fármaco, equivalente a 40,20% da quantidade inicial de SRL.

No estudo realizado por Kang e colaboradores (2015), no qual foi avaliado o perfil de liberação *in vitro* promovido por stents revestidos com um filme de PLGA contendo diferentes proporções de SRL, foi observada uma liberação prolongada durante 28 dias, no entanto, nos 3 primeiros dias já haviam sido liberados aproximadamente 60% do fármaco presente nos stents contendo 30% de SRL. Em outros trabalhos que igualmente avaliaram o perfil de liberação *in vitro* de SRL promovido por sistemas a base de PLGA também foram relatados um *burst* de liberação mais agressivo, correspondendo a cerca de 40% de liberação aos 3 dias de estudo (DING *et al.*, 2015; KATIYAR *et al.*, 2016). Por outro lado, os implantes desenvolvidos neste trabalho apresentaram um *burst* de liberação mais moderado, alcançando 10,64% de liberação do fármaco presente nos sistemas nos primeiros 3 dias de estudo.

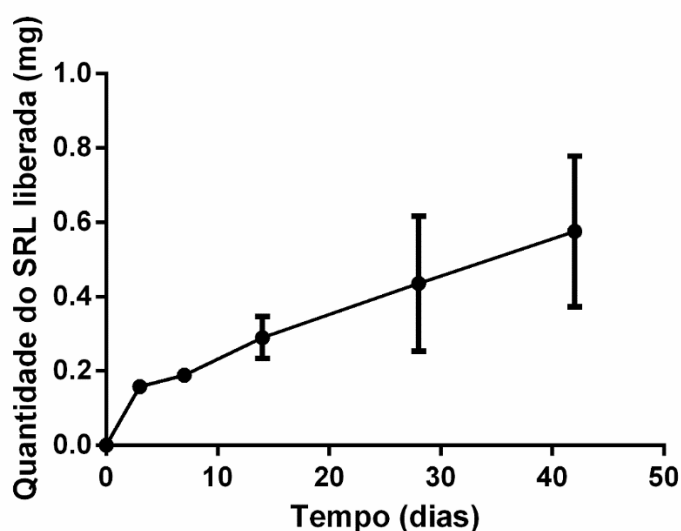
Katiyar *et al.* (2016) desenvolveram nanopartículas poliméricas a base de PLGA contendo SRL que permitiram a liberação do fármaco por 49 dias, período em que observaram uma liberação de aproximadamente 90% do SRL incorporado nas nanopartículas. No presente trabalho, observou-se uma liberação de 40,20% do SRL

ao final dos 42 dias de estudo, permitindo inferir que ainda restam cerca de 60% do fármaco nos implantes para serem liberados, assim, caso o estudo avaliasse a liberação do SRL por um maior período de tempo, possivelmente seria observada uma liberação do fármaco por tempo mais prolongado. Além disso, com base nos resultados apresentados no gráfico do perfil de liberação do SRL a partir dos implantes, é possível verificar que taxas semelhantes do fármaco são liberadas em intervalos de tempo parecidos, demonstrando uma cinética de liberação mais controlada.

Tabela 4. Valores da quantidade de SRL liberado ao longo do estudo de liberação *in vivo* (mg e %; n = 4).

| Tempo (dias) | Média SRL liberado (mg ± DP) | Média SRL liberado (% ± DP) |
|--------------|------------------------------|-----------------------------|
| 3 | 0,16 ± 0,01 | 10,64 ± 0,01 |
| 7 | 0,19 ± 0,02 | 12,86 ± 0,01 |
| 14 | 0,29 ± 0,06 | 19,90 ± 0,04 |
| 28 | 0,44 ± 0,18 | 30,10 ± 0,13 |
| 42 | 0,58 ± 0,20 | 40,20 ± 0,14 |

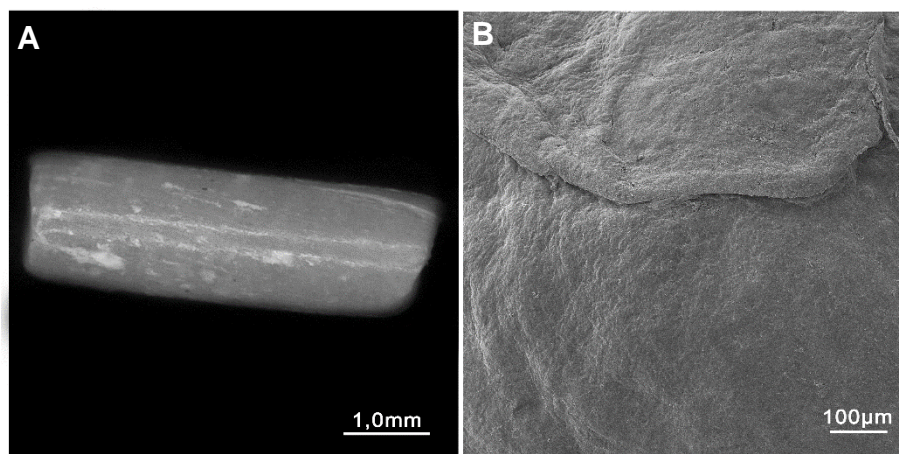
Figura 32. Perfil de liberação do SRL a partir dos implantes de PLGA ao longo dos 42 dias do estudo de liberação *in vivo*. Cada ponto da curva representa a média ± DP de 4 animais.



Com as imagens obtidas por estereomicroscopia foi possível verificar que ao início do estudo os sistemas poliméricos eram cilíndricos e não apresentavam nenhuma alteração macroscópica (**Figura 33A**). Contudo, a partir de 7 dias de estudo, o tamanho e a forma dos implantes começaram a mudar (**Figura 34A**), sendo que

após 14 dias eles já estavam aderidos à pele dos animais (**Figura 35A**) e aos 28 dias encontravam-se envolvidos por uma cápsula de tecido fibrovascular (**Figura 36A**).

Figura 33. (A) Imagem do implante contendo 25 % p/p de SRL antes de implantado no dorso do animal, obtida por estereomicroscopia. (B) Imagem do implante contendo 25 % p/p de SRL antes de implantado no dorso do animal, obtida por MEV em aumento de 150X.



As imagens obtidas por MEV, forneceram informações acerca da morfologia da superfície dos implantes. Os sistemas poliméricos biodegradáveis antes de implantados nos animais, apresentavam superfície homogênea sem evidência de poros ou canais (**Figura 33B**). Após 7 dias, os poros começaram a aparecer e foram aumentando em tamanho e número ao longo do estudo (**Figuras 34B e C, 35B e C, 36B e C**). Esses resultados também foram observados por Kang e colaboradores (2015), que verificaram que os poros na matriz polimérica aumentaram a medida que o fármaco foi liberado a partir dos stents de PLGA contendo SRL. A degradação do polímero leva a formação de poros e canais na matriz polimérica, os quais facilitam a penetração do fluido corporal no implante, permitindo a difusão do fármaco do interior até a superfície. Ademais, há o aumento da área de superfície de contato em locais onde o fármaco foi liberado, o que acelera a degradação do polímero, resultando no aumento do número e do tamanho dos poros presentes na matriz polimérica e, conseqüentemente, na liberação do fármaco (FIALHO *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010).

Figura 34. (A) Imagem do implante contendo 25 % p/p de SRL após 7 dias de implantado no dorso do animal, obtida por estereomicroscopia. (B,C) Imagens do implante contendo 25 % p/p de SRL após 7 dias de implantado no dorso do animal, obtidas por MEV em aumento de 30X e 150X, respectivamente.

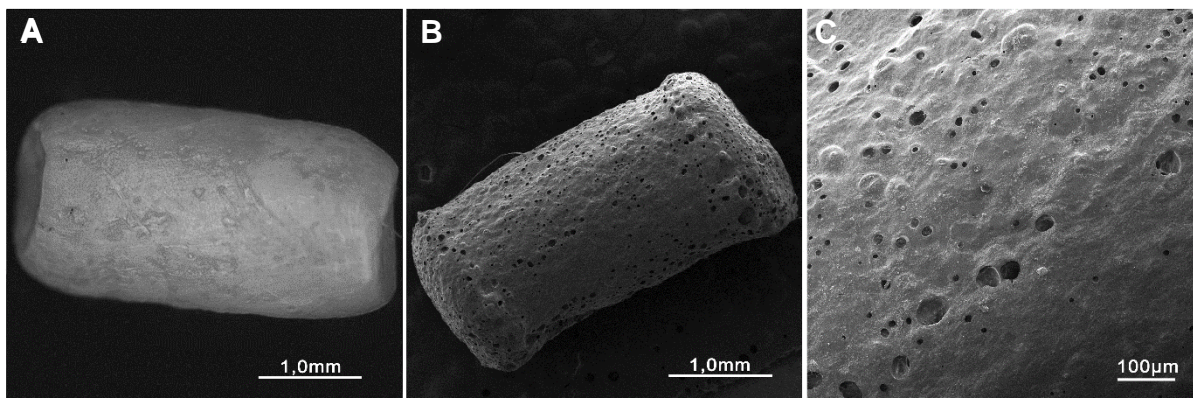


Figura 35. (A) Imagem do implante contendo 25 % p/p de SRL após 14 dias de implantado no dorso do animal, obtida por estereomicroscopia. (B,C) Imagens do implante contendo 25 % p/p de SRL após 14 dias de implantado no dorso do animal, obtidas por MEV em aumento de 30X e 150X, respectivamente.

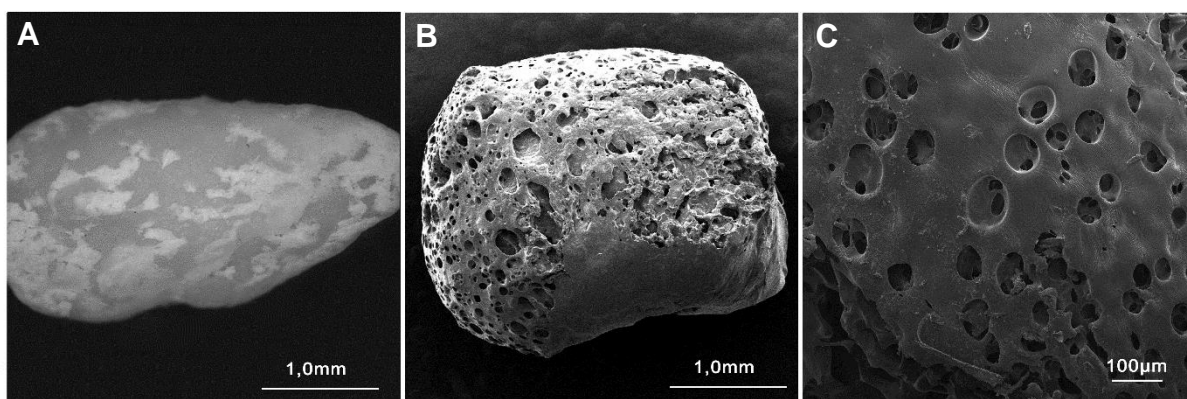
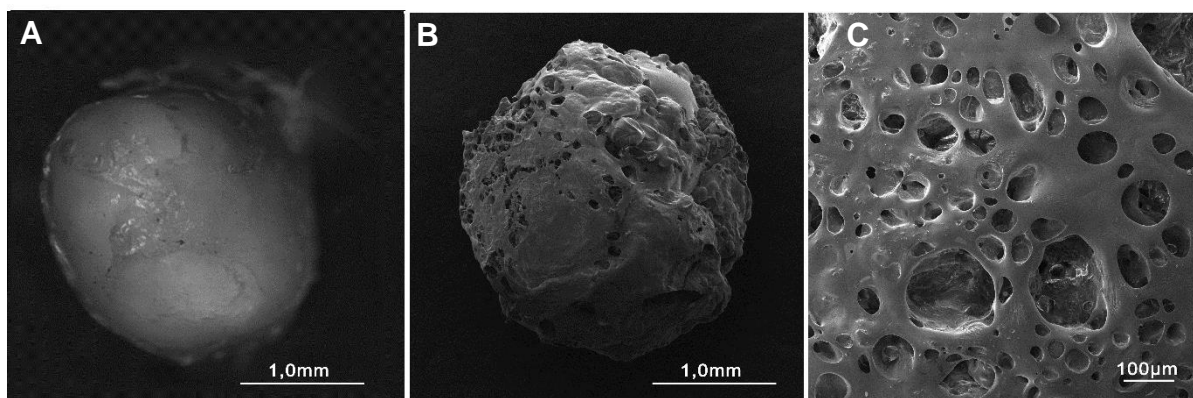


Figura 36. (A) Imagem do implante contendo 25 % p/p de SRL após 28 dias de implantado no dorso do animal, obtida por estereomicroscopia. (B,C) Imagens do implante contendo 25 % p/p de SRL após 28 dias de implantado no dorso do animal, obtidas por MEV em aumento de 30X e 150X, respectivamente.



