

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA
ENGENHARIA

GILZA CARLA RIBEIRO

Estudo da Hemocompatibilidade de Conjugados dos
Dendrímeros de Poliglicerol com Fármacos para
Tratamento da Artrite Reumatoide

Itajubá/MG
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA
ENGENHARIA

GILZA CARLA RIBEIRO

Estudo da Hemocompatibilidade de Conjugados dos
Dendrímeros de Poliglicerol com Fármacos para
Tratamento da Artrite Reumatoide

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação
em Materiais para Engenharia como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências em Engenharia de Materiais.**

Área de Concentração: Não-Metals

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Sachs

**Co-orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de
Queiroz**

Itajubá/MG

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA
ENGENHARIA

Gilza Carla Ribeiro

Estudo da Hemocompatibilidade de Conjugados dos
Dendrímeros de Poliglicerol com Fármacos para
Tratamento da Artrite Reumatoide

Dissertação aprovada por banca examinadora em 24 de Junho de 2016, conferindo a Gilza Carla Ribeiro o título de **Mestre em Ciências em Engenharia de Materiais**.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Sachs (UNIFEI)

Prof. Dr. Maurício Frota Saraiva (UNIFEI)

Prof. Dr. Nilo Cesar do Vale Baracho (FMIIt)

Itajubá/MG

2016

*À minha família por sua
fortaleza e coragem, e
por ser sempre meu
alicerce, dedico...*

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela conquista de mais uma etapa e por todas as realizações que Eles me permitem.

À Professora Doutora Daniela Sachs, não só pela orientação e grande ajuda técnica para conclusão deste trabalho, mas por todo carinho, paciência e compreensão dedicados durante esse tempo. “Muito obrigada por sempre me incentivar a seguir em frente...”.

Ao Professor Doutor Álvaro Antônio Alencar de Queiroz pela atenção, orientação e por compartilhar seus conhecimentos, que me proporcionaram crescimento científico e pessoal.

À Amanda por todo apoio, amizade, ajuda e incentivo.

Amigo a gente não faz... Reconhece-se... (Vinícius de Moraes)

Aos amigos do Labclin pela grande ajuda técnica, pelas conversas divertidas e encorajadoras, por compartilharem suas experiências e acreditarem em mim, me incentivando sempre.

À Secretaria de Saúde de Piranguinho, em especial minhas grandes amigas Ana Maria, Eliana, Marilei e Cecília por torcerem por mim e sempre me apoiarem.

Ao povo de Piranguinho, que diariamente me ensina a ser uma pessoa melhor.

Agradeço aos meus pais Maria e Alcides pelo bom exemplo, apoio, compreensão, pela ajuda e incentivo incondicional que sempre me deram.

Ao meu esposo Joeber pelo apoio e por compreender meus momentos de ausência.

Ao meu filho Vinícius, razão do meu viver.

E a todos que de alguma forma, contribuíram para tornar este trabalho uma realidade.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

Resumo

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica autoimune que leva à deformidade e destruição das articulações por erosão óssea e da cartilagem. De acordo com o último Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da AR, em 2012, as terapias medicamentosas incluem o uso de anti-inflamatórios não hormonais (AINHs), corticoides, medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD) sintéticos e biológicos. O tratamento medicamentoso prolongado da AR com AINH, corticoides e MMCD sintéticos, como o meloxicam, prednisona e metotrexato, causam diferentes e variados efeitos adversos aos pacientes com AR. A nanomedicina, um ramo da nanotecnologia, se refere à intervenção médica em escala nanométrica que é altamente específica para o tratamento de doenças ou reparo de tecidos danificados. A síntese de nanopartículas dendríticas de poliglicerol (PGLD), embora recente, tem várias aplicações na medicina, em especial para a produção de sistemas carreadores de fármacos. De fato, o encapsulamento ou associação aos fármacos com PGLD resulta na diminuição da toxicidade, das interações medicamentosas e maior tempo de permanência do fármaco na circulação. Apesar de décadas de pesquisas farmacêuticas e clínicas, ainda há muitas necessidades não contempladas no tratamento da AR. Dessa forma, a utilização de dendrímeros do tipo gliceróis densamente ramificados com propriedades biocompatíveis, pode ser uma alternativa promissora para a obtenção de carreadores dos fármacos (meloxicam, prednisona e metotrexato) para o tratamento sistêmico ou intra-articular da AR. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a hemocompatibilidade de diferentes nanofármacos com estrutura dendrítica para o tratamento da artrite reumatoide. Para tanto, foram utilizadas técnicas físico-químicas para a caracterização dos conjugados PGLD-prednisona, PGLD-meloxicam e PGLD-metotrexato. Para avaliar a Hemocompatibilidade foram utilizados os testes de tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), teste de adesão plaquetária e o ensaio de hemólise dos fármacos puros, do PGLD isolado e dos conjugados PGLD-prednisona, PGLD-meloxicam e PGLD-metotrexato. Em suma, os dados obtidos utilizando as técnicas físico-químicas nos permitem sugerir que ocorreu a conjugação dos fármacos estudados com os dendrímeros de poliglicerol de segunda geração (G2) e quarta geração (G4). Os testes de hemocompatibilidade mostraram que os fármacos puros, dendrímeros puros e os fármacos conjugados aos dendrímeros são hemocompatíveis indicando que estes nanofármacos são promissores para o tratamento da AR.

Palavras-chave: Hemocompatibilidade, artrite reumatoide, meloxicam, prednisona, metotrexato e dendrímeros de poliglicerol.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease that leads to deformity and destruction of joints in bone and cartilage erosion. According to the latest Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for the treatment of RA in 2012, drug therapies include the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), corticosteroids, modifying drugs in the disease course (MMCD) synthetic and biological. Prolonged drug treatment of RA with NSAIDs, corticosteroids and synthetic MMCD as meloxicam, prednisone and methotrexate, cause different and varied adverse effects to patients with RA. Nanomedicine, a nanotechnology industry, medical intervention refers to the nanoscale is highly specific for the treatment of diseases or repair damaged tissues. The synthesis of dendritic nanoparticles polyglycerol (PGLD), although recently it has several applications in medicine, in particular for the production of drug carrier systems. In fact, encapsulation or association with drugs with PGLD results in decreased toxicity, drug interactions and longer stay of the drug in circulation. Despite decades of pharmaceutical and clinical research, there are still many needs not included in the treatment of RA. Thus, the use of dendrimers of glycerols with densely branched type biocompatible properties, may be a promising alternative to obtain carriers of drugs (meloxicam, methotrexate and prednisone) for systemic or intraarticular treatment of RA. Therefore, this study aims to evaluate the hemocompatibility of different nanofármacos with dendritic structure for the treatment of rheumatoid arthritis. Therefore, we used physico-chemical techniques for the characterization of conjugated PGLD-prednisone, PGLD-meloxicam and PGLD methotrexate. To evaluate the hemocompatibility were used for prothrombin time tests (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), platelet adhesion test and the hemolysis assay of pure drugs isolated and conjugates PGLD-PGLD prednisone, PGLD- PGLD meloxicam and methotrexate. In short, the data obtained using the physico-chemical techniques allow us to suggest that the combination of drugs was studied dendrimers polyglycerol second generation (G2) and fourth generation (G4). hemocompatibility tests showed that the pure drug and pure dendrimers and dendrimers are conjugated to drugs hemocompatíveis indicating that these are promising nanofarmacos for the treatment of RA.

Keywords: hemocompatibility, rheumatoid arthritis, meloxicam, prednisone, methotrexate and polyglycerol dendrimers.

Lista de abreviaturas

ABAT: Abatacepte

ACPA: Anticorpos antiproteínas citrulinadas

ACR: American College of Rheumatology (ACR)

AINHs: Anti-inflamatórios não hormonais

Anti-CCP: Anticorpos antipeptídeos citrulinados cíclicos

AR: Artrite reumatoide

COX-1: ciclooxigenase 1

COX-2: ciclooxigenase 2

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

Eular: European League Against

FDA: Food and Drug administration

FR/ RF: fator reumatoide

FT: Fator tecidual

FTIR: Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier

FX: Fator X

ICAM-1: Molécula de adesão intracelular-1

Ig: Imunoglobulinas

INR: Razão normalizada internacional

IVAM-1: Molécula de adesão celular-vascular-1

MMCD: Medicamentos modificadores do curso da doença

MTX: metotrexato

PADI: Peptidilarginina deiminase

PAMANs: Poliamidoaminas

PGLD: Dendrímero de poliglicerol

RTX: rituximabe

TP: Tempo de protrombina

TGA: Análise termogravimétrica

TNF: Fator de necrose tumoral

TOCI: tocilizumabe

TTPA: Tempo de tromboplastina parcial ativada

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 Articulação normal (A) e articulação com artrite reumatoide (B).....	16
Figura 1.2 Deaminação da arginina pela enzima peptidilarginina deiminase.	17
Figura 1.3 Prevalência da artrite reumatoide na população adulta de várias regiões do mundo.	18
Figura 1.4 Patogênese da artrite reumatoide. Os anticorpos anti fator reumatóide (FR) e antiproteínas citrulinadas (ACPAs) são dois auto anticorpos mais importantes na patogênese da AR. Ativação de células T resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- β , IL-1 β e IL-6 por macrófagos. Estas citocinas pró-inflamatórias tem a capacidade de ativar o ligante do receptor ativador do fator nuclear β (RANKL), que é o principal regulador da osteoclastogênese. A produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) por fibroblastos sinoviais também estimula a angiogênese que por sua vez mantém o processo inflamatório através do recrutamento de leucócitos. Todos estes componentes tem um papel importante no progresso inflamatório na degradação da cartilagem e no processo de destruição de óssea.....	22
Figura 1.5 Fluxograma para a primeira linha do tratamento medicamentoso da artrite reumatoide: AINH: anti-inflamatório não hormonal; MMCD: Medicamentos modificadores do curso da doença; MTX: metotrexato.	24
Figura 1.6 Fluxograma para o tratamento medicamentoso da artrite reumatoide com MMCD biológicos. ABAT: abatacepte; MMCD: medicamento modificador do curso da doença; MTX: metotrexato; RTX: rituximabe; TOCI:tocilizumabe.	29
Figura 1.7 Nanopartículas (NP) para tratamento da artrite reumatoide. Diferentes tipos de nanopartículas tem sido utilizados para o tratamento RA. Fármacos e fragmentos de RNA são transportados por nanopartículas e impedem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e como consequência ocorre a inibição do processo inflamatório e da degeneração da cartilagem articular.....	32
Figura 1.8 Dendrímeros disponíveis comercialmente. (A) Dendrímero de Polipropileno imina (G5) e (B) dendrímero de poliamido amina (G3). Cada geração é marcada com um círculo.....	33
Figura 1.9 Síntese dendrímero (esquemáticamente representado). (A) Estratégia divergente e (B) estratégia convergente.	34

Figura 1.10 Propriedades dos grupos internos e externos do dendrímero utilizado como sistema de liberação/transporte de fármacos.....	35
Figura 1.11. Esquema da cascata da coagulação com a divisão do sistema de coagulação em duas vias. CAPM: cininogênio de alto peso molecular; PK: pré-caliceína.....	39

Capítulo 3

Figura 3.1 Espectro do FTIR dos dendrímeros G2 e G4.	49
Figura 3.2 Estrutura química da prednisona	50
Figura 3.3 Espectro do FTIR de Prednisona	51
Figura 3.4 Estrutura química do meloxicam	51
Figura 3.5 Espectro do FTIR do Meloxicam	52
Figura 3.6 Estrutura química do metotrexato	52
Figura 3.7 Espectro do FTIR de Metotrexato	53
Figura 3.8 Espectro do FTIR de prednisona associado ao dendrímero G2	54
Figura 3.9 Espectro do FTIR da meloxicam associado ao dendrímero G2	55
Figura 3.10 Espectro do FTIR do metotrexato associado ao dendrímero G2	56
Figura 3.11 Espectro de FTIR de prednisona associado ao dendrímero G2	57
Figura 3.12 Espectro de FTIR de meloxicam associado ao dendrímero G4	58
Figura 3.13 Espectro de FTIR de metotrexato associado ao dendrímero G4	59
Figura 3.14 Curvas termogravimétricas de G2 e G4 puros	60
Figura 3.15 Curvas termogravimétricas de G2 puro, prednisona pura e prednisona associada ao G2.....	61
Figura 3.16 Curvas termogravimétricas de G2 puro, meloxicam puro e meloxicam associado ao G2	62
Figura 3.17 Curvas termogravimétricas de G2 puro, metotrexato puro e do metotrexato associado ao G2	63
Figura 3.18 Curvas termogravimétricas de G4 puro, prednisona pura e a prednisona associada ao G4.	64
Figura 3.19 Curvas termogravimétricas de G4 puro, meloxicam puro e o meloxicam associado ao G4.	65
Figura 3.20 Curvas termogravimétricas de G4 puro, metotrexato e G4 associado ao metotrexato	66
Figura 3.21 Curvas DSC normalizadas de segundo aquecimento de G2 e G4.....	67
Figura 3.22 Curvas DSC normalizadas de segundo aquecimento dos fármacos puros ..	68

Figura 3.23 Curvas DSC normalizadas de segundo aquecimento dos fármacos associados ao G2	69
Figura 3.24 Curvas DSC normalizadas de segundo aquecimento dos fármacos associados ao G4	70
Figura 3.25 Gráfico do TP para os fármacos puros, G2 puro e ambos associados (A) e gráfico do TP para fármacos puros, G4 puro e associações(B).	73
Figura 3.26 Gráfico do TTPA para os fármacos puros, G2 puro e ambos associados (A) e gráfico do TP para fármacos puros, G4 puro e associações(B).	75
Figura 3.27 Gráfico das plaquetas/mm ³ de sangue dos fármacos puros, G2 puro e associações (A) e gráfico dos fármacos puros, G4 puro e suas associações (B).	77

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1 Frequência de auto anticorpos associados à artrite reumatoide	20
--	----

Capítulo 3

Tabela 3.1 Valores de INR.	76
Tabela 3.2 Valores de porcentagem de hemólise após exposição aos compostos estudados	78

Lista de Quadros

Capítulo 2

Quadro 2.1 Grupos participantes dos ensaios de caracterização química e biológica	42
Quadro 2.2 Relação entre PGLD e fármacos	43