Com base nos resultados apresentados nesses estudos, o *burst* inicial de liberação de SRL possivelmente foi resultante da difusão do fármaco que encontrava-se na superfície do implante (LEE *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2015) e a liberação posterior provavelmente foi controlada pela difusão do fármaco através dos poros e canais formados na matriz polimérica durante a degradação do polímero (FIALHO, SILVA-CUNHA, 2005; JAIN *et al.*, 1998).

Na primeira etapa deste trabalho foi possível verificar que o processo de preparo dos implantes alterou a estrutura tanto do fármaco quanto do polímero, sendo que nos implantes, o SRL se encontra no estado amorfo e o PLGA 50:50 no estado semicristalino. Esse fato poderia interferir na velocidade de degradação do PLGA 50:50 e, conseqüentemente, no perfil de liberação do SRL a partir dos implantes. Entretanto, os resultados apresentados nos estudos de liberação e biodegradação *in vivo* deste trabalho, demonstraram que essas modificações estruturais não comprometeram a biodegradação polimérica e a liberação do fármaco, uma vez que, foi evidenciado que o implantes desenvolvidos foram capazes de promover uma liberação lenta e por tempo prolongado de SRL, a qual foi mediada pela associação da difusão do fármaco e da degradação polimérica. Finalmente, não foi observada resposta inflamatória macroscopicamente importante e o processo de cicatrização não mostrou ulceração ou exsudato.

2.2. Histologia

A avaliação histológica da pele do local de inserção dos implantes foi realizada com o propósito de verificar a resposta induzida por eles no organismo dos animais.

Após sete dias de estudo, o aspecto histológico dos grupos PLGA 50:50 (**Figura 37**) e SRL (**Figura 38**) foram semelhantes. Na área de inserção do implante, observou-se a presença de macrófagos espumosos, caracterizados pela presença de citoplasma volumoso e vacuolizado, de permeio a presença de um material eosinofílico, sugestivo de resíduos do material biodegradável, circundados por uma fina cápsula de tecido fibroso. Esses achados sugerem a instalação de um discreto processo inflamatório do tipo corpo estranho, no qual as células do sistema imune produzem uma resposta frente a presença do implante (PEREIRA *et al.*, 2015), com

o intuito de promover a destruição, diluição ou isolamento do agente desconhecido (ALESSANDRI *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 1999; MEDZHITOV, 2010).

Figura 37. Fotomicroscopia da pele do animal após 7 dias da implantação do implante de PLGA 50:50. (A) 50X (B) 400X. Setas apontam os macrófagos espumosos.

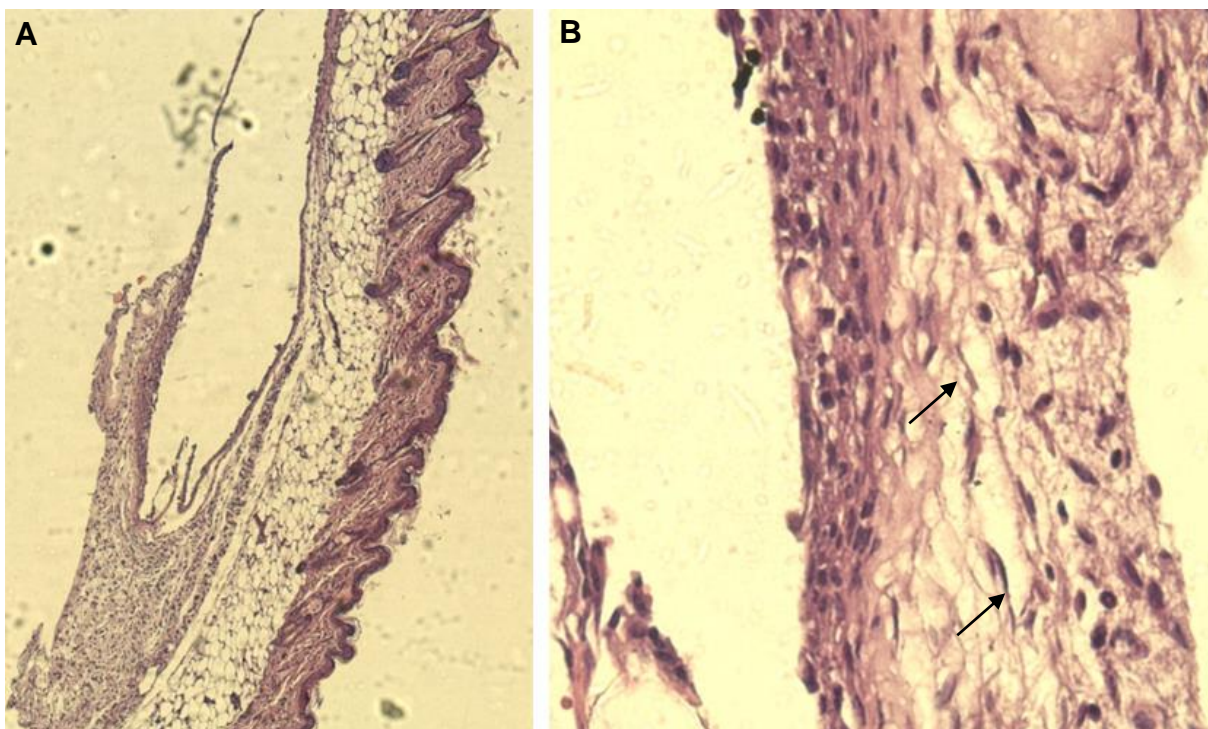
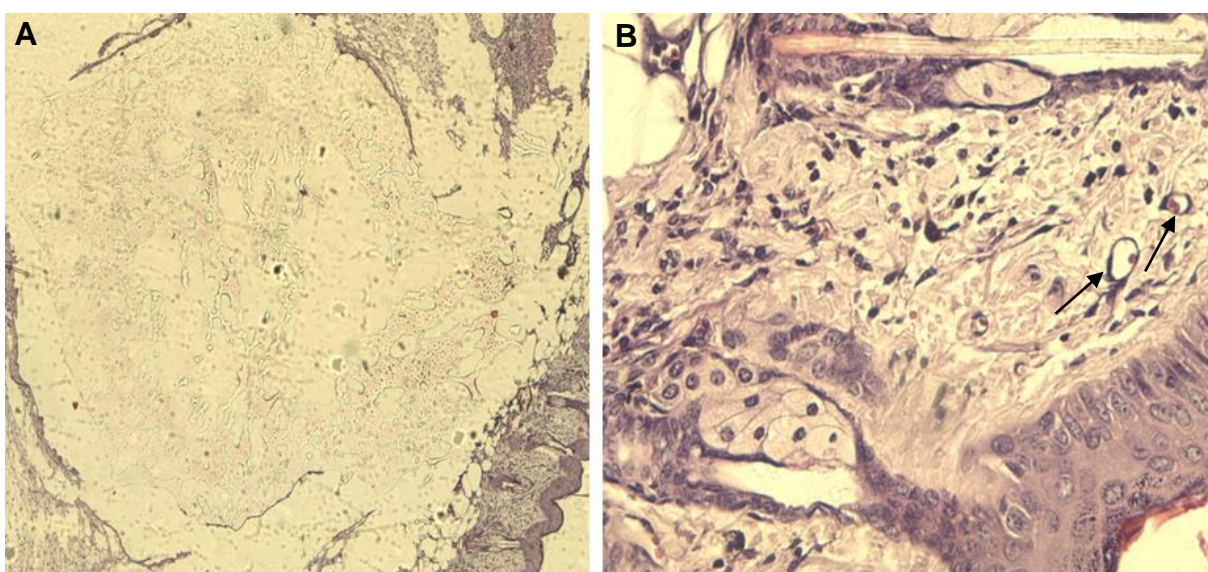


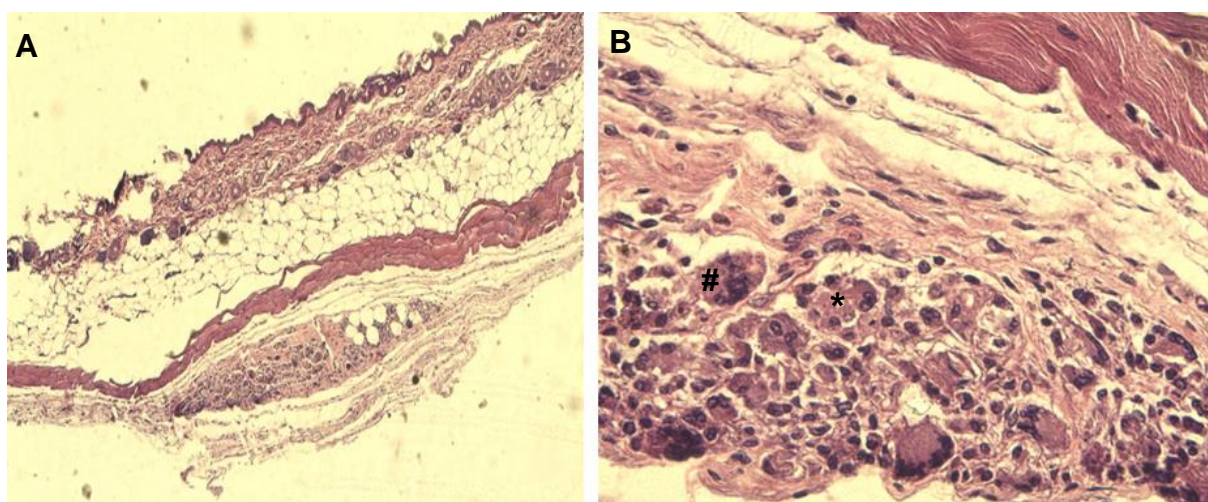
Figura 38. Fotomicroscopia da pele do animal após 7 dias da implantação do implante contendo 25% p/p de SRL. (A) 50X (B) 400X. Setas apontam os macrófagos espumosos.



Aos 42 dias pós tratamento, o aspecto histológico do grupo PLGA 50:50 diferiu do grupo SRL, com relação as características da inflamação. No grupo PLGA

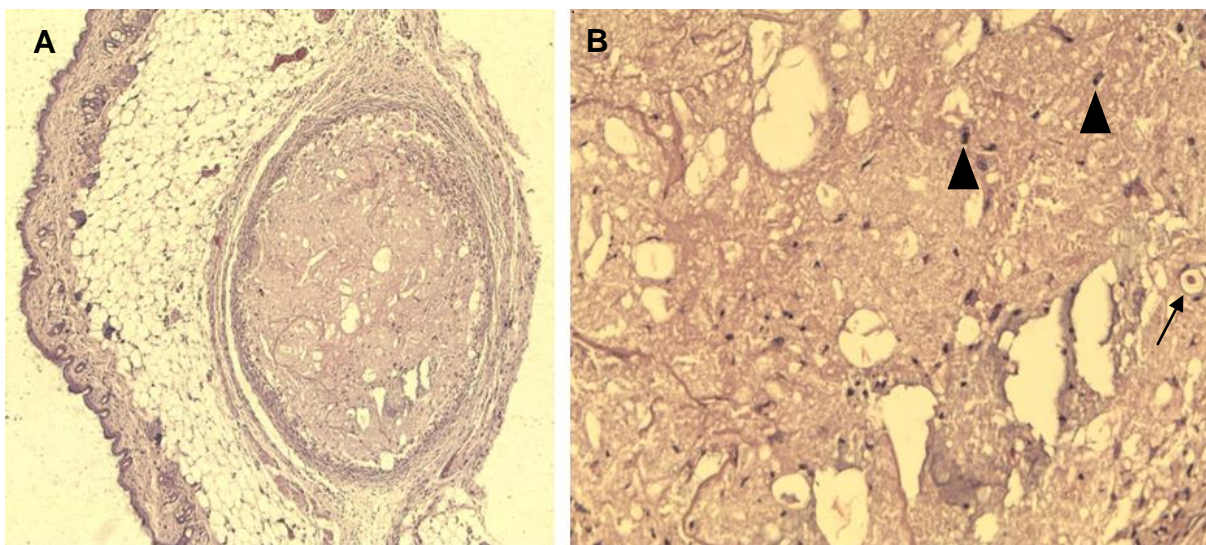
50:50 (**Figura 39**), foi observado de permeio a resquícios do biomaterial, um processo inflamatório granulomatoso, com predominância de células gigantes multinucleadas do tipo Langhans (núcleos organizados na periferia celular) e do tipo Corpo Estranho (núcleos desordenados no citoplasma celular). Alguns macrófagos e linfócitos também foram visualizados. Todo esse processo inflamatório apresentava-se circundado por uma cápsula de tecido fibroso.

Figura 39. Fotomicroscopia da pele do animal após 42 dias da implantação do implante de PLGA 50:50. (A) 50X (B) 400X. # Célula gigante multinucleada do tipo Corpo Estranho. * Célula gigante multinucleada do tipo Langhans.



No grupo SRL (**Figura 40**), após 42 dias, o processo inflamatório apresentava predominância de macrófagos espumosos. Observou-se também grande quantidade de linfócitos picnóticos e com núcleo fragmentado (cariorréxia), sugerindo a ocorrência de apoptose. No centro do processo inflamatório havia resquício de biomaterial e todo essa área apresentava-se circundada por tecido fibroso. A apoptose de linfócitos e a sua remoção por fagócitos circundantes, como os macrófagos, são eventos importantes para a resolução da inflamação e, então para o restabelecimento da homeostase tecidual (ALESSANDRI *et al.*, 2013). A quantidade de SRL liberada a partir dos implantes após 42 dias de estudo possivelmente foi capaz de causar a degeneração de linfócitos e de retardar ou impedir a fusão dos macrófagos, que levaria a formação das células gigantes multinucleadas.

Figura 40. Fotomicroscopia da pele do animal após 42 dias da implantação do implante contendo 25% p/p de SRL. (A) 50X (B) 400X. Setas apontam os macrófagos espumosos. Cabeças de seta apontam os linfócitos picnóticos.



A diferença da característica do processo inflamatório observado entre os grupos tratados com SRL aos 7 e aos 42 dias, provavelmente se deve a quantidade insuficiente de fármaco liberado aos sete dias ($0,19 \pm 0,02$ mg, dados extraídos do estudo de liberação *in vivo*) para alterar a resposta inflamatória estabelecida no local de inserção dos implantes.

A resposta inflamatória induzida pelos implantes observada neste estudo também foi relatada por um estudo semelhante descrito na literatura (PEREIRA *et al.*, 2015). Essa resposta foi esperada e sem evidentes danos ao organismo do animal, uma vez que, não promoveu alteração no peso e no comportamento dos animais, os quais foram monitorados durante todo o estudo. Além disso, macroscopicamente a área em torno dos implantes não apresentou sinais de um processo inflamatório agressivo.

2.3. Formação de tecido fibrovascular induzida por implante subcutâneo de um *pellet* de algodão

Após a avaliação histológica, foi investigado se o SRL liberado a partir dos implantes inibiria um processo inflamatório crônico.

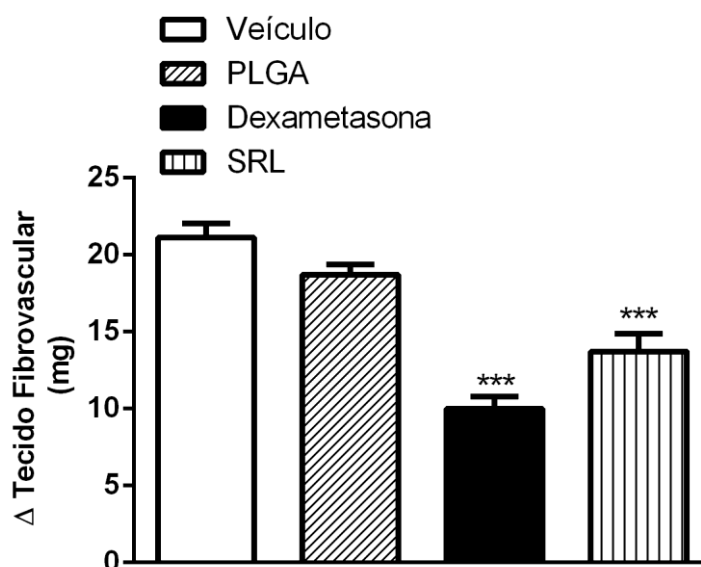
A formação de tecido fibrovascular ao redor do *pellet* de algodão foi macroscopicamente visualizada (**Figura 41**) e foi evidenciada pelo aumento da massa

do *pellet* de algodão após sete dias da inserção subcutânea do mesmo no dorso dos animais (**Figura 42**).

Figura 41. *Pellet* de algodão do grupo controle após 7 dias de implantado do dorso do animal.



Figura 42. Efeito induzido por implantes PLGA 50:50, com (25% p/p) ou sem SRL, sobre a formação de tecido fibrovascular em camundongos. Os animais dos grupos controle receberam veículo (solução salina estéril) ou dexametasona (2 mg/kg), por via oral, a cada dois dias. *** Indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0.001$). $n=7$.



Os implantes sem o fármaco não foram capazes de reduzir a formação de tecido fibrovascular. Entretanto, os implantes contendo SRL reduziram significativamente a formação do tecido fibrovascular (35,1%). Esses dados sugerem que a quantidade de SRL liberada a partir dos sistemas poliméricos ($0,59 \pm 0,09$ mg)

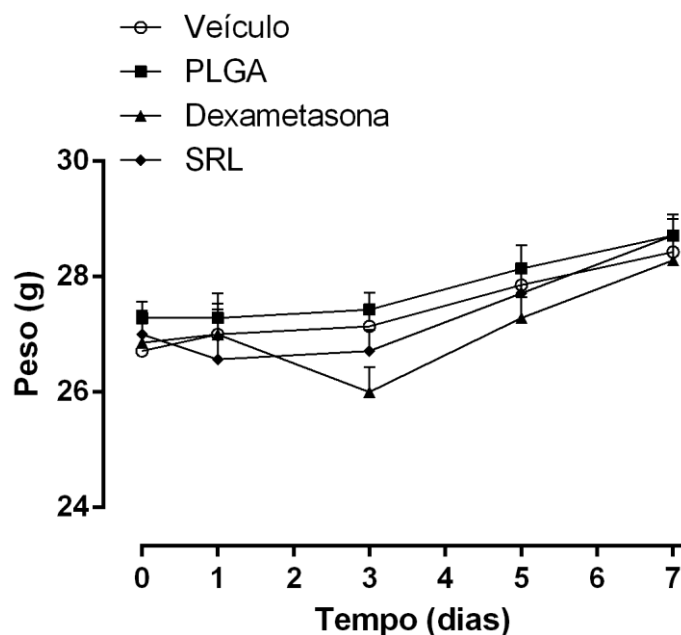
(Tabela 5), durante os sete dias de estudo, foi suficiente para desempenhar atividade anti-inflamatória e que os implantes desenvolvidos foram capazes de liberar o fármaco por tempo prolongado. Administração de dexametasona (2 mg/kg, por via oral), a cada dois dias, durante sete dias, reduziu significativamente (52,0%) a formação de tecido fibrovascular quando comparado aos animais do grupo controle (veículo).

Tabela 5. Quantidade de SRL liberado a partir dos dois implantes inseridos nos animais ao longo dos 7 dias do estudo de formação de tecido fibrovascular induzida por implante subcutâneo de um pellet de algodão (mg e %; n = 7).

| Animal | SRL liberado (mg) | SRL liberado (%) |
|----------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1 | 0,67 | 22,52 |
| 2 | 0,68 | 23,06 |
| 3 | 0,59 | 20,21 |
| 4 | 0,59 | 20,20 |
| 5 | 0,42 | 14,25 |
| 6 | 0,55 | 18,66 |
| 7 | 0,63 | 21,86 |
| Média | 0,59 | 20,11 |
| Desvio Padrão | 0,09 | 3,00 |

Em relação ao ganho de massa corporal, os animais que receberam os implantes subcutâneos, contendo ou não SRL, apresentaram ganho de massa corporal similar quando comparado aos animais do grupo controle (veículo) **(Figura 43)**. Não foram observados perda ou ganho de massa significativos e alteração no comportamento dos animais, os quais poderiam sugerir a presença de efeitos adversos sistêmicos. Desse modo, pode-se inferir que o SRL liberado a partir dos implantes, mesmo estando no estado amorfo, o qual normalmente proporciona maior taxa de dissolução e biodisponibilidade do fármaco, em relação ao fármaco no estado cristalino (HANCOCK, ZOGRAFI, 1997; EINFALT *et al.*, 2013) não induziu uma resposta sistêmica importante.

Figura 43. Variações de massas corporais dos animais ao longo do estudo. n=7.



A quantidade de SRL capaz de promover ação anti-inflamatória neste estudo está de acordo com aquela descrita no estudo de histologia ($0,58 \pm 0,20$ mg) que foi suficiente para alterar o processo inflamatório induzido pelos implantes no seu local de inserção. Entretanto, a porcentagem do fármaco liberada ($20,11 \pm 3,00\%$) foi superior a aquela observada aos sete dias do estudo de liberação *in vivo* ($12,86 \pm 0,01\%$). O perfil de liberação *in vivo* do SRL a partir dos implantes de PLGA 50:50 estudado neste trabalho revelou que a liberação do fármaco é controlada pela sua difusão através dos poros e canais formados na matriz polimérica a partir da degradação do polímero. Em estudo semelhante foi observado que a biodegradação de implantes de PLGA contendo talidomida envolvia a participação das células dos sistemas imune, as quais ao fagocitarem o material biocompatível contribuíram para a degradação do PLGA (PEREIRA *et al.*, 2015). Os resultados observados por Pereira e colaboradores (2015) dão suporte a maior liberação de SRL observada aos 7 dias nesta etapa do trabalho, uma vez que, a inflamação estabelecida no local de implantação dos sistemas poliméricos é maior devido à presença do *pellet* de algodão, o que resulta numa maior infiltração de células do sistema imune e, possivelmente, numa maior velocidade de degradação do PLGA 50:50.

A formação do tecido fibrovascular é o resultado de uma resposta angiogênica e proliferativa às lesões mecânicas e naturais desencadeadoras de um

processo inflamatório. Muitos mediadores parecem estar envolvidos na formação do tecido fibrovascular, incluindo citocinas (MOORE *et al.*, 1998), quimiocinas (LUKACS *et al.*, 1994) e eicosanóides (KAMEI *et al.*, 2004).

Estudos têm demonstrado que o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1) são importante para a regulação de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e enzimas como a óxido nítrico sintase e a ciclooxigenase-2 (CHU, 2013; GHOSH, KARIN, 2002; LAWRENCE, 2009). Um recente estudo que avaliou o efeito do tratamento crônico com baixas doses de SRL em ratos jovens, demonstrou que o SRL reduziu os níveis de TNF- α no cérebro e no sangue dos ratos (LU *et al.*, 2015). González-Mateo e colaboradores (2015) realizaram um estudo em camundongos submetidos a diálise peritoneal e também verificaram que o SRL reduziu os níveis de TNF- α no fluido peritoneal dos animais. Adicionalmente, foi demonstrado que o SRL, por inibição da via de sinalização NF- κ B, reduz a produção de quimiocinas por células THP-1 e monócitos primários humanos estimulados por endotoxina (LIN *et al.*, 2014) e a produção de citocinas inflamatórias induzidas por isoproterenol em cardiomiócitos (CHEN *et al.*, 2014). Com base nisso, a redução da formação de tecido fibrovascular promovida pelos implantes contendo SRL, pode estar relacionada com a redução da produção de mediadores inflamatórios.

A angiogênese contribui para o aumento do fluxo sanguíneo, facilitando a chegada de mediadores inflamatórios e células do sistema imune ao sítio da inflamação. Esse processo está associado a diferentes desordens inflamatórias, tais como artrite reumatóide (NAGASHIMA *et al.*, 2002; SZEKANECZ *et al.*, 2010), lesões cutâneas (GRONEBERG *et al.*, 2005) e doença inflamatória intestinal (DANESE *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2016). O VEGF desempenha um papel fundamental na formação de novos capilares e vasos e, portanto, está relacionado ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória (GUBA *et al.*, 2002). O estudo conduzido por González-Mateo e colaboradores (2015) citado anteriormente, também verificou a redução dos níveis do VEGF no fluido peritoneal. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Guba *et al.*, 2002, o qual demonstrou que o SRL reduz a secreção do VEGF por células de adenocarcinoma. Desse modo, é possível que além da hipótese proposta anteriormente envolvida na redução da formação de tecido fibrovascular promovida pelos implantes contendo SRL, a redução da secreção de VEGF também possa ser um componente chave no mecanismo da ação anti-inflamatória do SRL.