Sumário

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
1.1	Artrite reumatoide	15
1.2	Fisiopatologia da artrite reumatoide	19
1.2.1	Fatores ambientais	19
1.2.2	Resposta autoimune	19
1.2.3	Processo inflamatório na artrite reumatoide	21
1.3	Tratamento da artrite reumatoide	23
1.3.1	Medidas educativas	24
1.3.2	Anti-inflamatórios não hormonais (AINHs)	25
1.3.3	Corticoides	25
1.3.4	Medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD).	27
1.3.4.1	MMCD sintéticas: metotrexato (MTX).....	27
1.3.4.2	MMCD biológicas	28
1.4	Sistemas de transporte e liberação de fármacos para o tratamento da AR.	30
1.4.1	Nanopartículas	30
1.5	Dendrímeros como sistemas transportadores de fármacos	32
1.6	Hemocompatibilidade	37
1.6.1	Efeito sobre a coagulação	37
1.6.2	Ativação plaquetária	37
1.6.3	Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)	38
1.6.4	Tempo de protrombina (TP)	38
1.6.5	Hemólise	39
1.7	Objetivo:	41
1.7.1	Objetivos específicos:	41
2	MÉTODOS E DESCRIÇÃO DA PESQUISA	43
2.1	Materiais	43
2.2	Imobilizações da prednisona, meloxicam ou metotrexato nos dendrímeros	44
2.3	Caracterização físico-química.....	45
2.3.1	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	45

2.3.2	Análise termogravimétrica (TGA)	45
2.3.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	46
2.4	Testes de hemocompatibilidade	46
2.4.1	Tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada(TTPA).....	47
2.4.2	Tempo de protrombina (TP).....	47
2.4.3	Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).....	48
2.4.4	Adesão plaquetária	48
2.4.5	Ensaio de hemólise.....	49
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1	Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	51
3.2	Análise termogravimétrica (TGA).....	61
3.3	Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	68
3.4	Hemocompatibilidade	73
3.4.1	Tempo de protrombina, INR e Tempo de tromboplastina parcial ativada	73
3.4.2	Adesão plaquetária	78
3.4.3	Ensaio de hemólise.....	80
4	CONCLUSÃO.....	83
4.1	Perspectivas futuras	83
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	84

Capítulo 1
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória sistêmica, crônica e progressiva que afeta as articulações do corpo revestidas pela membrana sinovial e que pode levar a destruição de cartilagens e ossos (MOTA et al., 2012, STRAND et al., 2007). Esta doença está relacionada ao desenvolvimento de deformidades e incapacitação, gerando diminuição da qualidade de vida (VAZ et al., 2013). A inflamação causa dor nas articulações, aumento do volume e rigidez, além de problemas sistêmicos como cansaço e perda de peso. De fato, é a inflamação da membrana sinovial, a sinovite, que resulta na destruição articular e que, se não tratada, pode levar a uma lesão articular grave com a perda da capacidade funcional (OLIVEIRA et al., 2015). A articulação normal compreende dois tipos de células, macrófagos e sinoviócitos semelhantes aos fibroblastos. Na AR a membrana sinovial é invadida por células T e B e células inflamatórias e como consequência os sinoviócitos proliferam. Com a progressão da doença o tecido sinovial se torna hiperplásico invadindo e destruindo a cartilagem articular e osso subjacente (STRAND et al., 2007, **Figura 1.1**).

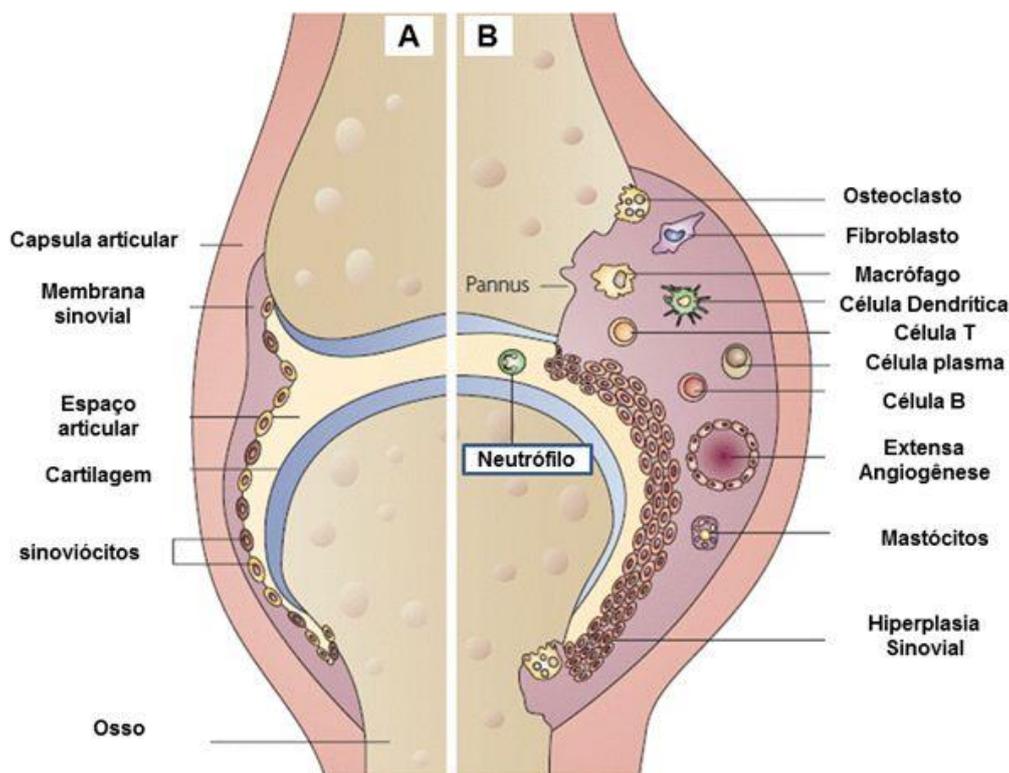


Figura 1.1 Articulação normal (A) e articulação com artrite reumatoide (B) (fonte: adaptado de STRAND et al., 2007).

Historicamente as doenças reumáticas são conhecidas desde a época de Hipócrates, entretanto a AR foi primeiramente nomeada no século XVII por Garrod e sua descrição clínica somente aconteceu em 1957, publicada por Charles Short. A AR é considerada uma doença autoimune devido à identificação do fator reumatoide no soro dos pacientes com AR e a posterior caracterização desse fator como anticorpo. Atualmente o diagnóstico da AR é baseado em critérios clínicos e exames laboratoriais (ARNETT et al., 1988). Os anticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPA) mostram alta especificidade para a AR. A enzima peptidilarginina deiminase (PADI) converte arginina a citrulina. A PADI foi descrita pela primeira vez em 1977 (ROGERS et al., 1977) e catalisa a conversão de resíduos de arginina em resíduos de citrulina nas proteínas (**Figura 1.2**).

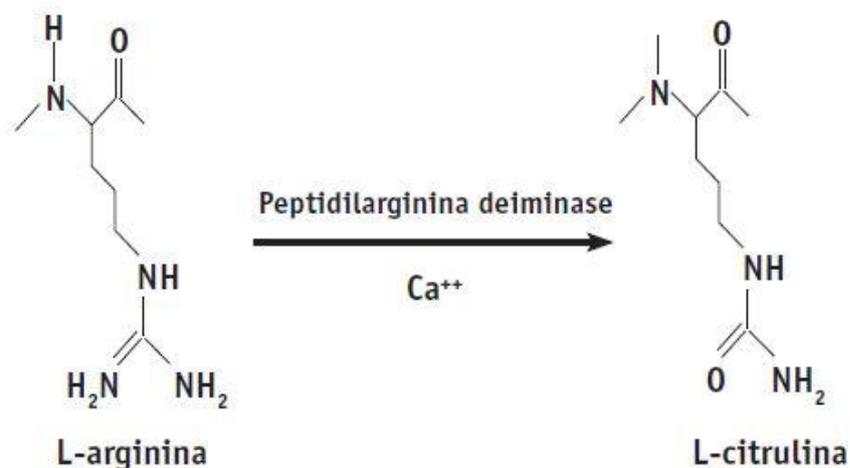


Figura 1.2 Deaminação da arginina pela enzima peptidilarginina deiminase (fonte: ALARCON & ANDRADE, 2007).

O teste de ACPA tornou-se um componente substancial dos atuais critérios de classificação para a AR do American College of Rheumatology (ACR)-European League Against Rheumatism (Eular) (ALETAKHA et al., 2010). Quando a AR se apresenta em sua forma bem definida, o reconhecimento é simples. O diagnóstico na fase precoce da doença, entretanto, é difícil, já que alterações sorológicas e radiológicas características muitas vezes não estão presentes. Os exames utilizados atualmente para diagnóstico da AR são radiologia convencional, cintilografia óssea, tomografia computadorizada, ressonância magnética e densitometria óssea (MOTA et al., 2012). Embora a doença possa ocorrer em qualquer idade, a AR afeta mais frequentemente as mulheres do que os homens e é diagnosticada principalmente entre os 40 e 60 anos, embora ainda não seja claro o mecanismo pelo qual o gênero influencie na susceptibilidade a AR (CASTRO-SANTOS & DÍAZ-PENÁ, 2016).

Dados epidemiológicos sobre a AR mostram variações na incidência e prevalência da doença entre as populações. A maior parte dos estudos foi feita em países desenvolvidos do norte da Europa e da América do Norte e estimou prevalências entre 0,5 e 1,1% (TOBON et al., 2010). Outros estudos realizados em países do sul da Europa relataram uma prevalência menor, em torno de 0,3 a 0,7% (CARMONA et al., 2002, GUILLEMIN et al., 2005, ANDRIANAKOS et al., 2006). Estima-se que a prevalência da AR no Brasil seja de 0,46% da população, representando aproximadamente um milhão de pessoas acometidas pela doença (COSTA, 2014).

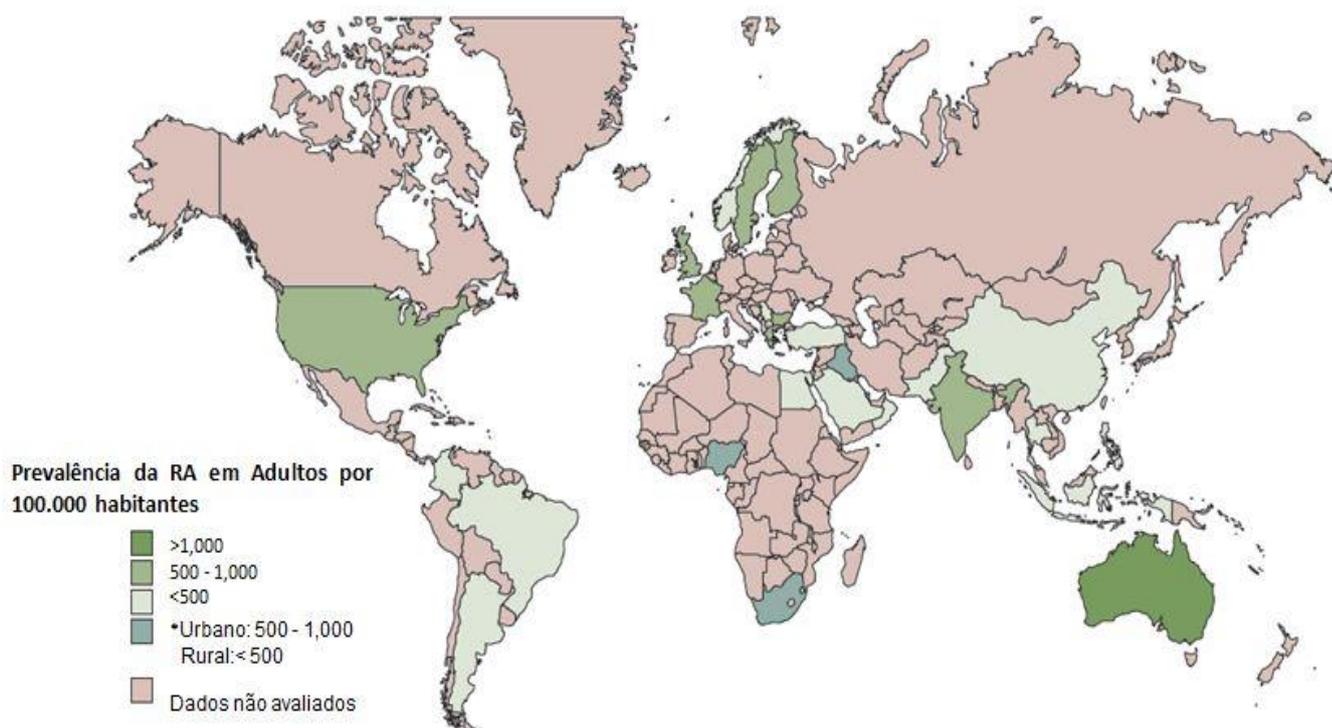


Figura 1.3 Prevalência da artrite reumatoide na população adulta de várias regiões do mundo (fonte: SHAPIRA et al., 2010).

A prevalência de AR na população adulta de várias regiões do mundo pode ser verificada na **figura 1.3** (adaptada de SHAPIRA et al., 2010). Na Austrália e Jamaica a prevalência de AR é alta e na África, esta doença é rara. Dentro de várias regiões do mundo, o risco de AR difere entre grupos étnicos distintos que residem no mesmo país, o que pode indicar diferenças na predisposição genética para esta doença. Por exemplo, em comparação com a etnia branca dos Estados Unidos da América tribos americanas nativas demonstram alto risco para o desenvolvimento da AR. Por outro lado, aborígenes australianos são muito mais resistentes à doença do que a população australiana de etnia branca (SYMMONS et al., 2000; MINAUR et al., 2004; SILMAN, 1993). Estas diferenças podem refletir a variabilidade étnica na prevalência de genes de susceptibilidade a doença.