Por outro lado, Laragione e Gulko (2010), utilizando sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS) isolados a partir de tecidos sinoviais de ratos artríticos e de pacientes, demonstraram que o SRL diminuiu a invasão de FLS nos tecidos através da supressão da via de sinalização mTOR, o que sugere que a redução da formação de tecido fibrovascular observada com a utilização do SRL neste estudo também pode ser resultado de uma menor infiltração de fibroblastos no sítio de inflamação.

Nesse contexto, a redução da formação de tecido fibrovascular, no modelo avaliado, promovida pelos implantes contendo SRL, pode envolver a participação de diferentes mecanismos os quais, em conjunto ou não, contribuiriam para a supressão do processo inflamatório.

3. Conclusão

Os implantes biodegradáveis a base de PLGA contendo SRL foram capazes de promover a liberação do fármaco de forma lenta e por tempo prolongado. Os sistemas desenvolvidos não induziram alteração significativa no local de implantação que comprometesse a sua segurança. A quantidade de SRL liberada foi capaz de reduzir a resposta inflamatória crônica no modelo experimental avaliado em camundongos. Além disso, nenhuma alteração significativa no comportamento e na variação de massa corporal dos animais foi observada, sugerindo que o SRL liberado possivelmente não induziu efeitos adversos sistêmicos importantes.

Com base nos resultados apresentados, os implantes poliméricos contendo SRL apresentaram biocompatibilidade, liberação prolongada do fármaco e ação anti-inflamatória. Outros estudos devem ser realizados a fim de demonstrar a eficácia desses sistemas no tratamento de diversas doenças crônicas, principalmente aquelas que apresentam um processo inflamatório associado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os implantes de PLGA 50:50 contendo SRL foram obtidos de forma satisfatória por meio de um método adequado. As alterações observadas na caracterização dos sistemas não apresentaram influência significativa na eficácia e segurança dos implantes, os quais apresentaram biocompatibilidade e foram capazes de promover a liberação do fármaco de forma lenta, por tempo prolongado e em quantidade suficiente, apresentando atividade anti-inflamatória, sem evidência de efeitos adversos sistêmicos. Dessa forma, os sistemas poliméricos de liberação de SRL, desenvolvidos neste trabalho, podem ser uma alternativa promissora no manejo terapêutico de diferentes condições clínicas, principalmente aquelas que apresentam um processo inflamatório associado.

Com base nos resultados do presente estudo, pretende-se como perspectivas: elucidar o mecanismo envolvido na ação anti-inflamatória do SRL liberado pelo implante; validar um método bioanalítico para quantificação do fármaco no sangue; avaliar a biodisponibilidade e biodistribuição do SRL liberado após implantação dos implantes em animais de experimentação; avaliar a eficácia dos sistemas desenvolvidos em modelos de câncer, artrite e/ou outras doenças que apresentam uma resposta inflamatória associada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, R. T.; GIBBONS, J. J.; GRAZIANI, E. I. Chemistry and pharmacology of rapamycin and its derivatives. **The enzymes**, v. 27, p. 329-366, 2010.
- ALESSANDRI, A. L. *et al.* Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology and therapeutics**, v. 139, p. 189-212, 2013.
- AMJADI, I.; RABIEE, M.; HOSSEINI, M. S. Anticancer activity of nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: in-vitro evaluation. **Iranian journal of pharmaceutical research**, v. 12, p. 623-634, 2013.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, J. L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6^a. ed. São Paulo: Premier, 2000. 568 p.
- ATHANASIOU, K. A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWAL, C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v. 17, p. 93-102, 1996.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2^a. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005. 678 p.
- AZEVEDO, L. M. S. **Síntese do niobato de sódio a partir do óxido de nióbio e nióbio metálico**. Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, p. 97. 2010.
- BARRY, R. J. *et al.* Pharmacotherapy for uveitis: current management and emerging therapy. **Clinical ophthalmology**, v. 8, p. 1891–1911, 2014.
- BHUSAL, P. *et al.* Controlled release drug delivery systems to improve post-operative pharmacotherapy. **Drug delivery and translational research**, v. 6, p. 441–451, 2016.
- BIAN, H. *et al.* In vitro study of poly(ethylene carbonate) as a drug eluting stent coating. **Progress in natural science: materials international**, v. 22, n. 4, p. 295-302, 2012.
- BJORNSTI, M.; HOUGHTON, P. J. The TOR pathway: a target for cancer therapy. **Nature reviews**, v. 4, p. 335-348, 2004.
- BLASI, P. *et al.* Plasticizing effect of water on poly(lactide-co-glycolide). **Journal of controlled release**, v. 108, p. 1-9, 2005.
- BLASI, P. *et al.* Ketoprofen poly(lactide-co-glycolide) physical interaction. **AAPS pharmSciTech**, v. 8, n. 2, p. E78-E85, 2007.
- BOZSAK, F. *et al.* Optimization of drug delivery by drug-eluting stents. **PLoS one**, v. 10, n. 6, p. 1-29, 2015.
- CAI, Y. *et al.* Long-acting preparations of exenatide. **Drug design, development and therapy**, v. 7, p. 963–970, 2013.
- CARVALHO, S. R. *et al.* Characterization and pharmacokinetics analysis of crystalline versus amorphous rapamycin dry powder via pulmonary administration in rats. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 136-147, 2014.

- CHEN, X. *et al.* Rapamycin attenuated cardiac hypertrophy induced by isoproterenol and maintained energy homeostasis via inhibiting NF- κ B activation. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 868753, 2014.
- CHU, W. M. Tumor necrosis factor. **Cancer lett**, v. 328, n. 2, p. 222-225, 2013.
- COLLINS, T.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Pathologic basis of disease**. 6th. ed. Philadelphia: Saunders, 1999.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista portuguesa de farmácia**, v. 49, n. 4, p. 181-190, 1999.
- DANESE, S. *et al.* Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 130, n. 7, p. 2060-2073, 2006.
- DASH, A. K.; CUDWORTH II, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 40, n. 1, p. 1-12, 1998.
- DING, T. *et al.* Slow-releasing rapamycin-coated bionic peripheral nerve scaffold. **Life sciences**, v. 122, p. 92-99, 2015.
- EINFALT, T. *et al.* Methods of amorphization and investigation of the amorphous state. **Acta pharmaceutica**, v. 63, p. 305–334, 2013.
- ELOY, J. O. *et al.* Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74-82, 2016.
- ELSAID, N. *et al.* Positively charged amphiphilic chitosan derivative for the transscleral delivery of rapamycin. **Physiology and pharmacology**, v. 53, p. 8105-8111, 2012.
- ELSAID, N.; SOMAVARAPU, S.; JACKSON, T. L. Cholesterol-poly(ethylene) glycol nanocarriers for the transscleral delivery of sirolimus. **Experimental eye research**, v. 121, p. 121-129, 2014.
- FALKE, L. L. *et al.* Local therapeutic efficacy with reduced systemic side effects by rapamycin-loaded subcapsular microspheres. **Biomaterials**, v. 42, p. 151-160, 2015.
- FIALHO, S. L. *et al.* Implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 66, p. 891- 896, 2003.
- FIALHO, S. L.; BEHAR-COHEN, F.; SILVA-CUNHA, A. Dexamethasone-loaded poly(epsilon-caprolactone) intravitreal implants: a pilot study. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 637-646, 2008.
- FIALHO, S. L.; SILVA-CUNHA, A. Manufacturing techniques of biodegradable implants intended for intraocular application. **Drug delivery**, v. 12, p. 109–116, 2005.
- FUHRMANN, A. *et al.* Molecular mechanisms underlying the effects of cyclosporin A and sirolimus on glucose and lipid. metabolism in liver, skeletal muscle and adipose tissue in an in vivo rat model. **Biochemical pharmacology**, v. 88, p. 216–228, 2014.
- GEISSLER, E. K.; SCHLITT, H. J.; THOMAS, G. mTOR, cancer and transplantation. **American journal of transplantation**, v. 8, p. 2212-2218, 2008.
- GHOSH S, K. M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. **Cell**, v. 109, p. S81–S96, 2002.

GONZÁLEZ-MATEO, G. T. *et al.* Rapamycin protects from type-I peritoneal membrane failure inhibiting the angiogenesis, lymphangiogenesis, and endo-MT. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta materialia**, v. 48, p. 263-277, 2000.

GRONEBERG, D. A. *et al.* Mast cells and vasculature in atopic dermatitis—potential stimulus of neoangiogenesis. **Allergy**, v. 60, n. 1, p. 90-97, 2005.

GUBA, M. *et al.* Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. **Nature medicine**, v. 8, n. 2, p. 128-135, 2002.

HANCOCK, B. C.; ZOGRAFI, G. Characteristics and significance of the smorphous state in pharmaceutical systems. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 86, n. 1, p. 1-12, 1997.

IMRALI, A. *et al.* Rapamycin inhibits prostate cancer cell growth through cyclin D1 and enhances the cytotoxic efficacy of cisplatin. **American journal of cancer research**, v. 6, n. 8, p. 1772-1784, 2016.

ISMAIL, A. A.; VAN DE VOORT, F. R.; SEDMAN, J. Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications. In: PARÉ, J. R. J.; BÉLANGER, J. M. R. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**. Sainte-Anne-de-Bellevue: Elsevier, v. 18, 1997. p. 93-139.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JAIN, R. *et al.* Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 24, p. 703-727, 1998.

JOHNSTON, L. J. *et al.* Rapamycin (sirolimus) for treatment of chronic graft-versus-host disease. **Biology of blood and marrow transplantation**, v. 11, n. 1, p. 47-55, 2005.

JOZWIAK, J.; JOZWIAK, S.; OLDAK, M. Molecular activity of sirolimus and its possible application in tuberous sclerosis treatment. **Medicinal research reviews**, v. 26, n. 2, p. 160-180, 2006.

JÓZWIAK, L.; KSIĄZEK, A. Painful crural ulcerations and proteinuria as complications after several years of therapy with mTOR inhibitors in the renal allograft recipient: a case report. **Transplantation proceedings**, v. 45, p. 3418 - 3420, 2013.

KAHAN, B. D. Sirolimus: a ten-year perspective. **Transplantation proceedings**, v. 36, p. 71-75, 2004.

KAMEI, D. *et al.* Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 32, p. 33684-33695, 2004.

KANG, S. N. *et al.* Comparison of phytoncide with sirolimus as a novel drug candidate for drug-eluting stent. **Biomaterials**, v. 44, p. 1-10, 2015.

- KATIYAR, S. S. *et al.* Co-delivery of rapamycin- and piperine-loaded polymeric nanoparticles for breast cancer treatment. **Drug delivery**, v. 23, n. 7, p. 2608-2616, 2016.
- KAYSER, M. G. Monitorização terapêutica de sirolimus. **RBAC**, v. 36, n. 1, p. 43-46, 2004.
- KHARE, V. *et al.* Synthesis, characterization and mechanistic-insight into the anti-proliferative potential of PLGA-gemcitabine conjugate. **International journal of pharmaceuticals**, v. 470, n. 1-2, p. 51-62, 2014.
- KHONDEE, S. *et al.* Targeted therapy of colorectal neoplasia with rapamycin in peptide-labeled pegylated octadecyl lithocholate micelles. **Journal of controlled release**, v. 199, p. 114-121, 2015.
- KIM, Y. C. *et al.* Ocular delivery of macromolecules. **Journal of controlled release**, v. 190, p. 172-181, 2014.
- KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. **Ophthalmologica**, v. 215, p. 143-155, 2001.
- KUMAR, P. V.; LOKESH, B. V. Designing and in-vitro characterization of micelle forming amphiphilic PEGylated rapamycin nanocarriers for the treatment of gastric cancer. **Current drug delivery**, v. 11, n. 5, p. 613-620, 2014.
- LANCE, K. D. *et al.* In vitro and in vivo sustained zero-order delivery of rapamycin (sirolimus) from a biodegradable intraocular device. **Investigative ophthalmology and visual science**, v. 56, n. 12, p. 7331-7337, 2015.
- LARAGIONE, T.; GULKO, P. S. mTOR regulates the invasive properties of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. **Molecular medicine**, v. 16, p. 352-358, 2010.
- LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold spring harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009.
- LEE, S. S. *et al.* Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. **Pharmaceutical research**, v. 27, p. 2043-2053, 2010.
- LI, G. *et al.* Rapamycin loaded magnetic Fe₃O₄/carboxymethylchitosan nanoparticles as tumor-targeted drug delivery system: synthesis and in vitro characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 379-388, 2015.
- LI, J. N. *et al.* Influence of sirolimus-induced TGF- β secretion on mouse Treg cell proliferation. **Genetics and molecular research**, v. 14, n. 4, p. 18569-18579, 2015.
- LIN, H. Y. *et al.* Effects of the mTOR inhibitor rapamycin on monocyte-secreted chemokines. **BMC immunology**, v. 15, p. 37-45, 2014.
- LIU, D. *et al.* The smart drug delivery system and its clinical potential. **Theranostics**, v. 9, n. 6, p. 1306-1323, 2016.
- LOO, S. C. J. *et al.* Effect of isothermal annealing on the hydrolytic degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA). **Biomaterials**, v. 26, p. 2827-2833, 2005.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

- LU, Z. *et al.* Effect of chronic administration of low dose rapamycin on development and immunity in young rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135256, 2015.
- LUKACS, N. W. *et al.* Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory granuloma fibroblasts. **The american journal of pathology**, v. 144, p. 711-718, 1994.
- MACDONALD, A. *et al.* Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. **Clinical therapeutics**, v. 22, p. B101-B121, 2000.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.
- MANNHEIMER, W. A. **Microscopia dos materiais - Uma introdução**. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2002. 221 p.
- MANOHAR, P. M. *et al.* Retrospective study of sirolimus and cyclophosphamide in patients with advanced differentiated thyroid cancers. **Journal of thyroid disorders and therapy**, v. 4, n. 3, p. 1-16, 2015.
- MATSUZAKI, T. *et al.* Intra-articular administration of gelatin hydrogels incorporating rapamycinemicelles reduces the development of experimental osteoarthritis in a murine model. **Biomaterials**, v. 35, p. 9904-9911, 2014.
- MCKEAGE, K. Pasireotide in acromegaly: a review. **Drugs**, v. 75, n. 9, p. 1039-1048, 2015.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.
- MENNUNI, M. G.; PAGNOTTA, P. A.; STEFANINI, G. G. Coronary stents: the impact of technological advances on clinical outcomes. **Annals of biomedical engineering**, v. 44, n. 2, p. 488-496, 2016.
- MITA, M. M.; MITA, A.; ROWINSKY, E. K. Mammalian target of rapamycin: a new molecular target for breast cancer. **Clinical breast cancer**, v. 4, n. 2, p. 126-137, 2003.
- MOORE, A. R. *et al.* Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 6, n. 1, p. 19-23, 1998.
- NAGASHIMA, M. *et al.* Study of the mechanism involved in angiogenesis and synovial cell proliferation in human synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis using SCID mice. **Laboratory investigation**, v. 82, p. 981-988, 2002.
- NAIR, R. *et al.* Influence of various drugs on the glass transition temperature of poly(vinylpyrrolidone): a thermodynamic and spectroscopic investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 83-96, 2001.
- NGUYEN, Q. D. *et al.* Intravitreal sirolimus for noninfectious uveitis: a phase III sirolimus study assessing double-masked uveitis treatment (SAKURA). **Ophthalmology**, v. 123, n. 11, p. 2413-2423, 2016.
- NGUYEN, Q. D. *et al.* The effect of different dosing schedules of intravitreal sirolimus, a mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, in the treatment of non-infectious uveitis (an american ophthalmological society thesis). **Transactions of the american ophthalmological society**, v. 114, p. T31-T314, 2016.

- NIDHI *et al.* Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: a brief review. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 24, p. 458–472, 2016.
- NIETO, A. *et al.* Surface engineering of porous silicon microparticles for intravitreal sustained delivery of rapamycin. **Investigative ophthalmology visual science**, v. 56, p. 1070–1080, 2015.
- OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.
- ONYESOM, I. *et al.* Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, p. 4281–4293, 2013.
- PARHI, P.; SAHOO, S. K. Trastuzumab guided nanotheranostics: a lipid based multifunctional nanoformulation for targeted drug delivery and imaging in breast cancer therapy. **Journal of colloid and interface science**, v. 451, p. 198–211, 2015.
- PARK, H. *et al.* Phase I dose-escalation study of the mTOR inhibitor sirolimus and the HDAC inhibitor vorinostat in patients with advanced malignancy. **Oncotarget**, v. 7, n. 41, p. 67521-67531, 2016.
- PARK, M. *et al.* Preparation and characterization of bee venom-loaded PLGA particles for sustained release. **Pharmaceutical development and technology**, v. 14, p. 1-8, 2016.
- PARK, S. R. *et al.* Biosynthesis of rapamycin and its regulation: past achievements and recent progress. **The Journal of antibiotics**, v. 63, n. 8, p. 434-441., 2010.
- PEREIRA, B. G. *et al.* Development of thalidomide-loaded biodegradable devices and evaluation of the effect on inhibition of inflammation and angiogenesis after subcutaneous application. **Biomedicine and pharmacotherapy**, v. 71, p. 21-28, 2015.
- PEYMAN, G. A.; GANIBAN, G. J. Delivery systems for intraocular routes. **Advanced drug delivery reviews**, v. 16, p. 107-123, 1995.
- PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Brazilian journal of pharmaceutical sciences**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.
- PINTO-LEITE, R. *et al.* mTOR inhibitors in urinary bladder cancer. **Tumour biology**, v. 37, n. 9, p. 11541-11551, 2016.
- PRADO, G. F. J. *et al.* Clinical performance of a novel ultrathin strut, low-dose, sirolimus-eluting stent with abluminal-only biodegradable polymeric coating for patients undergoing percutaneous coronary intervention in the daily practice. **Cardiovascular diagnosis and therapy**, v. 5, n. 6, p. 414-419, 2015.
- RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicles for bioactive drugs. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1970-1978, 2006.

- ROLEDER, T. *et al.* Outcomes of biodegradable polymer sirolimus-eluting PROLIM stent in patients with coronary artery disease. Results of 12-month follow-up of prospective registry. **Kardiologia polska**, v. 74, n. 5, p. 411-417, 2016.
- ROUF, M. A. *et al.* Rapamycin-cyclodextrin complexation: improved solubility and dissolution rate. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 70, p. 167–175, 2011.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERREZ, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.
- SCHWENDEMANA, S. P. *et al.* Injectable controlled release depots for large molecules. **Journal of controlled release**, v. 190, p. 240–253, 2014.
- SEHGAL, S. N. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. **Clinical biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 335-340, 1998.
- SEHGAL, S. N. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. **Transplantation proceedings**, v. 35, n. 3 Suppl, p. S7-S14, 2003.
- SEHGAL, S. N.; BAKER, H.; VÉZINA, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. **The journal of antibiotics**, v. 28, n. 10, p. 727-732, 1975.
- SHAH, S. S. *et al.* Drug delivery to the posterior segment of the eye for pharmacologic therapy. **Expert review of ophthalmology**, v. 5, n. 1, p. 75-93, 2010.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Infrared Spectrometry. In: _____ **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005. Cap. 2, p. 72-126.
- SIMAMORA, P.; ALVAREZ, J. M.; YALKOWSKY, S. H. Solubilization of rapamycin. **International journal of pharmaceutics**, v. 213, n. 1, p. 25-29, 2001.
- SOJITRA, P. *et al.* Preclinical evaluation of a novel abluminal surface coated sirolimus eluting stent with biodegradable polymer matrix. **Cardiovascular diagnosis and therapy**, v. 5, n. 4, p. 254-263, 2015.
- STACCHIOTTI, S. *et al.* Sirolimus in advanced epithelioid hemangioendothelioma: a retrospective case-series analysis from the italian rare cancer network database. **Annals of surgical oncology**, v. 23, n. 9, p. 2735-2744, 2016.
- STAMATIALIS, D. F. *et al.* Medical applications of membranes: drug delivery, artificial organs and tissue engineering. **Journal of membrane science**, v. 308, n. 1-2, p. 1-34, 2008.
- SUGA, M. *et al.* Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. **Progress in solid state chemistry**, v. 42, n. 1, p. 1-21, 2014.
- SZEKANECZ, Z. *et al.* New insights in synovial angiogenesis. **Joint bone spine**, v. 77, p. 13-19, 2010.
- THRIMAWITHANA, T. R. *et al.* Drug delivery to the posterior segment of the eye. **Drug discovery today**, v. 16, n. 5, p. 270-277, 2011.

- TREPANIER, D. J. *et al.* Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update. **Clinical biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 345–351, 1998.
- VELEZ, G.; WHITCUP, S. M. New developments in sustained release drug delivery for the treatment of intraocular disease. **British journal of ophthalmology**, v. 83, p. 1225-1229, 1999.
- VÉZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. **The Journal of antibiotics**, v. 28, n. 10, p. 721-726, 1975.
- WAAL, E. J. *et al.* Mechanistic investigations on the etiology of Risperdal(®) Consta(®)-induced bone changes in female Wistar Hannover rats. **Toxicology**, v. 299, n. 2-3, p. 90-98, 2012.
- WANG, F. *et al.* Combined image guided monitoring the pharmacokinetics of rapamycin loaded human serum albumin nanoparticles with a split luciferase reporter. **Nanoscale**, v. 8, n. 7, p. 3991-4000, 2016.
- WANG, Y. *et al.* Reversible switching between pressure-induced amorphization and thermal-driven recrystallization in VO₂(B) nanosheets. **Nature communications**, v. 7, p. 1-8, 2016.
- YÁÑEZ, J. A. *et al.* Pharmacometrics and delivery of novel nanoformulated PEG-b-poly(ε-polycaprolactone) micelles of rapamycin. **Cancer chemother pharmacology**, v. 61, p. 133-144, 2008.
- YASUKAWA, T. *et al.* Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 52, p. 25-36, 2001.
- YASUKAWA, T. *et al.* Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. **Progress in retinal and eye research**, v. 23, p. 253-281, 2004.
- YU, Q. *et al.* Lipids-based nanostructured lipid carriers (NLCs) for improved oral bioavailability of sirolimus. **Drug delivery**, v. 23, n. 4, p. 1469-1475, 2016.
- ZAZA, G. *et al.* Systemic and nonrenal adverse effects occurring in renal transplant patients treated with mTOR inhibitors. **Clinical and developmental immunology**, v. 2013, p. 1-13, 2013.
- ZHOU, Y. *et al.* Placental growth factor enhances angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells via PI3K/Akt pathway: potential implications of inflammation bowel disease. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 470, n. 4, p. 967-974, 2016.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109–110, 1983.

ANEXOS

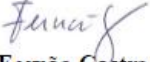
Apresentação em eventos científicos:




Certificado

Certificamos que o resumo “DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTES POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO SIROLIMUS” dos autores Bruna Lopes da Costa, Renes de Resende Machado, Márcio de Matos Coelho, Elionai Cassiana de Lima Gomes, Sílvia Ligório Fialho, Armando Silva-Cunha, foi apresentado por BRUNA LOPES DA COSTA durante sessão de painéis no II Simposio em Ciências Farmacêuticas (SIMCIFAR 2016) realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, no período de 17 a 19 de novembro de 2016, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 19 de novembro de 2016.


Prof. Fernão Castro Braga
 Comissão organizadora


Renata Salgado Fernandes
 Comissão organizadora



We certify that

BRUNA LOPES DA COSTA

attended the
11th International Congress of Pharmaceutical Sciences
 held on November 15-18, 2017

Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, November 18th, 2017.