1.2 Fisiopatologia da artrite reumatoide

1.2.1 Fatores ambientais

O desenvolvimento de AR está associado a fatores ambientais que incluem o tabagismo (KLARESKOG et al., 2008; MILLAR et al., 2013), baixos níveis socioeconômicos e baixa escolaridade (MILLAR et al., 2013; CALLAHAN & PINCUS, 1997). A AR também é associada à doença periodontal, embora a causalidade e natureza dessa relação ainda não esteja bem definida (SCHER et al., 2016). Uma hipótese proposta é que *Porphyromonas gingivalis*, bactéria frequentemente encontrada na periodontite, poderia induzir a citrulinização exacerbada. Como consequência causaria brechas na tolerância para citrulinados via expressão endógena de peptidilarginina deiminase (PADI-4, enzima que converte arginina a citrulina), (WEGNER et al., 2010). Outros agentes infecciosos, como por exemplo, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Epstein-Barr* vírus também tem sido sugeridos como fatores capazes de induzir a AR (EBRINGER&WILSON, 2000), geralmente através de mimetismo molecular. Contudo estes mecanismos propostos ainda não foram completamente elucidados.

Assim como em outras doenças autoimunes, existe considerável interesse no efeito da microbiota sobre o risco e progressão da AR (SCHER et al., 2016; HONDA & LITTMAN, 2012). Dados obtidos com modelo de artrite reumatoide em animais de experimentação sugerem um papel essencial da microbiota intestinal em doenças inflamatórias (HONDA et al., 2012). Em humanos, estudos iniciais relatam um desequilíbrio na microbiota intestinal (disbiose) relacionado a AR (SCHER et al., 2016).

1.2.2 Resposta autoimune

Os auto anticorpos são imunoglobulinas (Ig) que reagem contra antígenos próprios de tecido autólogo. A existência de uma variedade de auto anticorpos no soro e no líquido sinovial de pacientes com AR tem sido descrita (**Tabela 1.1**). Dados da literatura demonstram que a família de auto anticorpos mais específica para AR é a direcionada contra proteínas citrulinadas (RAMIRO et al., 2014, ALARCON & ANDRADE, 2007). Esses anticorpos podem ser detectados em aproximadamente 80% dos soros de pacientes com AR com especificidade de 95% a 99% (STOFFER et al.,

2016). Além disso, aparecem precocemente durante a evolução da enfermidade, portanto sua detecção apresenta-se bastante útil para auxiliar no diagnóstico da doença, especialmente na fase inicial da AR.

Tabela 1.1 Frequência de auto anticorpos associados à artrite reumatoide.

Auto anticorpo	Frequência
ACPA	70-80%
Fator reumatoide IgM	75%
Anticolágeno tipo II	60%
Anti-BiP	64%
Anti-GPI	64%
Anticalpastatina	45%
Anti-HGM-1 e anti-HGM-2	40%
Anti-Sa	40%
Anti-RA-33	36%
Antiprofilagrina	70-90%
Antifilagrina	35-60%
Antifibronectina	14%

RA-33 = auto-antígeno de 33 kDa associado à artrite reumatoide; HGM = *high group mobility*; Sa = auto-antígeno de placenta humana associado à artrite reumatoide; BiP = *heavy chain binding protein* p68; GPI = glucose-6-phosphatase isomerase; ACPA=anticorpos anti-proteínas citrulinadas (fonte: adaptado de ALARCON & ANDRADE, 2007).

De fato, a presença de auto anticorpos (soro-positividade) é associada com sintomas mais graves, lesões articulares e aumento da morbidade na AR (HONDA & LITTMAN, 2012; SCHER et al., 2015; ALETAHA et al., 2015; GONZALEZ et al., 2018; van GAALEN et al., 2004). Isto ocorre devido à formação de complexos imunes de ACPAs com antígenos contendo citrulina e subsequente ligação de RF, que pode resultar em ativação do complemento (ZHAO et al., 2008; SABHARWAL et al., 1982; ANQUETIL et al., 2015). O tecido em que estas respostas são ativadas é incerto, mas o pulmão é um candidato, o que é consistente com o papel do tabagismo na AR e com a presença de peptídeos citrulinados compartilhados no pulmão e no tecido sinovial (REYNISDOTTIR et al., 2005) . Os ACPAs circulantes podem ser detectados até 10 anos antes do diagnóstico, doença denominada de pré-AR (NIELEN et al., 2004).

Ao longo do tempo, a concentração de ACPAs aumenta, assim como concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, especialmente antes do início do

comprometimento articular. ACPAs podem ser do tipo IgG, IgA, IgM ou isotipo, e são indicativos da presença de células T (ROMBOUTS et al., 2006; ROMBOUTS et al., 2015). ACPA induz a produção de células B que estão presentes na membrana sinovial e na circulação (ROMBOUTS et al., 2006; KERKMAN et al., 2014). ACPAs por si só podem ser patogênicos, quer através da ativação de macrófagos ou por ativação de osteoclastos através de formação do complexo imunitário e envolvimento do receptor Fc ou ainda, através da ligação a membrana citrulinada (HARRE et al., 2012), e dessa maneira promovendo a perda óssea. Com a terapia efetiva, ocorre a redução das concentrações de RF e ACPA, entretanto, raramente os pacientes se tornam ACPA negativo, enquanto RF diminui mais profundamente e mais frequentemente, podendo os pacientes se tornarem RF negativo (BOHLE et al., 2013).

1.2.3 Processo inflamatório na artrite reumatoide

Na AR o processo inflamatório tem origem na membrana sinovial onde o tecido sinovial mostra hiperplasia do seu revestimento, como resultado do acúmulo de fibroblastos e macrófagos. Estes macrófagos e fibroblastos promovem o processo inflamatório através da produção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) (DA COSTA MOURA, 2013). O TNF- α e a IL-1 β , duas citocinas pró-inflamatórias, induzem as células sinoviais a libertar metaloproteinases (MMPs) e TNF- α que estimulam o desenvolvimento de osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. Conseqüentemente, mais macrófagos, linfócitos e fibroblastos são ativados e o processo inflamatório na AR é continuamente sustentado (PHAM, 2011; DA COSTA MOURA, 2013).

Estudos também mostraram que o TNF- α e a interleucina 17 (IL-17) tem efeito sinérgico na ativação e expressão de interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e MMPs, que em conjunto tem um papel importante no progresso do processo inflamatório e na degradação da cartilagem articular (PAULISSEN et al., 2015; ROY et al., 2015; SACHS et al., 2011; COSTA et al., 2015). Estes mediadores inflamatórios são encontrados na membrana sinovial e no fluido sinovial de pacientes com AR, os quais tem a potente capacidade de induzir a ativação do ligante do receptor ativador do fator

nuclear β (RANKL, principal regulador da osteoclastogênese nos fibroblastos sinoviais e nas células estromais derivadas de tecido ósseo) afetando a sinalização de osteoclastos, causando processo de destruição do osso (**Figura 1.4**, DANKS & TAKAYANAGI, 2009; SANAM et al., 2016).

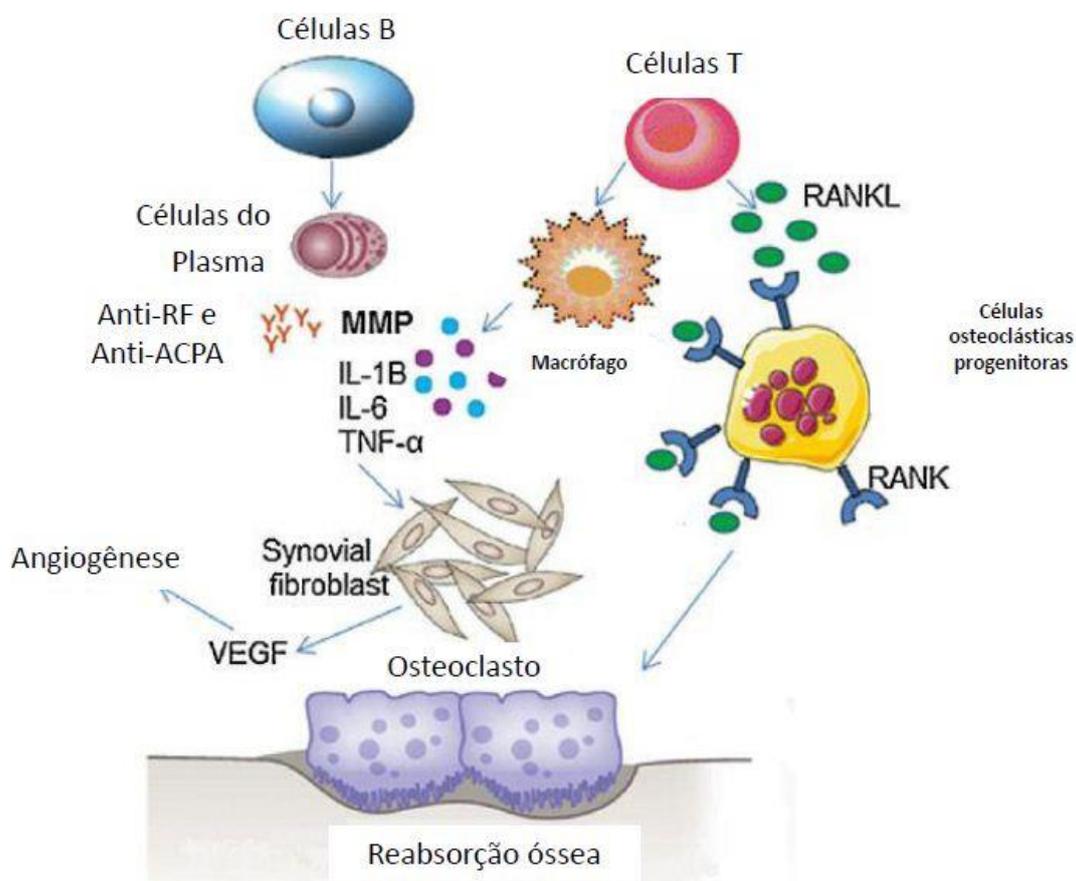


Figura 1.4 Patogênese da artrite reumatoide. Os anticorpos anti fator reumatoide (FR) e antiproteínas citrulinadas (ACPAs) são os dois auto anticorpos mais importantes na patogênese da AR. A ativação de células T resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- β , IL-1 β e IL-6 por macrófagos. Estas citocinas pró-inflamatórias tem a capacidade de ativar o ligante do receptor ativador do fator nuclear β (RANKL), que é o principal regulador da osteoclastogênese. A produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) por fibroblastos sinoviais também estimula a angiogênese que por sua vez mantém o processo inflamatório através do recrutamento de leucócitos. Todos estes componentes tem um papel importante no progresso inflamatório, na degradação da cartilagem e no processo de destruição óssea (fonte: adaptado de SANAM et al., 2016).

A angiogênese é o passo inicial na sinóvia inflamada na AR. A regulação positiva de fatores pró-angiogênicos e regulação negativa de fatores anti-angiogênicos na AR aumentam a proliferação de células endoteliais e o processo da angiogênese (SZEKANECZ & KOCH, 2009; SZEKANECZ et al., 2010; ZHOU et al., 2012). Vários fatores pró-angiogênicos como fatores de crescimento (VEGF, TGF, FGF, EGF, PDGF), citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18), quimiocinas (CXCL8, CXCL12,

CCL2, CXC3L1), proteases (metaloproteases, MMPs) e moléculas de adesão (integrinas, VCAM-1 e ICAM-1) estão envolvidos na angiogênese durante AR (DA COSTA MOURA, 2013).

1.3 Tratamento da artrite reumatoide

O custo relacionado a AR é elevado devido tanto a fatores diretos (gastos com diversos medicamentos, despesas médicas e hospitalares) quanto indiretos como perda da produtividade pessoal ou perda total da capacidade laboral (DE AZEVEDO et al., 2008). Mesmo não apresentando risco de morte a AR resulta na redução da qualidade de vida do paciente e danos econômicos graves a sociedade (ALMEIDA, 2014). Segundo dados de internação hospitalar do SUS, no ano de 2011 houve 19978 internações devido a AR e outras poliartropatias inflamatórias, totalizando um gasto de R\$13.830.164,88, dos quais R\$12.215.908,93 são referentes a serviços hospitalares e R\$1.614.255,95 referentes a serviços profissionais (DATASUS, 2012). Esses gastos não incluem os medicamentos dispensados nos ambulatórios pelo SUS. O gasto anual mundial com o tratamento AR é de aproximadamente U\$16 bilhões incluindo as despesas socioeconômicas diretas, como custos com despesas médicas, e custos indiretos, como a queda de produtividade e redução da qualidade de vida do paciente (DUNLOP et al., 2003).

Em 2012, foi elaborado o último consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. O consenso tem o objetivo de elaborar recomendações para o manejo da AR, com enfoque no tratamento da doença, considerando os aspectos peculiares da realidade socioeconômica brasileira. Dessa forma, o consenso sintetiza a posição da Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR) sobre o tema, com o objetivo de orientar os médicos brasileiros, em especial os reumatologistas, sobre o tratamento da AR no Brasil (DA MOTA et al, 2012). De acordo com o consenso de 2012, o tratamento da AR inclui educação do paciente e de sua família, terapia medicamentosa, fisioterapia, apoio psicossocial, terapia ocupacional e abordagens cirúrgicas. As terapias medicamentosas incluem uso de anti-inflamatórios não hormonais (AINHs), corticoides, medicamentos modificadores do curso da doença

(MMCD) sintéticos e biológicos e drogas imunossupressoras (DA MOTA et al, 2012, COSTA et al, 2015).

O objetivo principal do tratamento é o controle imediato da inflamação a fim de evitar lesões estruturais progressivas, maximizar a qualidade de vida através do controle dos sintomas, otimizar a função articular e melhorar a inclusão social. O tratamento da AR envolve o uso de várias classes de fármacos com diferentes mecanismo de ação (NEGREI et al, 2016). A primeira linha de tratamento da AR está sumarizada na **figura 1.5** e inclui AINHs (anti-inflamatórios não hormonais), corticoides e medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD) (DEVINE et al., 2011).

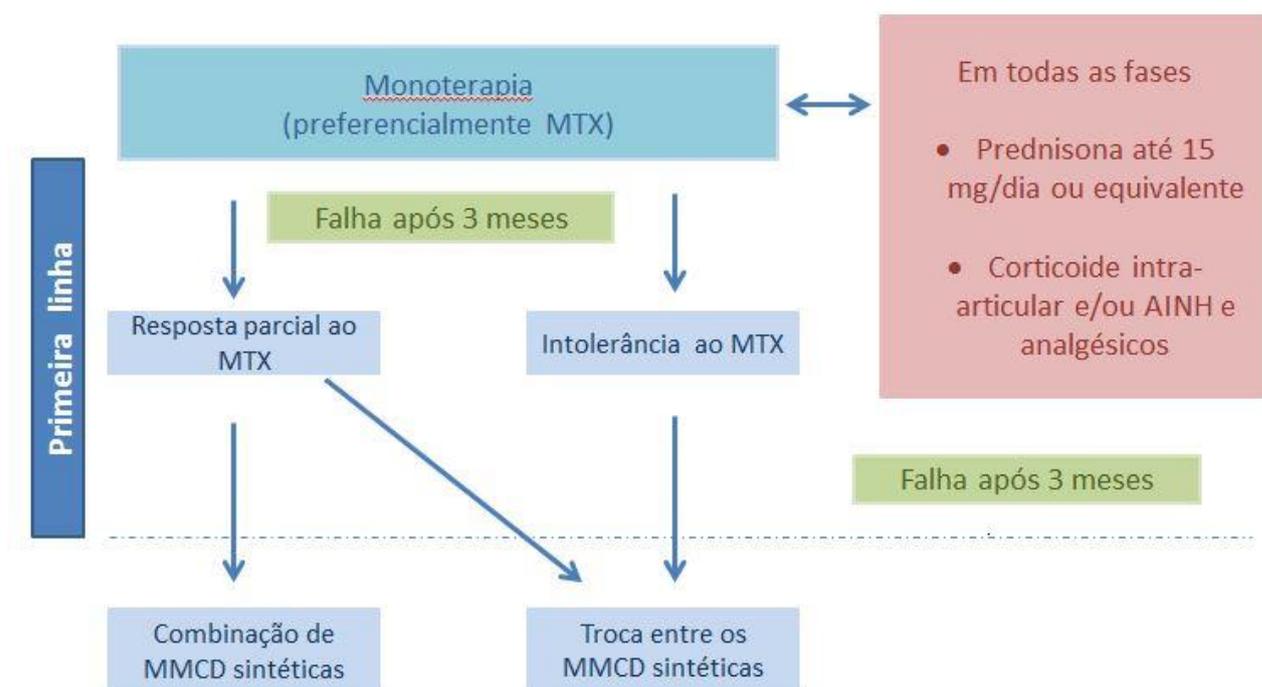


Figura 1.5 Fluxograma para a primeira linha do tratamento medicamentoso da artrite reumatoide: AINH: anti-inflamatório não hormonal; MMCD: Medicamentos modificadores do curso da doença; MTX: metotrexato (Fonte: adaptado de DA MOTA et al, 2012).

1.3.1 Medidas educativas

Antes de iniciar qualquer forma de tratamento, o paciente deve ser esclarecido sobre sua enfermidade e, particularmente, quanto às possibilidades evolutivas, terapêuticas e de prognóstico. É preciso alertar sobre informações inadequadas veiculadas pelos meios de comunicação, em especial a internet (ABOURAZZAK et al.,

2009; LOVISI NETO et al., 2009, DA MOTA et al, 2012). Atividades educativas são essenciais para que se obtenha a colaboração do paciente. Ele tem o direito de saber sobre suas condições e sobre as opções terapêuticas disponíveis, e de participar ativamente das escolhas. O paciente que entende sua condição e compreende a ação dos medicamentos, os métodos de prevenção de deformidades e o processo de reabilitação apresenta melhor evolução clínica (MASIERO et al., 2007; DA MOTA et al, 2012).

1.3.2 Anti-inflamatórios não hormonais (AINHs)

Os anti-inflamatórios não hormonais (AINHs) são muito utilizados para a redução do processo inflamatório por inibirem a síntese de prostanóides, através da inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX), e conseqüentemente reduzem a dor e o edema. Os AINHs diminuem o processo inflamatório e a dor, principalmente no início da doença, pois os MMCD não tem ação imediata. Dessa forma, são usados para controlar a dor e inchaço nas articulações, mas não são eficazes na prevenção de danos estruturais e não alteram o curso da doença (MALOTTKI et al.,2011). Meloxicam é um AINH derivado do oxicam que possui efeitos analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios com menor irritação gástrica quando comparado com outras drogas AINHs. O meloxicam é aprovado pelo FDA para tratamento da osteoartrite. Nas doses recomendadas é equivalente ao ácido acetilsalicílico e a indometacina para o tratamento prolongado da AR. Sua principal vantagem é possuir meia vida longa, o que permite uma única administração por dia ao paciente (GOODMAN&GILMAN, 2010). Os mecanismos de ação são baseados na inibição da ciclooxigenase (COX-1 e 2) e conseqüente redução da produção de prostaglandinas. Seu uso deve ser em conjunto com medicamentos que promovem a remissão da doença. O uso por longo prazo pode estar associado a efeitos adversos tais como náusea, azia, dor abdominal e gastrite, devendo ser evitado em pacientes com úlceras (NEGREI, 2016).

1.3.3 Corticoides

A maioria dos estudos sobre o uso de corticoides no tratamento da AR sugere a utilização da prednisona ou prednisolona em doses baixas. Não há estudos comparativos que permitam indicar preferencialmente doses mais altas no início do tratamento (VAN

EVERDINGEN et al., 2002; SMOLEN et al., 2011). Na AR, devido aos efeitos adversos graves e debilitantes associados ao seu uso crônico, os corticoides são usados como agentes temporizadores para a doença progressiva que não responde ao tratamento com fisioterapia e AINHs. Nesse caso eles proporcionam alívio até que outros fármacos antirreumáticos de ação lenta exerçam seus efeitos (GOODMAN, 2010). Devido aos efeitos adversos o tempo de uso de corticoides deve ser abreviado ao mínimo possível. Se a previsão for de três ou mais meses de uso, deve-se fazer suplementação de cálcio e de vitamina D. Dependendo do resultado de densitometria óssea, e em pacientes com fatores de risco para fraturas, a utilização de drogas antirreabsortivas, como os bisfosfonatos, pode ser considerada (HOES et al., 2009). Em pacientes com a doença ativa restrita a poucas articulações pode-se usar o corticoide intra-articular, porém, uma mesma articulação não deve ser infiltrada mais de três a quatro vezes ao ano (DERNIS et al., 2010). De fato, a prednisona é um medicamento muito utilizado para aliviar os sintomas da AR, sendo importante a administração intra-articular em casos de sintomatologia limitada a uma ou apenas algumas articulações. Para pacientes em uso concomitante de corticoide e AINH, recomenda-se proteção gástrica com inibidor de bomba de próton (DERNIS et al., 2010).

Os corticoides tem efeito rápido e em associação com os medicamentos que promovem a remissão da doença evita danos estruturais da AR inicial. A sua utilização é indicada em vasculite reumatoide (inflamação do vaso sanguíneo) ou outras manifestações sistêmicas da AR (NEGREI et al, 2016). Também tem importantes efeitos no controle dos sintomas e na redução da taxa de progressão da doença (KIRWAN et al., 2007). Corticoides podem ser usados de forma intermitente, principalmente em pacientes com doença de difícil controle ou enquanto se aguarda a ação das drogas modificadoras da doença, mas não como monoterapia (KUMAR e BANIK, 2013). Seu uso sistêmico, utilizado no início do tratamento da AR reduz os sintomas e a progressão radiográfica, mesmo depois da suspensão do seu uso. A prednisolona é o metabólito ativo da prednisona após sua ativação hepática. Em qualquer das etapas pode-se usar prednisona ou prednisolona (até 0,3 mg/KG/ dia, via oral).

1.3.4 Medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD)

Os MMCD devem ser indicados ao paciente a partir da definição do diagnóstico de AR (FURST et al., 2011). A utilização de MMCD em pacientes com artrite indiferenciada e biomarcadores preditores de AR, como positividade dos anticorpos antipeptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP) e/ou fator reumatoide (FR), pode ser considerada (LUKAS et al., 2011). MMCD é uma classe heterogênea de medicamentos capazes de reduzir a progressão da doença e da inflamação sistêmica. Dessa forma, o uso de MMCD deve ser iniciado o mais rápido possível, a partir do diagnóstico. Os MMCD são classificados em sintéticos e biológicos (NEGREI et al, 2016). De acordo com a portaria SAS/MS, 996 de 30 de setembro de 2015 a administração de fármacos que modificam o curso da doença deve ser iniciada no momento do diagnóstico da AR. Avaliações clínicas frequentes, a cada 30 a 90 dias são recomendadas. Entre os MMCD sintéticos para o tratamento de AR, o metotrexato é o medicamento padrão, devendo ser iniciado tão logo o diagnóstico seja definido. A terapia de primeira linha inclui o uso precoce do MMCD sintético, o MTX, que é o fármaco de escolha, no entanto, apenas 20 a 40 % em monoterapia apresentam resposta clínica satisfatória (COSTA et al, 2015).

1.3.4.1 MMCD sintéticas: metotrexato (MTX)

O MTX é um agente imunomodulador cuja ação consiste na inibição da síntese de DNA, RNA, timidinato e proteínas. Os efeitos anti-inflamatórios do MTX na AR parecem estar relacionados, pelo menos em parte, com a modulação do metabolismo da adenosina e com os efeitos possíveis nas vias do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês, *tumor necrosis factor*). Os efeitos imunossupressivos e tóxicos do MTX são devido à inibição da diidrofolato redutase, enzima envolvida no metabolismo do ácido fólico, o que evita a redução do diidrofolato a tetraidrofolato ativo. O tempo até a concentração máxima é de 1–5 horas por via oral (VO) e de 30–60 minutos por via intramuscular (IM) ou subcutânea (SC). Elimina-se por via renal entre 40% e 90% de forma inalterada (CRONSTEIN, 2010, DA MOTA et al., 2012). O MTX é atualmente considerado o fármaco padrão no tratamento da AR (PINCUS et al., 2010, DA MOTA et al, 2012). O MTX é capaz de reduzir sinais e sintomas de atividade da AR e de melhorar o estado funcional do paciente (O'DELL et al., 1996, DA MOTA et al, 2012). O MTX também reduz a progressão das lesões radiográficas.

A dose inicial recomendada é de 10 a 15 mg/semana por via oral (VO) ou parenteral (intramuscular ou subcutânea). Caso não ocorra melhora ou controle da doença com a dose de 10-15 mg por semana deve-se aumentar a dose progressivamente a cada 2 ou 4 semanas até a dose de 20 mg por semana. Para pacientes com intolerância gastrointestinal ou com resposta inadequada a formulação oral de MTX, pode-se utilizar a formulação parenteral. Os efeitos adversos mais frequentemente observados são anemia, neutropenia, náuseas e vômitos, mucosite e elevação de enzimas hepáticas. A pneumonia intersticial é uma manifestação menos frequente. Sem dúvida nenhuma o MTX é o padrão ouro no tratamento e seu uso prolongado é bem tolerado e seguro (NEGREI et al, 2016).

1.3.4.2 MMCD biológicas

Um dos mais relevantes avanços na terapia da AR foi o desenvolvimento das MMCD biológicas (CAPORALI et al., 2011). Embora essas medicações sejam eficazes no controle da AR, sua segurança a longo prazo ainda não esta completamente estabelecida (FAVALLI et al., 2011). De acordo com DA MOTA (2012), encontram-se aprovadas pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no Brasil os seguintes MMCD biológicos:

- a) Anti-TNF: adalimumabe, certolizumabe, etanercepte, infliximabe e golimumabe;
- b) Depletor de linfócito B: rituximabe;
- c) Bloqueador da co-estimulação do linfócito T: abatacepte;
- d) Bloqueador do receptor de interleucina-6 (IL-6): tocilizumabe.

A **Figura 1.6** mostra o Fluxograma para a segunda e terceira linha de tratamento da AR no Brasil com MMCD sintéticos e biológicos, proposto pela Comissão de Artrite Reumatoide da Sociedade Brasileira de Reumatologia (DA MOTA, 2012).

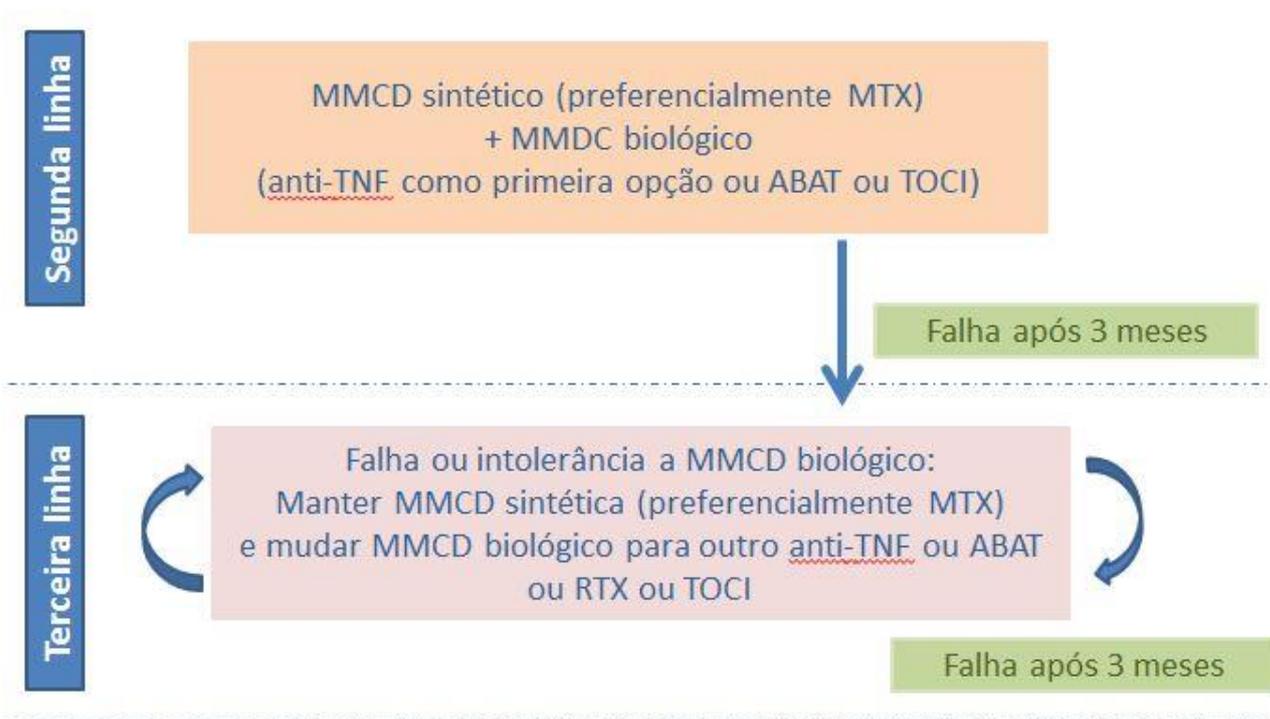


Figura 1.6 Fluxograma para o tratamento medicamentoso da artrite reumatoide com MMCD biológicos. ABAT: abatacepte; MMCD: medicamento modificador do curso da doença; MTX: metotrexato; RTX: rituximabe; TOCI: tocilizumabe (Fonte: adaptado de DA MOTA et al, 2012).