 Priscyla Daniele Marcato Gaspari
 Scientific Committee




 Maria Vitória Lopes Badur Bentley
 DEAN - FCFP - USP

Artigo científico publicado:

Journal of Drug Delivery Science and Technology 44 (2018) 373–379



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

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

Sirolimus-loaded biodegradable implants induce long lasting anti-inflammatory and antiangiogenic effects

Bruna Lopes Costa^a, Renes de Resende Machado^a, Mayara Rodrigues Brandão Paiva^a, Rogéria Serakides^b, Márcio de Matos Coelho^c, Armando Silva-Cunha^{a,1}, Sílvia Ligório Fialho^{a,*,1}

^a Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, CEP 31270-901, Brazil

^b School of Veterinary, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, CEP 31270-901, Brazil

^c Pharmaceutical Research and Development, Esopaki Dias Foundation, Belo Horizonte, CEP 30510-010, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
Sirolimus
Implant
Inflammation
Angiogenesis
Prolonged release

ABSTRACT

Sirolimus is an immunosuppressive drug with activity in rheumatoid arthritis through inhibition of mTOR and T-lymphocytes activation and proliferation. However, its side effects limit usefulness. In this study, we developed sirolimus-loaded biodegradable implants, evaluated *in vivo* release of the drug and anti-inflammatory and antiangiogenic activities. Implants containing sirolimus were inserted into the subcutaneous tissue of mice and drug released was determined during 42 days. Histology of the skin and subcutaneous tissue close to the implanted site was performed after 7 and 42 days. The antiangiogenic activity of sirolimus implants was evaluated in the chorioallantoic membrane (CAM) from chicken eggs. The mice model of fibrovascular tissue growth induced by implantation of a subcutaneous cotton pellet was used to evaluate anti-inflammatory activity. Sirolimus implant promoted a slow release of the drug during 42 days. Histology did not show signs of intense local inflammatory response at the site of implantation. Sirolimus implants reduced vessels formation in the CAM and proliferation of fibrovascular tissue. Concluding, sirolimus-loaded implants reduced angiogenesis and chronic inflammatory response in the models evaluated. This preliminary study indicates that the implants are safe to the experimental animals and that they may represent a promising alternative for the treatment of chronic inflammation.

1. Introduction

Sirolimus, a macrolide compound produced by *Streptomyces hygroscopicus*, is an immunosuppressive agent indicated for the prophylaxis of organ rejection in patients receiving renal transplants. It has also been shown that sirolimus inhibits T-lymphocyte activation and proliferation, as well as antibody production, thus exhibiting antineoplastic properties. Sirolimus binds to FK-binding protein-12 (FKBP-12) to form a complex that inhibits the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR), a regulatory protein kinase. This inhibition suppresses cytokine-driven T-cell proliferation resulting in inhibition of the progression of the cell cycle [1–4].

Generally, mTOR inhibitors may decrease the incidence of comorbidities associated with chronic kidney disease and transplantation including protection from atheroma progression and complications correlated to polycystic kidney disease [5]. Moreover, sirolimus exhibits anti-inflammatory and antiangiogenic activities. Orhan et al.

(2013) [6] reported that sirolimus decreases the arthritic lesions and paw edema and exhibits antihyperalgesic and anti-allodynic activities in a model of rat adjuvant-induced arthritis. Furthermore, sirolimus also reduces the endothelial cell response to vascular endothelial growth factor (VEGF), an effect that contributes to its antiangiogenic activity [7,8].

However, treatment with sirolimus has been associated with side effects such as anemia, skin lesions, impaired wound healing, proteinuria, dyslipidemia, insulin resistance and diabetes [9,10]. In order to improve the pharmacokinetic profile of the sirolimus and enhance medication efficacy, some sirolimus delivery systems have been developed [11–15]. Nevertheless, some challenges such as controlled release over long periods of time are still a problem. Considering that implantable polymer systems promote safely deliver doses of drug to required locations over long periods of time, the development of sirolimus-loaded biodegradable implants may be an important alternative. These devices may promote a long lasting release of sirolimus with

* Corresponding author. Pharmaceutical Research and Development, Esopaki Dias Foundation, Rua Conde Pereira Carneiro, 80 – Gambleira CEP 30510-010, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Email address: silvia.fialho@fmed.ufmg.br (S.L. Fialho).

¹ A. Silva-Cunha and S.L. Fialho are joint senior authors.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.018>

Received 6 June 2017; Received in revised form 24 January 2018; Accepted 24 January 2018
1773-2247/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

maintenance of effective therapeutic levels and may also allow targeted drug delivery thus reducing the risk of systemic side effects [16,17].

In the present study, we prepared sirolimus-loaded biodegradable implants and evaluated their anti-angiogenic and anti-inflammatory activity in two experimental models.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Sirolimus was a gift from Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (São Paulo, Brazil). Poly-lactide-co-glycolide copolymer (PLGA 50:50, inherent viscosity of 0.4 dL/g; Purac Biomaterials, São Paulo, Brazil), dexamethasone 21-phosphate disodium salt (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), methanol and acetonitrile HPLC grade (Merck Brazil, São Paulo, Brazil) were used. Ultrapure water was produced by a Milli-Q System (Millipore, Massachusetts, USA). Other chemicals were of analytical grade.

2.2. Preparation of biodegradable sirolimus-loaded PLGA implants

The implants were prepared according to the technique described by Fialho and Silva Cunha (2005) [18]. Firstly, 100 mg of the mixture of sirolimus and the polymer (PLGA 50:50) at a ratio of 1:4, were dissolved in 2 ml of acetonitrile and the resulting solution was lyophilized. The powder obtained was molded into rods using a hot plate heated at 100–120 °C. The sirolimus implants, weighing on average 6.0 ± 0.1 mg, had 1.5 ± 0.1 mm in diameter and 4.5 ± 0.1 mm in length (Fig. 1A). The final concentration of sirolimus homogeneously dispersed in the polymeric matrix was 25% w/w.

2.3. Animals

Female Swiss mice (25–30 g) with free access to food and water were used. The animals were kept in an acclimatized room with a 12-h light-dark cycle during the whole experiment. The study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Federal University of Minas Gerais (Protocol n° 172/2016, Belo Horizonte, Brazil) and carried out according to the ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals [19].

2.4. *In vivo* sirolimus release study

Before insertion of the implants, mice were anesthetized with a mixture of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) by the intraperitoneal (i.p.) route. The dorsum was shaved and the skin wiped with 70% v/v ethanol. The implants were inserted through a 1 cm

incision (Fig. 1B). The sirolimus-loaded implant was inserted into the subcutaneous tissue of 20 mice. At days 3, 7, 14, 28 and 42 after the insertion of the implants, groups of four mice were euthanized and the implants were removed and gently washed with ultrapure water to discard biological residues. The amount of sirolimus released *in vivo* was calculated indirectly from the retrieved implants. For that, each collected implant was dissolved in 5 ml of acetonitrile so that the remained drug could be analyzed. The analysis were realized by high performance liquid chromatography (LabChrom Elite UV/VIS, Merck Hitachi, Malta, NY; L-2130 pump, L-2200 autoinjector, L-2300 oven, L-2400 UV detector) equipped with a C18 column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m particle size; Phenomenex), thermostated at 50 °C and a UV detector set at 278 nm. The mobile phase was composed of acetonitrile:methanol (20:80) at a flow rate of 1.0 mL/min. In these conditions, the retention time of sirolimus was about 3.0 min. The area of the sirolimus peak was reported to a calibration curve for the determination of drug concentration.

2.5. Evaluation of the morphological changes of the implants

In another protocol, we evaluated the morphological changes of the implants surfaces after their insertion into the subcutaneous tissue. The sirolimus-loaded implant was inserted into the subcutaneous tissue of nine mice. At days 7, 14 and 28 after the insertion of the implants, groups of three mice were euthanized and the implants were removed for stereomicroscopy and scanning electron microscopy analysis. Stereomicroscopy analysis was performed using an Olympus microscope (SZ61 TR, Olympus, Brazil) at a magnification of 35 \times without any special pre-treatment. Scanning electron microscopy (SEM) analysis was performed using a FEG-Quanta 200 FEI microscope (FEI, USA) operating at 5 kV. Before visualization, the implants were gently washed with distilled water, blotted with wipes to dry off excess water and then dried for 72 h in a vacuum desiccator at room temperature. After drying, they were mounted on aluminum stubs. Prior to microscopic examination, the samples were sputtercoated with a gold layer under an argon atmosphere for 1 min (BALTEC MED020 Coating System, BALTEC AG, Germany). The implant surfaces were viewed at 150 \times magnification. Implants not inserted into the animal dorsum were also analyzed for comparison using the same protocol as described above.

2.6. Histological analysis

Two groups of eight mice each were used. Group 1 received sirolimus-loaded implants and group 2 received implants without the drug. The implants were inserted using the same protocol as described in the *in vivo* release study. At days 7 and 42 after the insertion of the implants, four mice of each group were euthanized and the surrounding

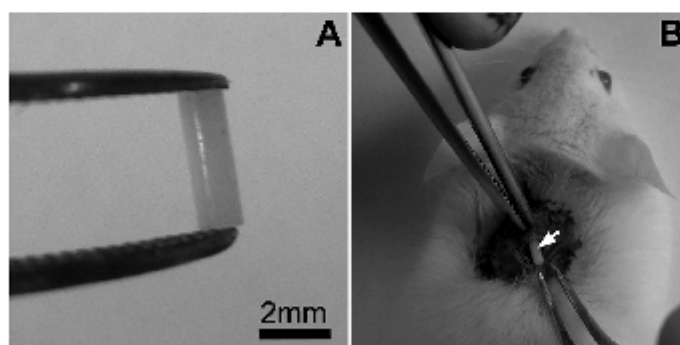


Fig. 1. (A) Sirolimus-loaded implant (weight: 6.0 ± 0.1 mg; length: 4.5 ± 0.1 mm; diameter: 1.5 ± 0.1 mm). (B) Insertion of the sirolimus-loaded implant into the dorsum of a mouse (Arrow: sirolimus-loaded implant).

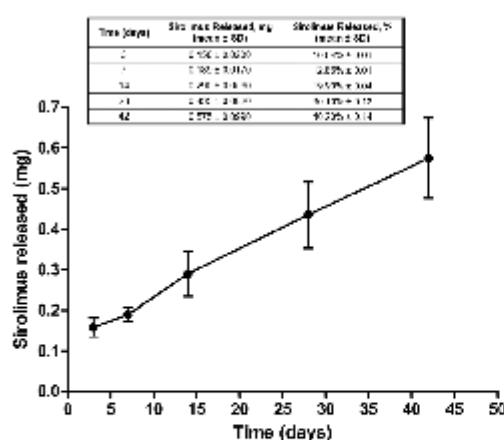


Fig. 2. Mean sirolimus amounts released from the implants after insertion into the subcutaneous tissue of mice throughout 42 days of the study. Table shows the amounts of sirolimus released throughout the study (mg and %; $n = 4$).

skin and subcutaneous tissue were removed for histological analysis. Samples were taken 1 cm each side of the implant and fixed in 10% neutral phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin, cut at 4 μ m and stained with haematoxylin-eosin. The histological analysis was performed using an optical microscope (Leica Microsystems, Germany) at 50 \times or 400 \times magnification.

2.7. Chorioallantoic membrane assay

The method previously described by Nowak-Sliwinska et al. [30] with some modifications was used. Fertilized chicken eggs ($n = 12$ for each group) were placed in a hatching incubator maintained at 37 $^{\circ}$ C and 60% humidity. Three days after fertilization, a hole of approximately 1 cm in diameter was made in the eggshell to provide access to the chorioallantoic membrane (CAM). Five days after fertilization, samples of sirolimus solution (10 μ l, 500 μ M) and biodegradable implants (1.5 mm in diameter and 4.5 mm in length) with (25% w/w) or without sirolimus were applied over the CAM surface in a well-defined place which was marked with a cellulose disk. After 48 h, the CAM surrounding the cellulose disk was removed from each egg and analyzed with a light microscope (Leica, model DM4000B, Germany) coupled to a Leica digital CCD camera model DFC 280 (Software Leica Application Suite V 3.3.0, Germany). The images were used for the quantification of the capillary area using the image processing program ImageJ (version 1.44g; National Institutes of Health; USA). As a negative control, the same procedure was performed and 10 μ l of phosphate-buffered-saline (PBS, pH 7.4) was applied over the CAM surface. As a positive control, 10 μ l of bevacizumab (Avastin[®], 500 μ M, Roche, Brazil) were applied over the CAM surface. The negative control group was fixed as 100% for the calculation of the capillary area changes.

2.8. Fibrovascular tissue growth induced by a subcutaneous cotton pellet

Firstly, mice were anesthetized with a mixture of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) by the i.p. route. A sterilized cotton pellet (10 mg) was inserted subcutaneously into the dorsum of each animal. In some animals, two implants containing sirolimus (25% w/w) or without the drug (PLGA 50:50) were aseptically inserted, one on each side of the cotton pellet.

The animals were divided into four groups of seven animals each. The treatments were: 1. per os (p.o.) administration of sterile saline

(10 ml/kg, every two days); 2. p.o. administration of dexamethasone (2 mg/kg, every two days); 3. insertion of the sirolimus-loaded subcutaneous implants and 4. insertion of the subcutaneous implants without sirolimus.

The weight gain of the animals throughout the experimental period was evaluated. The animals were monitored for any sign of infection at the surgical site or discomfort. Any animal presenting such signs was immediately removed from the study.

Seven days after insertion of the cotton pellets, the animals were euthanized and the cotton pellet with its surrounding fibrovascular tissue was removed and dried at 37 $^{\circ}$ C for 24 h. The mass of each cotton pellet was determined. The results are presented as the difference between the initial and final dry masses of each cotton pellet.

2.9. Statistical analysis

Data were presented as mean \pm standard error of the mean and analyzed by one-way analysis of variance followed by Newman-Keuls post-hoc test when the main effect was significant. Two-way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc test was used to analyze the animal weight differences. The unpaired *t*-test was used to compare capillary areas in the CAM study. $P < 0.05$ was considered significant. Statistical analysis was conducted using GraphPrism 5.0.

3. Results

3.1. In vivo release study

The mean amounts of sirolimus released from the implants into the subcutaneous tissue throughout the 42 days of the study are presented in Fig. 2. Sirolimus was slowly released from the implants. The amounts of sirolimus released at days 3 and 42 were 0.158 ± 0.013 mg (10.6%) and 0.575 ± 0.203 mg (40.20%), respectively. Macroscopic evaluation showed no evident signs of inflammation at the site where the implant was inserted. The healing process showed no ulceration or exudate.

3.2. Morphological changes of the implants

Before insertion into the subcutaneous tissue, the sirolimus-loaded implants exhibited homogenous surface with absence of pores and channels. At day 7 after the insertion, the shape and length of the implants started to change and pores and channels could already be visualized. From day 14 onwards, the implants were adhered to the skin and the pores and channels increased in number and size. Finally, at day 28, a surrounding fibrovascular tissue was clearly visualized (Fig. 3).

3.3. Histological analysis

At day 7, the morphological features of the site surrounding the sirolimus-loaded implant did not differ from those where an implant without the drug was inserted (Fig. 4). There was a slight inflammatory process with predominantly foamy macrophages, characterized by the presence of large and vacuolated cytoplasm around an eosinophilic material, suggesting residues of biodegradable material. This inflammatory process was surrounded by a thin capsule of fibrous tissue. No multinucleated giant cells were observed.

At day 42, a granulomatous inflammatory process surrounded the implant without drug (Fig. 4C and D). There were multinucleated giant cells with Langerhans (with nuclei arranged in the periphery) or foreign body (with disordered nuclei in the cytoplasm) appearances, as well as lymphocytes and macrophages, around the implant. This inflammatory process was surrounded by a thin capsule of fibrous tissue. The site around the sirolimus-loaded implant exhibited an inflammatory process with predominance of foamy macrophages characterized by

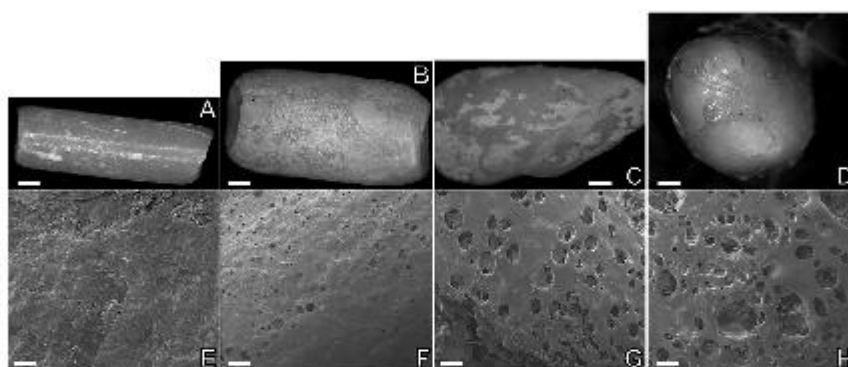


Fig. 3. (A–D) Scanning electron microscopy analysis of the sirolimus-loaded implants before (A) and after 7 (B), 14 (C) and 28 (D) days of the insertion into the subcutaneous tissue of mice; bar = 1 mm. (E–H) Scanning electron microscopy photographs of the sirolimus-loaded implants before (E) and after 7 (F), 14 (G) and 28 (H) days of the insertion into the subcutaneous tissue of mice; bar = 1 μ m.

voluminous and vacuolated cytoplasm and rare multinucleated giant cells (Fig. 4G and H). Many pyknotic lymphocytes or lymphocytes with the fragmented nucleus (karyorrhexis) were observed. In the center of the inflammatory process, there were remnants of biomaterials. This inflammatory process was also surrounded by a thin capsule of fibrous tissue.

The minor inflammatory response induced by the implant insertion was considered as an expected event due to the presence of a foreign body. However, no obvious damage occurred, as gross animal behavior and macroscopical signs of inflammation were not observed.

3.4. Chorioallantoic membrane assay

The capillary areas in the CAM after application of sirolimus-loaded implants, implants without drug, sirolimus solution, bevacizumab (positive control) and PBS (negative control) are shown in Fig. 5. There was no significant difference between the capillary areas in CAM incubated with implants without drug ($89.85 \pm 7.98\%$) and the negative control. On the other hand, sirolimus-loaded implants significantly reduced ($52.09 \pm 9.18\%$) the capillary area when compared with the negative control. Capillary area was also reduced by the application of bevacizumab ($500 \mu\text{M}$) or sirolimus solution ($500 \mu\text{M}$) ($44.44 \pm 5.41\%$ and $34.05 \pm 5.03\%$, respectively). Neovascularization, acute

inflammatory response and vascular lysis were not observed after application sirolimus-loaded implants or implants without drug.

3.5. Fibrovascular tissue growth induced by a subcutaneous cotton pellet

Seven days after subcutaneous insertion of the cotton pellet, an increased dry mass was observed, indicating the formation of the fibrovascular tissue. When implants without drug were inserted close to the cotton pellet, this response was not reduced. However, insertion of the two sirolimus-loaded implants reduced by 35.1% the formation of the fibrovascular tissue. Reduced (52.0%) formation of this tissue was also observed in animals treated with dexamethasone (2 mg/kg , p.o.), administered every two days during 7 days (Fig. 6A). Animals that received the subcutaneous implants, containing or not sirolimus, exhibited similar weight gain when compared to the control group (Fig. 6B).

4. Discussion

The present study shows that the sirolimus-loaded PLGA implants promoted a slow *in vivo* release of the drug and induced a long-lasting anti-inflammatory and antiangiogenic effect.

Based on the results of the *in vivo* release experiment, sirolimus was

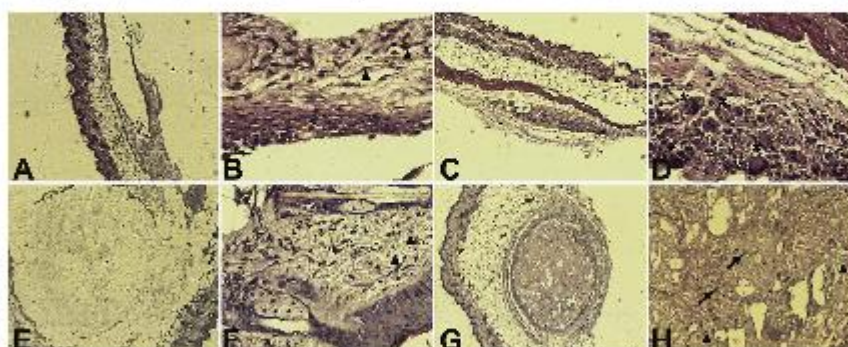


Fig. 4. Photomicroscopy of skin and subcutaneous tissue. (A and B) PLGA implant after 7 days, 50 \times and 400 \times , respectively; (C and D) PLGA implant after 42 days, 50 \times and 400 \times , respectively; (E and F) Sirolimus-loaded implant after 7 days, 50 \times and 400 \times , respectively; (G and H) Sirolimus-loaded implant after 42 days, 50 \times and 400 \times , respectively. \rightarrow : pyknotic lymphocytes; \blacktriangle : foamy macrophages; $*$: foreign body cells; $\#$: Langhans cells.

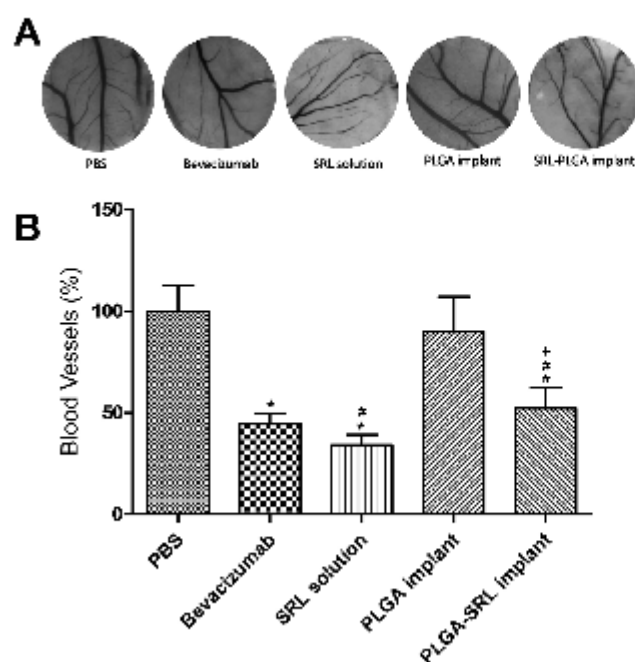


Fig. 5. (A) Representative images of capillary area observed in the CAM. (B) Capillary area in the CAM after application of sirolimus-loaded implants (PLGA-SRL implant), implants without sirolimus (PLGA implant) and sirolimus solution (500 μ M). PBS served as negative control and bevacizumab (500 μ M) served as positive control. The values are expressed according to the negative control, which was fixed as 100%. The values are shown as mean \pm standard deviation ($n = 12$). *Significantly different from the negative control group ($P < 0.05$; unpaired t -test); #Significantly different from the positive control group ($P < 0.05$; unpaired t -test); +Significantly different from the sirolimus solution group ($P < 0.05$; unpaired t -test).

continuously and slowly released from the implants. Approximately 40% of the initial amount of the drug was released after 42 days of its insertion, which can be attributed to the diffusion through the pores and channels formed in the matrix during polymer degradation [18]. The presence of channels and pores in the matrices increases water uptake by the implants contributing to their degradation and consequently drug diffusion from the inside to the surface of the structure [21].

Sirolimus significantly reduced blood vessels formation in the CAM model, an effect that is probably related to the inhibition of VEGF. Among the proangiogenic factors involved in the formation of new capillaries from preexisting vessels, VEGF plays a decisive role [7]. The angiogenesis process may be associated with chronic inflammatory disorders, such as, rheumatoid arthritis [22,23], psoriasis [24–26], skin lesions [27] and inflammatory bowel disease [28,29]. Chronic inflammation is characterized by upregulated release of inflammatory and angiogenic mediators that lead to an increase in the inflammatory response. High levels of adhesion molecules and chemokines are expressed by endothelial cells thereby facilitating continued recruitment of leukocytes. Furthermore, there is an increase in vascular

permeability and blood vessel diameter, causing an increased blood flow that reaches the affected site. Considering that sirolimus inhibits signaling mediated by VEGF and mTOR, it can be suggested that these two mechanisms may synergistically contribute to the anti-inflammatory and antiangiogenic activities, thus pointing the usefulness of this drug in the treatment of patients with chronic inflammatory disorders. The sirolimus-loaded implants reduced the blood vessels formation at a lower extent than sirolimus in solution. This fact is likely due to the lower concentration of sirolimus in the CAM, as this drug is slowly released from the implants. The evaluation in the CAM model allows to suggest that the PLGA implant is biocompatible as no significant modifications of the vasculature were observed.