Os MMCD biológicos estão indicados para pacientes em que a atividade da doença persiste apesar do tratamento com dois esquemas de MMCD sintéticos, dos quais pelo menos um deles seja combinações de MMCD. O uso de agentes biológicos deve ser feito associado a um MMCD sintético, preferencialmente o MTX. Apenas em casos excepcionais um MMCD biológico pode ser prescrito para tratamento precoce da AR, que neste caso é caracterizada pela combinação de sinais de pior prognóstico como: elevado número de articulações acometidas, erosões radiográficas na fase inicial da doença, FR e/ou anti-CCP presentes em altos títulos (LINEKER et al., 2011; SMOLEN et al. 2010; MARKATSELI et al., 2010; VISSER et al., 2010; SMOLEN et al., 2010; VISSER et al., 2009; DA MOTA et al, 2012). Alguns fatores podem determinar a escolha de um ou outro MMCD biológico como a dificuldade de aplicação de medicação por via subcutânea (SC) por alguns pacientes e seus familiares, bem como a inexistência de centros de infusão para aplicação de medicação intravenosa (IV) em certos locais. Os centros de dispensação/infusão das drogas, públicos ou privados, devem informar o adequado acondicionamento de cada medicação ou encaminhar os pacientes para o local de infusão, para evitar perda de eficácia do tratamento. Recomenda-se que o uso desses fármacos seja indicado e monitorado por um

reumatologista (MOMOHARA et al., 2010). Os MMCD biológicos mais utilizados são os *anti-TNF*, mas há evidências de que os demais MMCD biológicos também promovam o controle de sinais e sintomas da AR e a inibição da progressão radiográfica (DA MOTA et al, 2012).

No Brasil, no Sistema Único de Saúde (SUS), o acesso aos MMCD biológicos para o tratamento da artrite reumatoide é feito pelo Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF), anteriormente denominado Programa de Medicamentos de Dispensação Excepcional/Alto Custo (PMAC, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). O infliximabe foi o primeiro MMCD biológico padronizado para o tratamento da artrite reumatoide e está disponível desde 2002 (SECRETARIA DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Em 2006, o etanercepte e o adalimumabe foram incorporados como opções de tratamento (SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Desses, o infliximabe correspondeu entre 16% e 40% das prescrições em estudos brasileiros efetuados em 2010 (WIENS et al., 2012; TITTON et al., 2011). Os gastos do Ministério da Saúde com medicamentos desse programa cresceram aproximadamente 106% no período de 2000 a 2007 (CARIAS et al., 2011). Entre 2000 e 2004, as doenças do sistema osteomuscular e do tecido conjuntivo representaram cerca de 22% dos diagnósticos dos pacientes atendidos no programa (ACURCIO et al., 2009). Nesse mesmo período, o infliximabe ocupou a segunda posição do maior gasto mensal médio *per capita*, no valor de R\$ 5.945,58 (BRANDÃO et al., 2011). Em 2007, a artrite reumatoide foi a quarta doença de maior impacto orçamentário, consumindo 10,4% dos recursos (CARIAS et al., 2011). De fato, o tratamento com MMCD biológicos tem custo elevado. O ciclo de tratamento de 48 meses com esquema terapêutico convencional seguido de biológico custou R\$ 1.701.286,76 (MONTEIRO & ZANINI, 2008) e o custo de seis meses de tratamento com infliximabe é de R\$ 19.698,00 (VENSON et al., 2011).

1.4 Sistemas de transporte e liberação de fármacos para o tratamento da AR

1.4.1 Nanopartículas

A nanotecnologia e as nanopartículas tem uma vasta aplicação na área biológica. A nanomedicina, um ramo da nanotecnologia que se refere à intervenção médica em escala molecular altamente específica para o tratamento de doenças ou reparo de tecidos danificados. Nos últimos anos, a nanomedicina baseada em polímeros tem recebido atenção crescente devido à sua habilidade em aperfeiçoar a eficiência terapêutica de alguns fármacos (PARK et al.,2008). De fato, nanopartículas podem melhorar a cinética, biodistribuição e a liberação de um fármaco, vacinas, proteínas recombinantes ou oligonucleotídeos. A nanotecnologia possibilita a confecção de dispositivos na mesma escala que as células e biomoléculas, ou seja, em escala nanométrica o que propicia uma abordagem única para a criação de sistemas de liberação de fármacos (**Figura 1.7**). Portanto, o desenvolvimento de nanoestruturas moleculares, com tamanho e forma de partículas bem definidas, é de grande interesse para o desenvolvimento de sistemas transportadores de fármacos. Os sistemas utilizados como carreadores de fármacos que possuem escala nanométrica e tamanho uniforme tem capacidade maior de atravessar membranas celulares (SVENSON&TOMALIA, 2005).

Os lipossomas, micelas, nanopartículas metálicas e nanopartículas poliméricas são os sistemas transportadores em escala nanométrica mais utilizados em sistemas de liberação de fármacos (BADER, 2012). As nanopartículas são capazes de: (a) encapsular e proteger os fármacos da degradação, (b) melhorar o alvo para entrega e liberação do fármaco, (c) propiciar o controle da liberação de fármacos e d) de serem produzidas em grande escala (ANSELMO & MITRAGOTRI, 2014).

As nanopartículas poliméricas, confeccionadas a partir de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis tem sido amplamente estudadas como veículos terapêuticos. As nanopartículas poliméricas são formuladas por meio de copolímeros de hidrofobicidade diferente. Estes copolímeros formam espontaneamente micelas em meio aquoso (TORCHILIN, 2017; GROBMYER et al., 2010). As nanopartículas poliméricas podem encapsular fármacos hidrofílicos e/ou pequenas moléculas de fármacos hidrofóbicos, proteínas e ácidos nucleicos (WANG & WANG, 2014). A utilização de polímeros como transportadores de fármacos, especialmente os que possuem baixa solubilidade em água, em pH fisiológico e alta toxicidade, tornou-se evidente na última década (MALIK et al., 2006; SVENSON,2009; KESHARWANI et al., 2013). Uma das primeiras abordagens utilizando nanocarreadores para a AR teve como alvo os macrófagos. Na AR ocorre aumento de macrófagos nas articulações

inflamadas e as nanopartículas são facilmente fagocitadas pelos macrófagos sem a necessidade de modificações na superfície das mesmas (PHAM, 2011).

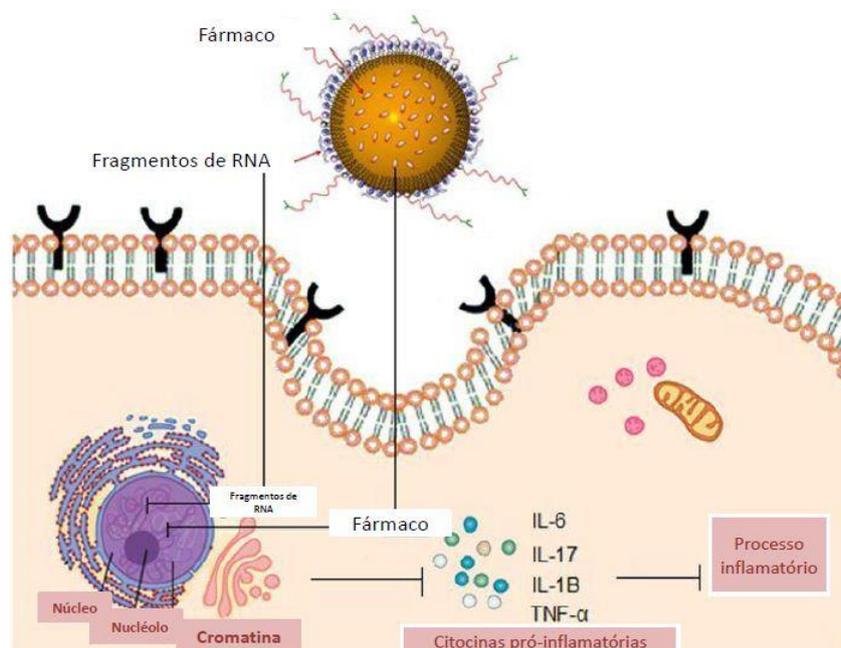


Figura 1.7 Nanopartículas (NP) para tratamento da artrite reumatoide. Diferentes tipos de nanopartículas tem sido utilizadas para o tratamento da AR. Fármacos e fragmentos de RNA são transportados por nanopartículas e impedem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e como consequência ocorre a inibição do processo inflamatório e da degeneração da cartilagem articular (fonte: adaptado de SANAM et al., 2016).

Os dendrímeros são nanopartículas poliméricas com estrutura ramificada feita a partir de elementos sintéticos ou naturais (MEDINA & EL-SAYED, 2009). Em contraste com os lipossomas, os sistemas transportadores de fármacos feitos com nanopartículas poliméricas liberam os fármacos de maneira mais lenta e, portanto, requerem uma administração menos frequente (SANAM et al., 2016).

1.5 Dendrímeros como sistemas transportadores de fármacos

Os dendrímeros são uma classe de polímeros que apresenta estruturas ramificadas. Os dendrímeros de poliamidoamina, ou PAMAMs, foram os primeiros a serem sintetizados e tem grande potencial para sistemas de liberação de fármacos. As estruturas dendríticas foram descritas primeiramente em 1978 (BUHLEIER et al., 1978). O desenvolvimento das estruturas dessas moléculas, assim como o desenvolvimento de novas técnicas sintéticas originou as grandes estruturas dendríticas

(DENKEWALTER et al, 1983; TOMALIA et al., 1985; BRABRANDER VAN DEN BERG & MEIJER, 1993) e esta classe foi denominada de dendrímeros. A palavra dendrímero tem origem do grego “dendron” e “meros” que significam “árvore” e “parte”, respectivamente (DYKES, 2001).

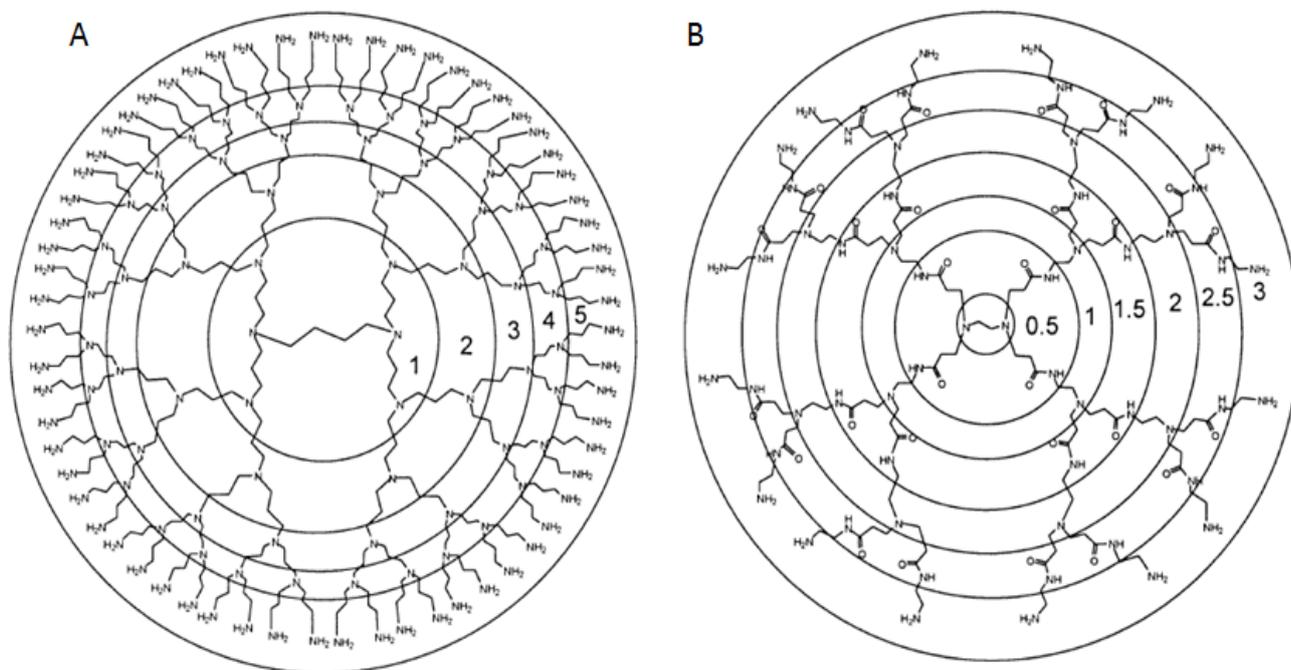


Figura 1.8 Dendrímeros disponíveis comercialmente. (A) Dendrímero de Polipropileno imina (G5) e (B) dendrímero de poliamido amina (G3). Cada geração é marcada com um círculo (fonte: adaptado de Boas & Heegaard, 2004).

Os dendrímeros ramificados resultam em estruturas semiglobulares ou globulares, na maioria das vezes com alta densidade funcional na superfície. As estruturas são caracterizadas por “camadas” entre cada ponto focal denominado de geração (**figura 1.8**). O número de gerações é definido pelo número de pontos focais do núcleo a superfície. O núcleo é denominado de geração 0 (G0), sem ramificações.

Os dendrímeros podem ser sintetizados quimicamente por duas formas diferentes, divergente ou convergente (**figura 1.9**).

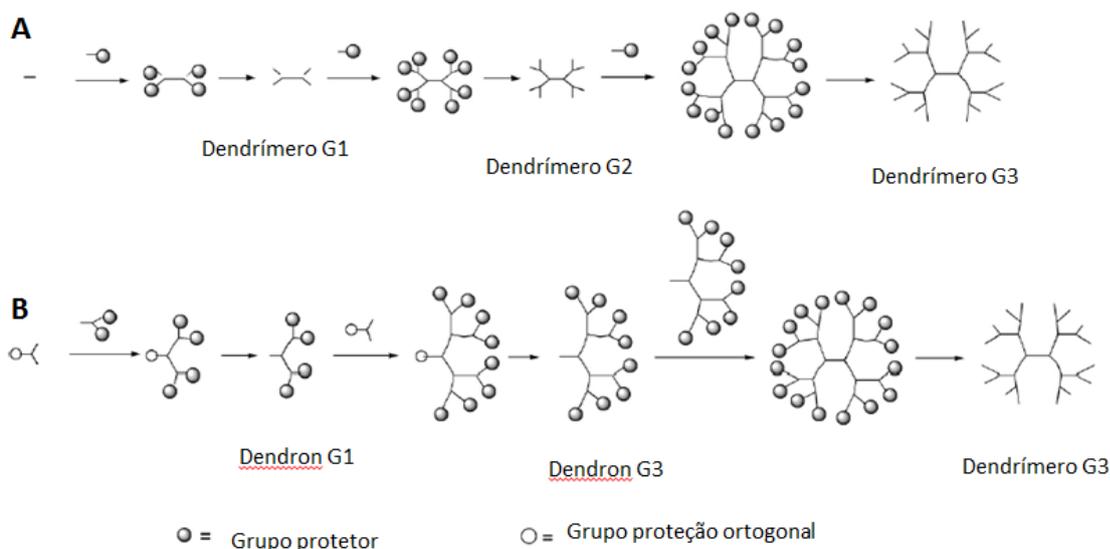


Figura 1.9 Síntese dendrímero (esquemáticamente representado). (A) Estratégia divergente e (B) estratégia convergente (fonte: adaptado de Boas & Heegaard, 2004).

Na estratégia divergente (Figura 1.9A) os dendrímeros são sintetizados a partir do núcleo aumentando geração por geração. A estratégia convergente (Hawker & Frekche, 1990) (Figura 1.9B) inicia a síntese pelos grupos terminais em direção ao núcleo onde os segmentos de dendrímeros, *dendron*, são ligados entre si.

Para a confecção de sistemas carreadores de fármacos ou sistemas transportadores de fármacos os dendrímeros podem ser sintetizados de acordo com a aplicação específica, o que é uma grande vantagem. A arquitetura dos dendrímeros possibilita a sua interação com fármacos muito ou pouco solúveis em água, formando complexos via encapsulamento do fármaco, com ligações covalentes ou não covalentes.

As cavidades internas dos dendrímeros podem ser utilizadas para transportar e armazenar uma grande variedade de fármacos e outras moléculas (JENSEN et al., 2005). Ao mesmo tempo é possível fazer modificações de grupos funcionais externos fornecendo propriedades flexíveis ao dendrímero. Por exemplo, o êxito da preparação de conjugados multivalentes de dendrímeros com o ácido fólico ou fármacos para o tratamento do câncer tem importantes implicações quando direcionados para células tumorais. Além disso, o caráter multivalente dos dendrímeros facilita a fixação de várias moléculas úteis para o diagnóstico e tratamento de várias doenças, bem como combinações destes agentes (KHOPADEET al., 2002; QUINTANA et al., 2002; SUDIMACK & LEE, 2000). A **Figura 1.10** mostra as funções dos grupos internos e externos do dendrímero utilizado como sistema de liberação/transporte de fármacos (BAI et al., 2006).

carreadores, como micelas, lipossomas, gotículas de emulsão e engenharia de partículas (SVENSON& TOMALIA, 2005).

O dendrímero de poliglicerol (PGLD) é um polímero solúvel em água com baixa citotoxicidade. Com a aprovação do poliglicerol (PGL) pelo FDA (Food and Drug Administration), como emulsificante na indústria farmacêutica e alimentícia, este dendrímero se tornou um promissor candidato para uso no campo biomédico.

O dendrímero PGLD possui um esqueleto baseado na função éter, onde cada ramificação termina em uma função hidroxila, o que o torna altamente funcional. Além disso, é fato reconhecido na literatura que poliéteres alifáticos tendem a ser biocompatíveis, o que torna o PGLD um dendrímero adequado para aplicações como um agente de entrega de compostos biologicamente ativos (KESHARWANI et al., 2013).

Apesar de décadas de pesquisas farmacêuticas e clínicas, ainda há muitas necessidades não contempladas no tratamento da AR. Os fármacos utilizados para o tratamento estão disponíveis para a administração oral ou por via intra-articular, com eficácias comparáveis (STEINMEYERAND& KONTTINEN, 2006; ABRAMSON, 2006; GERWIN et al., 2006). Entretanto, a administração por via oral é relacionada frequentemente com reações adversas severas, principalmente gastrintestinais, além de outras complicações (GERWIN et al., 2006). Dessa forma, a utilização de dendrímeros do tipo gliceróis densamente ramificados com propriedades biocompatíveis, pode ser uma alternativa promissora para a obtenção de carreadores dos fármacos (prednisona, meloxicam e metotrexato) para o tratamento sistêmico ou intra-articular da AR.

Espera-se que o fármaco encapsulado apresente diminuição da toxicidade, maior tempo de permanência na circulação e reações adversas sistêmicas e locais mínimas. Outra vantagem de usar dendrímeros como carreadores de fármacos para tratamento de doenças inflamatórias é o fato deste polímero já possuir um efeito anti-inflamatório. Como exemplo pode-se citar seus derivados sulfatados para aplicações como inibidores de inflamação (DERNEDDE et al., 2010; GRÖGER et al., 2013).

1.6 Hemocompatibilidade

1.6.1 Efeito sobre a coagulação

O processo da hemostasia sanguínea envolve a participação de vasos sanguíneos, plaquetas e fatores da cascata da coagulação (SIQUEIRA, 2001). Mediante lesão do endotélio vascular, as plaquetas são ativadas e formam um tampão plaquetário no local da lesão, evitando a perda de sangue. Ao mesmo tempo, a cascata da coagulação é ativada, promovendo a formação de um coágulo de fibrina, que resulta em maior retenção das plaquetas e formação de um coágulo estável (SIQUEIRA, 2001; RIDDEL et al., 2007). Para fins didáticos, o processo da atividade da cascata da coagulação é dividido em duas etapas. Uma etapa é representada pela avaliação da atividade da via intrínseca, e a outra é representada pela avaliação da atividade da via denominada extrínseca. As duas vias são convergentes e culminam com a formação de um coágulo estável de fibrina (SIQUEIRA 2001).

Ao considerar que as formulações nanoestruturadas são administradas por via endovenosa, é importante avaliar se as mesmas interagem com os componentes da hemostasia sanguínea (OLIVEIRA, 1993; ADLER-MOORE & PROFFITT, 2003; RATH et al, 2003; SCHETTINI et al., 2005; SCHETTINI, 2006; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2007; KUZNETSOVA et al., 2012). Ao interagir tanto com plaquetas quanto com fatores da coagulação e células envolvidas neste mecanismo, as formulações nanoestruturadas poderiam promover a formação do coágulo sanguíneo. Essas características dependem diretamente da constituição dos componentes desses sistemas carreadores e de sua interação com os componentes envolvidos na cascata da coagulação (WASSEF, 1995; GALÁN et al., 2002; DOBROVOLSKAIA & NEUN, 2009; DOBROVOLSKAIA & NEUN, 2011; KUZNETSOVA et al., 2012).

1.6.2 Ativação plaquetária

As plaquetas possuem uma importante função hemostática que resulta na formação de um tampão plaquetário no local da lesão do vaso sanguíneo. As plaquetas também podem ativar mecanismos da coagulação por expor em sua superfície fosfolípidos carregados negativamente que irão auxiliar na consolidação do coágulo de

fibrina que está sendo formado (SIQUEIRA, 2001). Após a lesão vascular ocorre a adesão das plaquetas às macromoléculas presentes no tecido subendotelial (BEVERS et al., 1991; SIQUEIRA, 2001; RIDDEL JR, 2007).

1.6.3 Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Outra forma de avaliar laboratorialmente a atividade de uma das vias da cascata da coagulação sanguínea é por meio do teste do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPA). Esse teste é baseado no modelo da cascata da coagulação, o qual analisa qual o tempo necessário para que ocorra a formação do coágulo de fibrina. Os fatores que atuam nessa via estão em estado inativo (zimogênios), mas assim que recebem um estímulo, são ativados em forma de cascata de reações enzimáticas que por fim irão provocar a formação de um coágulo de fibrina (FRANCO, 2001; FERREIRA et al., 2010). O esquema da cascata de coagulação pode ser visto na **Figura 1.11**, que relaciona as vias envolvidas na coagulação (BOON, 1993; CARVALHO, 2008; ZAGO, 2005; FRANCO, 2001; FERREIRA et al., 2010).

1.6.4 Tempo de protrombina (TP)

A avaliação realizada através da determinação do Tempo de Protrombina (TP) baseia-se na ativação das vias extrínseca e comum da cascata da coagulação (FERREIRA et al., 2010). Vale lembrar que o termo extrínseco é usado para designar uma proteína que não está presente no sangue circulante, o Fator Tecidual (FT) que também é chamado de Fator III ou tromboplastina. Esse fator torna-se exposto quando há uma lesão no vaso sanguíneo (BOON, 1993; FRANCO, 2001; RIDDEL et al., 2007; FERREIRA et al., 2010). De maneira semelhante ao que acontece na via intrínseca da coagulação, a injúria vascular faz com que o FT sofra uma modificação estrutural expondo o domínio de ligação ao Fator VII (FVII), que na presença de íons Ca^{2+} , forma um complexo tri-molecular, $\text{FT-Ca}^{2+}\text{-FVII}$. A formação desse complexo torna o FVII ativo (FVII a) o qual, na presença de Ca^{2+} e fosfolípidos, irá ativar o Fator X (FX). Tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca da coagulação convergem para uma via comum, como pode ser observado na **figura 1.11**.

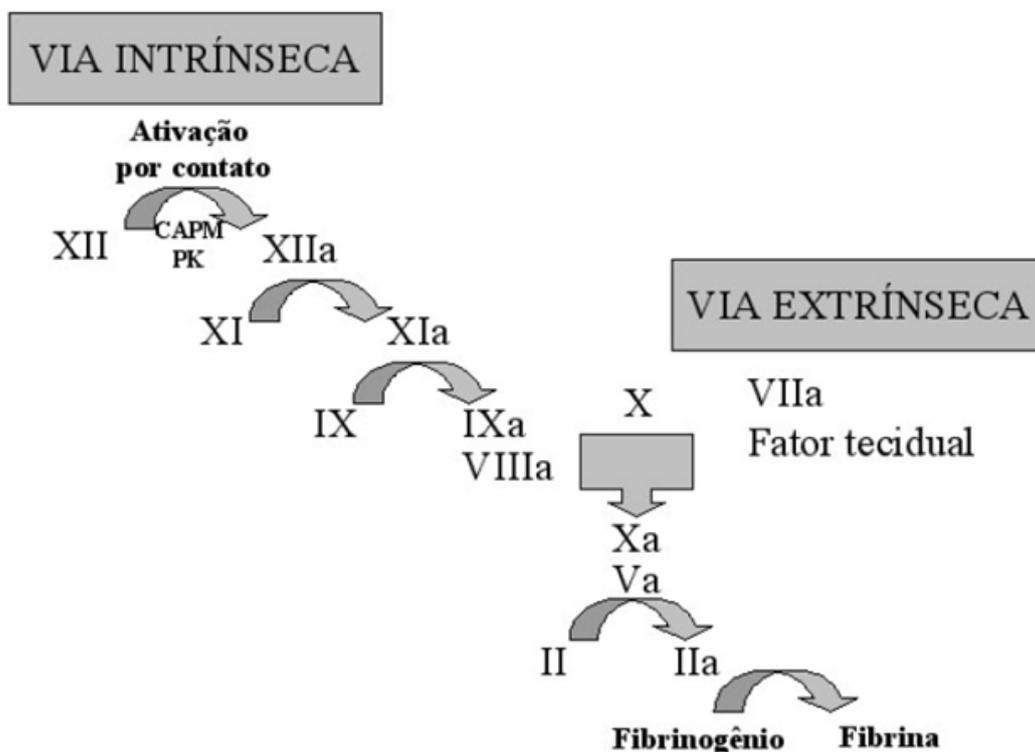


Figura 1.11 Esquema da cascata da coagulação com a divisão do sistema de coagulação em duas vias. CAPM: cininogênio de alto peso molecular; PK: pré-caliceína (fonte: adaptado de FRANCO, 2001).

1.6.5 Hemólise

O sangue é composto pelo plasma e pela porção celular. O plasma corresponde a 55% do sangue, formado por 91,5% de água, 7% de proteínas e 1,5% de sais e substâncias orgânicas. A porção celular é composta por três linhagens, onde as hemácias, chamadas também de glóbulos vermelhos ou eritrócitos, são mais abundantes quando comparadas às outras linhagens celulares, leucócitos e plaquetas. Seu número pode variar entre 4,5 – 6,0 milhões por microlitro de sangue (CARVALHO, W. F., 2008). No ser humano, as hemácias têm uma vida média de aproximadamente 120 dias e uma baixa taxa de destruição fisiológica. Diariamente, 0,06% a 0,4% das hemácias são fisiologicamente retiradas da circulação (MCPHEE & GANONG, 2007).

As hemácias, por serem as células encontradas em maior quantidade na corrente sanguínea e por sua provável interação com formulações farmacêuticas administradas por via parenteral, como os nanocarreadores, são alvos de pesquisas para testes de

toxicidade (DOBROVOLSKAIA et al., 2008; DASH et al., 2010; BENDER et al., 2012). Assim, uma forma de avaliar a ocorrência de reações adversas devido à interação entre as formulações farmacêuticas, fármacos e componentes celulares do sangue é avaliar o grau de hemólise que tais formulações ou fármacos podem causar. A indução de hemólise por sistemas nanoestruturados pode ser um fator de risco à saúde, uma vez que o resultado dessa interação pode levar a um quadro de anemia (DOBROVOLSKAIA et al., 2008; BERTRAND & LEROUX, 2012; DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013). Nesse sentido, o teste de hemólise é de fundamental importância para estabelecer o grau de interação que novos materiais podem ter com as células vermelhas e se essa interação pode comprometer a sua estrutura, e conseqüentemente acarretar a lise e liberação de seu conteúdo citoplasmático no plasma sanguíneo. O valor máximo de hemólise permitido e preconizado pelo protocolo internacional E2524-08 (2013) - *Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles* da ASTM (*American Society for Testing and Materials*) para o estudo das propriedades hemolíticas de nanopartículas é 2% (DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013).