Based on the histological analysis of the tissues close to the implants, it can be suggested that the amount of sirolimus released (12.86%) until 7 days of the insertion was very low to change the local inflammatory response. However, 42 days after the insertion, the inflammatory response surrounding the sirolimus-loaded implant differed from that surrounding the tissue with the implant without the drug. This suggests that the amount of sirolimus released at this time was sufficient to change the inflammatory process, reducing to the

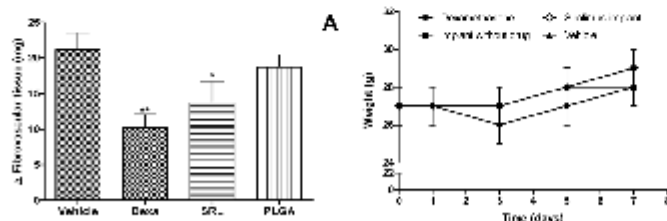


Fig. 6. Effect induced by sirolimus-loaded implants or implants without sirolimus on the formation of fibrovascular tissue induced by a subcutaneous cotton pellet (A) and weight gain (B). The control animals received vehicle (sterile saline, 10 mL/kg, p.o.) or dexamethasone (Dexa, 2 mg/kg, every two days, p.o., 7 days). Each bar represents the mean \pm standard error mean of seven animals. ** Significantly different from the vehicle or PLGA-treated groups, $p < 0.0001$.

formation of multinucleated giant cells and inducing degeneration of lymphocytes.

We also investigated the effects induced by sirolimus released from the PLGA implants on the formation of fibrovascular tissue induced by a subcutaneous cotton pellet. The formation of the fibrovascular tissue is the result of an angiogenic and proliferative response that reproduces many features of the healing occurring days after mechanical and natural injuries. Many mediators seem to be involved in the formation of the fibrovascular tissue, including cytokines [30], chemokines [31], and eicosanoids [32]. In the present study, the sirolimus-loaded implants reduced the amount of the proliferating fibrovascular tissue surrounding the cotton pellet. This effect may be due to a reduced production of inflammatory mediators. Some studies demonstrated that NF- κ B, through the regulation of genes encoding inflammatory cytokines and enzymes, such as inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 [33,34], is a key component in the cytokine synthesis and inflammatory response. It has been shown that sirolimus, by inhibiting the NF- κ B signaling pathway, reduces the production of chemokines by THP-1 cells and human primary monocytes stimulated by endotoxin [35] and the production of inflammatory cytokines induced by isoproterenol in cardiomyocytes [36]. In addition, Laragione and Gulko (2010), using fibroblast-like synoviocytes (FLS) isolated from synovial tissues from arthritic rat and from patients, demonstrated that sirolimus decreased FLS invasion in the tissues via the suppression of the mTOR signaling pathway [37].

5. Conclusion

Sirolimus was slowly released from the PLGA biodegradable implants and reduced angiogenesis and chronic inflammatory response in the models evaluated in the present study. Preliminary evaluation indicated that the implants were safe to the experimental animals. Finally, the use of biodegradable sirolimus-loaded implants may be a promising alternative for the treatment of patients with chronic inflammation.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to thank FAPEMIG (Brazil), CNPq/MCT (Brazil) and CAPES/MBC (Brazil) for financial support.

References

- [1] S.N. Sehgal, Rapamycin (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression, *Clin. Biochem.* 31 (5) (1998) 335–340, [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-0120\(98\)00045-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-0120(98)00045-9).
- [2] E.K. Geisler, H.J. Schlitt, G. Thomas, mTOR, cancer and transplantation, *Am. J. Transplant.* 8 (11) (2008) 2212–2218, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02990.x>.
- [3] C. Weina, A. Kudski, S.N. Sehgal, Rapamycin (AY-22889), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle, *J. Antibiot.* 26 (10) (1975) 721–726, <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.26.721>.
- [4] G. Zaza, P. Yoni, P. Ria, S. Gnanu, L. Brachiero, A. Lupu, Systemic and nonrenal adverse effects occurring in renal transplant patients treated with mTOR inhibitors, *Clin. Dev. Immunol.* 2013 (2013), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/402390>.
- [5] V. Andra, C. Castro, J.M. Campistol, Potential role of proliferation signal inhibitors on atherosclerosis in renal transplant patients, *Nephrol. Dial. Transplant.* 21 (83) (2006) 14–17, <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfl296>.
- [6] C. Orban, A. Onal, Y. Uyankilg, S. Ulker, Antihyperglycemic and antidiabetic effect of sirolimus in rat model of adjuvant arthritis, *Braz. J. Pharmacol.* 705 (1–3) (2013) 35–41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajph.2013.02.013>.
- [7] M. Gola, P. von Breitenbuch, M. Steinbauer, G. Kothl, S. Hegel, M. Homung, et al., Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor, *Nat. Med.* 8 (2) (2002) 128–135, <http://dx.doi.org/10.1038/nm0202-128>.
- [8] G.T. González-Mateo, A.R. Aguirre, J. Loureiro, H. Abensour, Rapamycin protects from type-1 peritoneal membrane failure inhibiting the angiogenesis, lymphangiogenesis, and endo-MT, *BioMed Res. Int.* 2015 (2015), <http://dx.doi.org/10.1155/2015/989560>.
- [9] J. Jozwiak, A. Kolesnik, Painful crural ulcers and proteinuria as complications after several years of therapy with mTOR inhibition in the renal allograft recipient: a case report, *Transplant. Proc.* 45 (9) (2013) 3418–3420, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.06.022>.
- [10] A. Puhmann, P. Lopez, J. Serean, J. Pedro, D.G. Espinoza, M.J. Pereira, et al., Molecular mechanisms underlying the effects of cyclosporin A and sirolimus on glucose and lipid metabolism in liver, skeletal muscle and adipose tissue in an *in vivo* rat model, *Biochem. Pharmacol.* 88 (2) (2014) 216–228, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.020>.
- [11] T. Matsuzaki, T. Matsushita, Y. Tabata, T. Saito, T. Matsumoto, K. Nagai, et al., Intra-articular administration of gelatin hydrogels incorporating rapamycin/microspheres reduces the development of experimental osteoarthritis in a murine model, *Biomaterials* 35 (2014) 9904–9911, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.041>.
- [12] T. Ding, C. Zhang, J. Yin, T. Zhang, Y. Lu, J. Ren, et al., Slow-releasing rapamycin-coated bionic peripheral nerve scaffold, *Life Sci.* 122 (2015) 92–99, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.005>.
- [13] G. Li, L. Cao, Z. Zhou, Z. Chen, Y. Huang, Y. Zhao, Rapamycin loaded magnetic Fe₃O₄/chitosan-methylchitosan nanoparticles as tumor-targeted drug delivery system synthesis and *in vitro* characterization, *Colloids Surf. Biointerfaces* 128 (2015) 379–388, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.035>.
- [14] J. Zandstra, M.M. van Besou, J. Zuidema, A.H. Reijnen, M. Staal, L.F. Duque, et al., Microsphere-based rapamycin delivery, systemic versus local administration in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury, *Pharm. Res.* 32 (10) (2015) 2328–2347, <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-015-1700-8>.
- [15] F. Wang, K. Yang, Z. Wang, Y. Ma, J.S. Guzik, N. Hida, et al., Combined image guided monitoring the pharmacokinetics of rapamycin loaded human serum albumin nanoparticles with a split luciferase reporter, *Nanomedicine* 8 (7) (2013) 3991–4000, <http://dx.doi.org/10.1039/c3nm07308a>.
- [16] E.M. Martín del Valle, M.A. Galas, R.G. Carbonell, Drug delivery technologies: the way forward in the new decade, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (5) (2009) 2475–2486, <http://dx.doi.org/10.1021/ie800884m>.
- [17] A. Dash, G. Oudworth, Therapeutic applications of implantable drug delivery systems, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 40 (1) (1998) 1–12, [http://dx.doi.org/10.1016/S1056-8719\(98\)00027-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1056-8719(98)00027-6).
- [18] S.L. Fialho, A. Silva-Cunha, Manufacturing techniques of biodegradable implants intended for intravitreal application, *Drug Deliv.* 12 (2) (2005) 109–116, <http://dx.doi.org/10.1080/1071754050021432>.
- [19] M. Zimmermann, Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain* 16 (2) (1983) 109–110, [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90206-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(83)90206-4).
- [20] P. Nowak-Sliwinska, J.P. Bellini, G. Wagniers, H. Van Den Bergh, Processing of fluorescent angiograms for the quantification of vascular effects induced by antiangiogenic agents in the CAM model, *Microw. Res.* 79 (1) (2010) 21–28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2009.10.004>.
- [21] S.L. Fialho, F. Behar-Cohen, A. Silva-Cunha, Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone) intravitreal implants: a pilot study, *Braz. J. Pharm. Biopharm.* 68 (3) (2008) 637–646, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajph.2007.08.004>.
- [22] M. Nagahama, H. Tanaka, H. Takahashi, A. Tachibana, K. Tanaka, T. Ishiwata, et al., Study of the mechanism involved in angiogenesis and synovial cell proliferation in human synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis using SCID mice, *Lab. Invest.* 82 (8) (2002) 981–988, <http://dx.doi.org/10.1097/01.LAB.000002220.4451.1.4>.
- [23] Z. Szoboszty, T. Beenyel, G. Pungl, A.E. Koth, New insights in synovial angiogenesis, *Joint Bone Spine* 77 (1) (2010) 13–19, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.05.011>.
- [24] I.M. Braverman, J. Sibley, Role of the microcirculation in the treatment and pathogenesis of psoriasis, *J. Invest. Dermatol.* 78 (1) (1982) 12–17, <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12497850>.
- [25] R. Heidemreich, M. Röcken, K. Ghoreschi, Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis, *Int. J. Exp. Pathol.* 90 (3) (2009) 232–248, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00669.x>.
- [26] D. Vybohra, Y. Mellova, K. Adamcova, M. Adamkova, G. Honkova, Quantitative comparison of angiogenesis and lymphangiogenesis in cutaneous Echin planus and psoriatic immunohistochemical assessment, *Acta Histochem.* 117 (1) (2015) 20–28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2014.10.008>.
- [27] D.A. Greenberg, C. Bostez, A. Gutzkau, F. Senowka, A. Flecher, B.M. Firm, et al., Mast cells and vasculature in atopic dermatitis—potential stimulus of neoangiogenesis, *Allergy* 60 (1) (2005) 90–97, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00628.x>.
- [28] S. Danese, M. Seta, C. de la Motte, C. Gaszard, G. Wot, M.H. Phillips, et al., Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis, *Gastroenterology* 130 (7) (2006) 2060–2073, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.03.054>.
- [29] Y. Zhou, C. Tu, Y. Zhao, H. Liu, S. Zhang, Placental growth factor enhances angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells via PI3K/Akt pathway: potential implications of inflammation bowel disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470 (4) (2016) 967–974, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.073>.
- [30] A.R. Moore, K.J. Greenleed, C.A. Alam, D.A. Willoughby, Effects of dexamethasone on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse, *Osteoarthritis Cartilage* 6 (1) (1998) 19–23, <http://dx.doi.org/10.1053/joca.1997.0088>.

- [31] N.W. Inkara, S.W. Chensue, R.E. Smith, R.M. Seider, K. Wainington, C. Willis, Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory geminoma fibroblasts, *Am. J. Pathol.* 144 (4) (1994) 711–718. DOI: [PMCID1897251](https://doi.org/10.1016/S0021-9925(94)00199-2).
- [32] D. Kawai, K. Yamashita, Y. Takagishi, M. Mihara-Nakanishi, Y. Nakatani, S. Ohmori, et al., Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin G synthase-1, *J. Biol. Chem.* 279 (33) (2004) 684–695, <https://doi.org/10.1074/jbc.M400199200>.
- [33] S. Choib, M. Karin, Missing pieces in the NF- κ B puzzle, *Cell* 109 (2) (2002) 881–896, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00703-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00703-1).
- [34] T. Lawrence, The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation, *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 1 (5) (2009), <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>.
- [35] H.Y. Lin, K.T. Cheng, C.C. Hung, C.H. Kuo, S.J. Hwang, H.C. Chen, Effects of the mTOR inhibitor rapamycin on monocyte-secreted chemokines, *BMC Immunol.* 15 (2014) 37, <https://doi.org/10.1186/s12865-014-0037-0>.
- [36] X. Chen, S. Zeng, J. Zou, Y. Chen, Z. Yue, Y. Guo, et al., Rapamycin attenuated cardiac hypertrophy induced by isoprenalol and maintained energy homeostasis via inhibiting NF- κ B activation, *Mediat. Inflamm.* 2014 (2014), <https://doi.org/10.1155/2014/868753>.
- [37] T. Laragione, P.S. Galle, mTOR regulates the invasive properties of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis, *Mol. Med.* 16 (9–10) (2010) 352–358, <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00049>.