Portanto, baseado em todos os dados descritos, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a hemocompatibilidade de diferentes nanofármacos com estrutura dendrítica para o tratamento da artrite reumatoide. Para tanto, serão utilizadas técnicas físico-químicas para a caracterização dos conjugados PGLD-prednisona, PGLD-meloxicam e PGLD-metotrexato. Para avaliar a Hemocompatibilidade serão utilizados os testes de tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), teste de adesão plaquetária e o ensaio de hemólise dos fármacos puros, do PGLD isolado e dos conjugados PGLD-prednisona, PGLD-meloxicam e PGLD-metotrexato.

1.7 Objetivo:

Avaliar a hemocompatibilidade de diferentes nanofármacos com estrutura dendrítica para o tratamento da artrite reumatoide.

1.7.1 Objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar por técnicas físico-químicas os conjugados PGLD-prednisona, PGLD-meloxicam e PGLD-metotrexato;

- ✓ Estudar as propriedades de hemocompatibilidade dos fármacos puros, do PGLD isolado e dos conjugados PGLD-prednisona, PGLD-meloxicam e PGLD-metotrexato, utilizando o tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), teste de adesão plaquetária e o ensaio de hemólise.

Capítulo 2
MÉTODOS E DESCRIÇÃO DA PESQUISA

2 MÉTODOS E DESCRIÇÃO DA PESQUISA

2.1 Materiais

1. Prednisona: Sigma-Aldrich
2. Meloxicam: Sigma-Aldrich
3. Metotrexato: Sigma-Aldrich
4. Anticoagulante citrato de sódio 0,38%: VACUETTE ®
5. Anticoagulante EDTA: VACUETTE ®
6. PGLD de segunda geração (G2)
7. PGLD de quarta geração (G4)
8. Cefalina+ Ácido elágico: WAMA diagnóstica
9. Cloreto de cálcio: WAMA diagnóstica
10. Saponina: Dinâmica

Os experimentos de caracterização físico-química e de hemocompatibilidade foram realizados nos seguintes grupos listados no quadro 2.1:

Quadro 2.1 Grupos participantes dos ensaios de caracterização química e biológica

GRUPO	Dendrímero	Fármaco
G2	G2	-----
G4	G4	-----
Prednisona	-----	Prednisona
Meloxicam	-----	Meloxicam
Metotrexato	-----	Metotrexato
G2 Pred	G2	Prednisona
G2 Melox	G2	Meloxicam
G2 Metot	G2	Metotrexato
G4 Pred	G4	Prednisona
G4 Melox	G4	Meloxicam
G4 Metot	G4	Metotrexato

2.2 Imobilizações da prednisona, meloxicam ou metotrexato nos dendrímeros

Os poligliceróis dendríticos, derivados do glicerol utilizados nesse trabalho foram sintetizados via rota divergente através de reação de eterificação do glicerol segundo os trabalhos de Esdras (PASSOS et al., 2015; Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150316771). As amostras foram cedidas pelo professor Álvaro Antônio Alencar de Queiroz do Centro de Estudos e Inovação em Materiais Funcionais Avançados da UNIFEI.

A síntese dos conjugados PGLD-Prednisona, PGLD-Meloxicam e PGLD-Metotrexato foi efetuada de acordo com trabalhos anteriores do grupo de Polímeros Bioativos e Biomiméticos da UNIFEI. O PGLD foi sintetizado a partir da síntese de Williamsom modificada pela utilização de um catalisador de transferência de fase. Após purificação por diálise, a reação de acoplamento entre o PGLD e os fármacos foi catalisada após reação com uma mistura de dimetilaminopiridina (DMAP) e dicitolcarbodiimida (DCC). O solvente utilizado na reação de acoplamento foi o dimetilsulfóxido (DMSO).

Adicionou-se a 0,2 mols de PGLD uma massa de 50 mg de DCC e 5,0 mg de DMAP previamente dissolvidos em 10 mL de DMSO em balão tribulado sob atmosfera inerte (nitrogênio). O sistema reacional foi mantido sob agitação constante por 48 horas a - 4 °C.

Após a reação de acoplamento a mistura reacional foi dialisada em solução tampão PBS pH=7,4 por membrana com massa molar de corte entre 14 kDa e 16 kDa durante 3 dias. Após purificação o conjugado foi previamente congelado e liofilizado durante aproximadamente 10 horas. O rendimento do processo de conjugação, calculado pela razão entre a massa do fármaco adicionado e do imobilizado e determinado por HPLC foi de 95%. As imobilizações dos fármacos nos dendrímeros foram realizadas em triplicata. A relação entre PGLD e fármacos está representada no quadro 2.2.

Quadro 2.2 Relação entre PGLD e fármacos

Prednisona/ PGLD-G2=1:23	Prednisona/PGLD-G4= 1:22
Meloxicam/PGLD-G2 = 1:302	Meloxicam/PGLD-G4 = 1:228
Metotrexato/ PGLD-G2 = 1:25	Metotrexato/PGLD-G4 = 1:21

2.3 Caracterização físico-química

Para a caracterização físico-química foram utilizadas as técnicas de Espectroscopia vibracional na região do Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) dos fármacos (prednisona, meloxicam e metotrexato), dendrímeros (G2 e G4) e associação dos fármacos com os dendrímeros.

2.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia na região do Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma ferramenta analítica usada para a detecção de espectros vibracionais de moléculas orgânicas. Esta técnica baseia-se no fato de que as ligações químicas das moléculas possuem frequências vibracionais específicas (GARCIA, 2014). A espectroscopia vibracional é uma ferramenta importante para a caracterização de estruturas dendríticas, uma vez que a análise dos espectros fornece informações acerca da caracterização e confirmação da estrutura dendrítica do material (GIAROLA, 2007). Os espectros foram obtidos pelo equipamento do modelo Spectrum 100, Perkin Elmer, por reflectância atenuada, com cristal de seleneto de zinco. As amostras foram colocadas diretamente sobre o cristal do aparelho. Foram realizadas 16 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} a temperatura ambiente. O intervalo de absorção foi de 4000 a 650 cm^{-1} . Todas as amostras foram analisadas sobre o cristal e a leitura do branco com mesma varredura e resolução.

2.3.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria foi obtida por equipamento METTLER TG-50, utilizando cadinho de porcelana. A temperatura de trabalho foi de 25 a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, gás nitrogênio como atmosfera à $30\text{ mL}/\text{min}$. Esses parâmetros coincidem para todas as amostras.

2.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas da calorimetria diferencial exploratória foram obtidas por equipamento DSC-60, SHIMADZU, utilizando o cadinho de alumina. As amostras foram de aproximadamente 5 mg e os testes realizados em temperatura de -100 à 180 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Todas as amostras foram inicialmente aquecidas e depois resfriadas na mesma velocidade (10°C) para eliminar a história térmica do material. Para a interpretação da Tg, considerou-se a segunda corrida do experimento. Os parâmetros foram os mesmos para todas as amostras.

2.4 Testes de hemocompatibilidade

Para avaliar a hemocompatibilidade dos fármacos, dendrímeros e dos fármacos associados aos dendrímeros foram realizados os seguintes testes *in vitro*: Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), Adesão Plaquetária e Hemólise.

Estes testes são sensíveis, reproduzíveis e quantificáveis e são utilizados para verificar a compatibilidade do sangue com fármacos e novos materiais. Apresentam como vantagem a obtenção de informações do comportamento biológico em curto período de tempo, sem a necessidade de uso de animais de experimentação (GARCIA et al., 2009). Inicialmente foram feitos os cálculos para o preparo das soluções e diluições dos fármacos em solução salina (0,9%) estéril para a realização dos testes. As soluções dos dendrímeros e dendrímeros associados com os fármacos passaram por um processo de liofilização para retirada de água. Para realizar os estudos de ativação da coagulação do plasma foram utilizadas concentrações dos fármacos iguais às encontradas no plasma de pacientes tratados com prednisona, meloxicam e metotrexato com artrite reumatoide. Dessa forma, as soluções foram preparadas como segue:

- Após dose oral única de 7,5 mg de Meloxicam a concentração máxima de Meloxicam plasmática varia entre 0,4 a 1,0 $\mu\text{G/mL}$. Dessa forma, a concentração escolhida foi **1,0 $\mu\text{g/mL}$ de Meloxicam** nos ensaios de coagulação *in vitro* (BULÁRIO ANVISA);
- Após injeção subcutânea única de 7,5 mg de Metotrexato a concentração máxima de Metotrexato plasmática é de $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Dessa forma, a concentração de **1,3 μM de Metotrexato** foi utilizada nos ensaios de coagulação *in vitro* (GOODMAN 2004);
- Após dose oral única de 10 mg de Prednisona a concentração máxima de Prednisona plasmática varia entre 62 e 81 nG/mL . Dessa forma, a concentração de **80 ng/mL de Prednisona** foi utilizada nos ensaios de coagulação *in vitro* (GOODMAN 2004).

2.4.1 Tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Para avaliar o Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) foi utilizado um equipamento analisador de coagulação microprocessado (STAR 4STAGO) e plasma sanguíneo na presença de reagentes comerciais de acordo com o ensaio realizado. Para a realização dos testes foi coletado sangue de indivíduo saudável em anticoagulante citrato de sódio 0,38% na proporção de nove (09) partes de sangue para uma (01) de anticoagulante em tubos de ensaio. Os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos para separar o plasma das células sanguíneas.

2.4.2 Tempo de protrombina (TP)

No teste TP, na cubeta com o volume máximo de 350 μL foi adicionado 100 μL de plasma, 50 μL de solução salina (controle) seguida de incubação a 37°C por 3 minutos. Após este procedimento foram adicionados 200 μL do reagente (cefalina + ácido elágico) e o tempo necessário para ocorrer a formação do coágulo foi registrado. Nos testes com os fármacos, dendrímeros PGLD e conjugados PGLD-fármacos foram adicionados a cubeta 100 μL do plasma, 50 μL do fármaco, dendrímero ou conjugado PGLD-fármaco que foram previamente diluídos em solução salina (0,9%), com a

concentração do fármaco igual à efetiva na circulação sanguínea (descrito anteriormente no item 2.4) e incubada a 37°C por 3 minutos. Posteriormente foram adicionados 200 µL do reagente (cefalina + ácido elágico) e o tempo necessário para ocorrer a coagulação foi registrado. Após a obtenção dos valores de TP o equipamento fornece automaticamente a correlação para obter os dados referente ao INR. Os valores de referência do TP variam de 11 a 15 segundos e o INR entre 0,9 e 1,2 (TERRA, 2004). Os valores para os três grupos foram anotados e comparados com os valores de referência para indivíduos normais.

2.4.3 Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Para TTPA foram adicionados na cubeta 100µL do plasma, 100µL de cefalina +ácido elágico e 50µL de solução salina (controle), fármacos, dendrímeros PGLD e conjugados PGLD-fármacos. Após este procedimento as cubetas foram incubadas a 37°C por 3 minutos seguido da adição de 100 µL de cloreto de cálcio. Foi feita a leitura dos tempos e os resultados comparados com os valores de referência de indivíduos normais. Os valores de referência são 30-45 segundos (TERRA, 2004). Para valores anormais, consideram-se tempos maiores ou ainda menores de 6 segundos dos valores de referência.

2.4.4 Adesão plaquetária

A adesão plaquetária foi avaliada utilizando equipamento COULTER (modelo T890) que faz a contagem automatizada das plaquetas no sangue por bioimpedância. Para a realização deste ensaio o sangue foi coletado em sistema para coleta a vácuo de indivíduos saudáveis em tubos de ensaio contendo anticoagulante EDTA. Essa técnica foi descrita em 1956 por Wallace Coulter e baseia-se no fato dos glóbulos vermelhos, leucócitos e plaquetas serem pobres condutores de eletricidade, enquanto os diluentes são bons condutores. Essa diferença é à base desse sistema de contagem. Tem-se dois

eletrodos de platina mergulhados e separados por um orifício que varia de 60 a 100 micrometros de diâmetro, um no interior do aparelho e o outro no líquido que contém as partículas que serão contadas. Esse sistema permite que cada partícula que passe pelo orifício desloque o volume do líquido, modificando a impedância do sistema. Esses pulsos são amplificados e contados num volume de sangue predeterminado (BACAL, 2009).

2.4.5 Ensaio de hemólise

A hemotoxicidade *in vitro* foi avaliada utilizando a taxa de hemólise causada pelos fármacos, dendrímeros, e dendrímeros associados aos fármacos às hemácias humanas. O teste foi realizado de acordo com (KHURANA et al., 2013). O sangue foi coletado de voluntários saudáveis com anticoagulante citrato de sódio 0,38% na proporção de nove (09) partes de sangue para uma (01) de anticoagulante em tubos de ensaio. O sangue foi posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Os eritrócitos (sedimento) foram lavados em solução salina (0,9%) por 3 vezes para remoção de debris e diluídos em PBS (Phosphate-buffered saline pH=7,4) com uma concentração final de 2% v/v (solução de uso). As amostras a serem testadas (fármacos, dendrímeros e dendrímeros + fármacos) foram diluídas em PBS (pH=7,4) em três concentrações sanguíneas diferentes dos fármacos. Como controle negativo foi utilizado PBS (pH=7,4) e como controle positivo solução de saponina a 2mg/mL. Foram adicionados 100µL da suspensão de eritrócitos a 1 mL de cada amostra a ser testada e seguidas de incubação a 37°C por 1 hora. Após a incubação a mistura foi centrifugada a 1500g por 10 minutos. O sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro (MICROLAB 100, MERC) em um comprimento de onda de 546 nm.

Capítulo3
RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As figuras apresentadas a seguir mostram as bandas de absorção de FTIR relativas às vibrações das ligações químicas características dos dendrímeros (Figura 3.1), dos fármacos puros (Figuras 3.3, 3.5 e 3.7) e dos fármacos associados aos dendrímeros G2 e G4 (Figuras 3.8-3.13). As bandas de absorção dos fármacos Metotrexato e Prednisona, associados aos dendrímeros G2 e G4, são de baixa intensidade, provavelmente devido à baixa concentração do fármaco quando comparado com a quantidade de dendrímero (razão dendrímero: fármaco de aproximadamente 20:1). Nos espectros de FTIR dos dendrímeros G2 e G4 associados com os fármacos Meloxicam não foram observadas as bandas características do fármaco devido à sua reduzida concentração quando comparado com a quantidade de dendrímero (razão dendrímero: fármaco aproximadamente de 302:1 para o G2:fármaco e 228:1 para G4:fármaco).

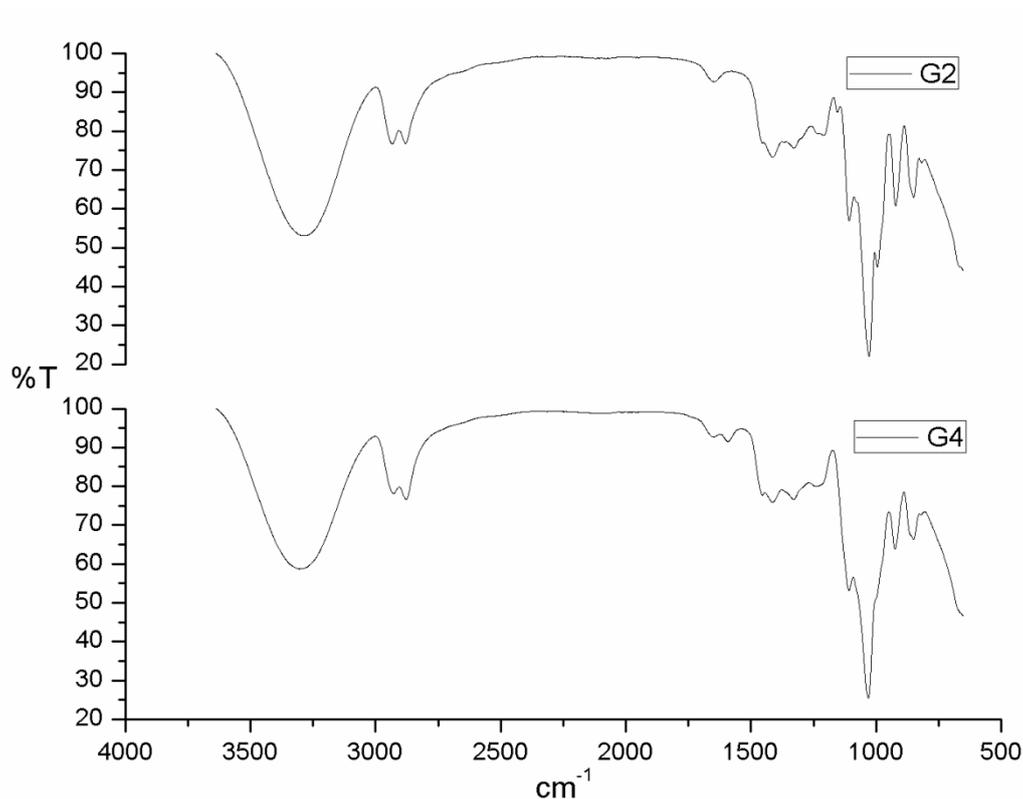


Figura 3.1 Espectro do FTIR dos dendrímeros G2 e G4

De acordo com a figura 3.1 observa-se que os dendrímeros puros de PGLD, tanto de segunda geração (G2) como de quarta geração (G4), apresentaram vibrações importantes características de poliéteres. Entre 3590- 3200 cm^{-1} , a banda corresponde a vibrações de ligações O-H terminais, as bandas entre 3000-2850 cm^{-1} correspondem a vibrações assimétricas de CH e entre 1300-1000 cm^{-1} equivale a estiramento e deformação axial de C-O (GIAROLA, 2007).

A estrutura química da prednisona e seu espectro de infravermelho estão representados nas figuras 3.2 e 3.3, respectivamente.

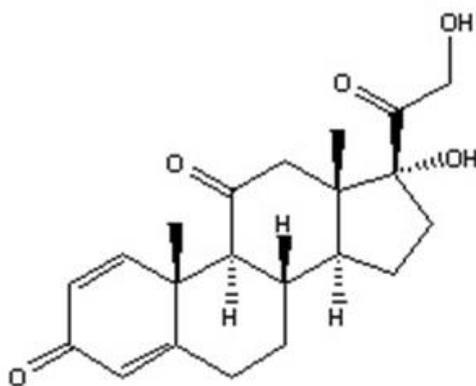
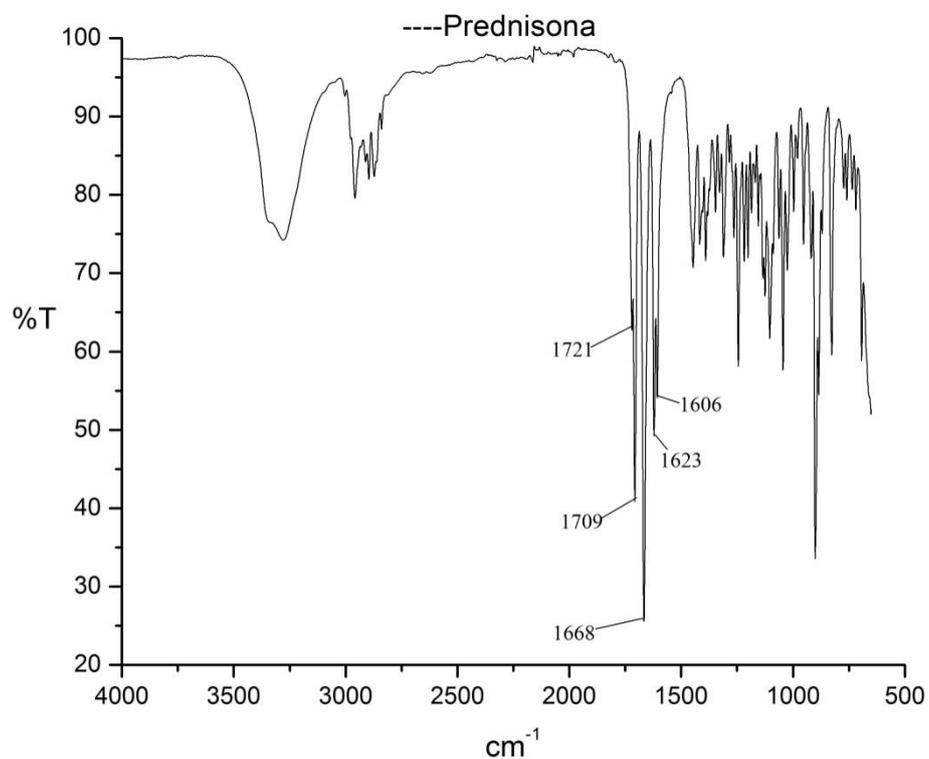


Figura 3.2 Estrutura química da prednisona**Figura 3.3** Espectro do FTIR de Prednisona

No espectro de FTIR do fármaco prednisona (Figura 3.3) observa-se, entre 3590- 3200 cm^{-1} , a banda de vibração de estiramento da ligação O-H, aproximadamente em 2957 cm^{-1} aparecem vibrações correspondentes ao estiramento das ligações C-H, relativas a $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$. O espectro FTIR mostra também duas bandas características de C=C em 1606 cm^{-1} e 1623 cm^{-1} e três bandas características de ligações C=O em 1721, 1709 e 1668 cm^{-1} . Abaixo de 1000 cm^{-1} tem-se a deformação angular de C-H (LI et al, 2009; TOEHWÉ, 2013).

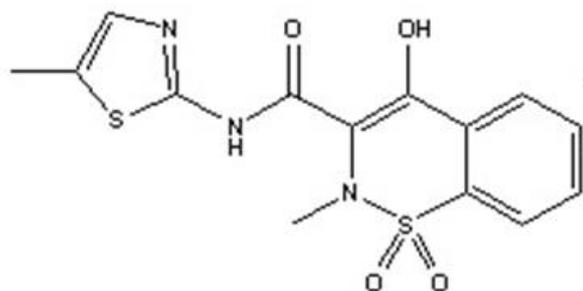


Figura 3.4 Estrutura química do meloxicam

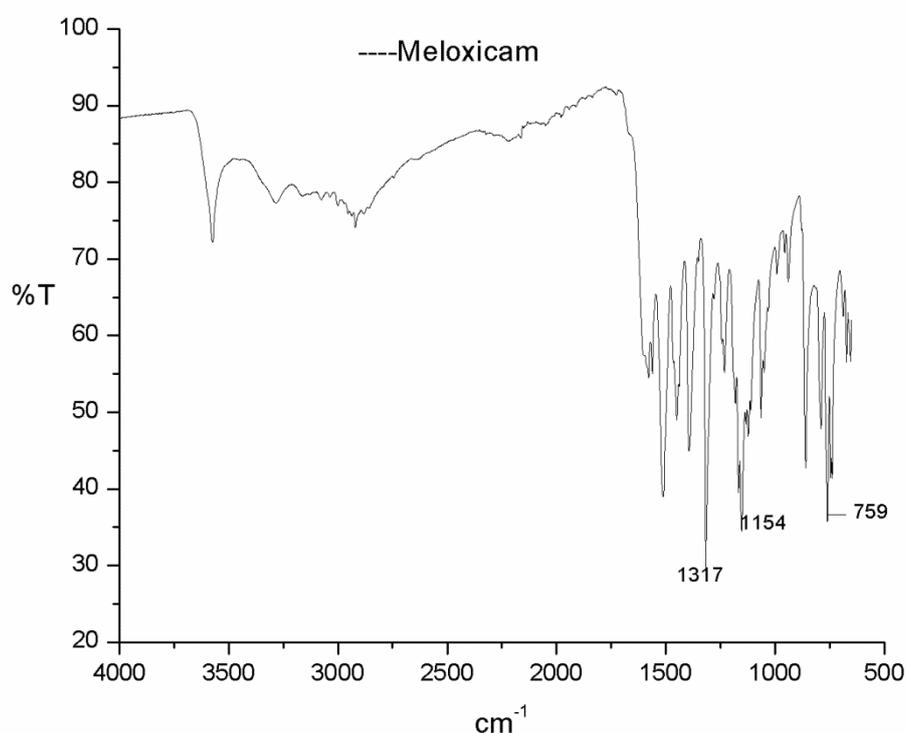


Figura 3.5 Espectro do FTIR do Meloxicam

A figura 3.5 representa o espectro FTIR do fármaco Meloxicam puro. A banda de vibração próxima a 3500 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação N-H, a banda próxima a 3250 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento da ligação O-H. A vibração de estiramento da ligação C=O é observada próxima a 1700 cm^{-1} . Em 1317 cm^{-1} se observa a absorção relativa à vibração da ligação C-N do fármaco. A banda de absorção em 1154 cm^{-1} é atribuída às vibrações simétricas de S=O, a banda em 759 cm^{-1} é atribuída à vibração da ligação C-S (SHENDE et al, 2015).

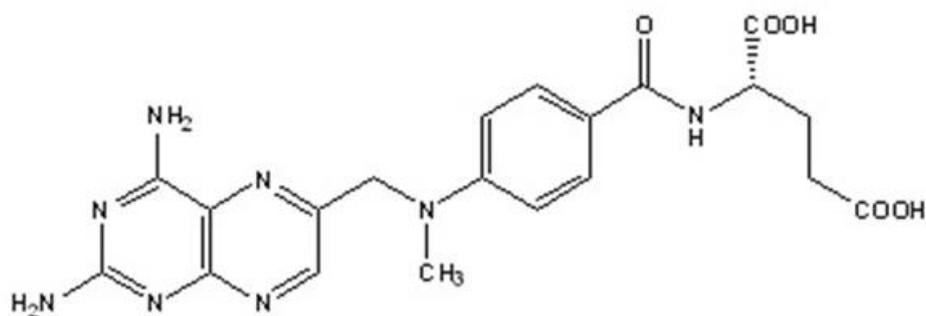


Figura 3.6 Estrutura química do metotrexato

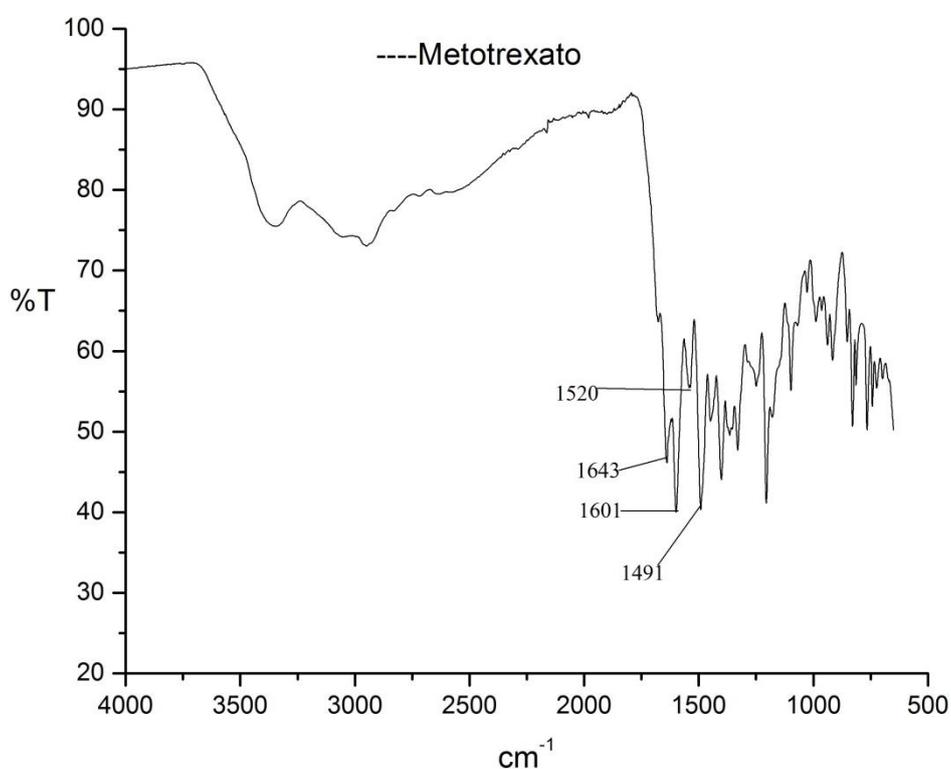


Figura 3.7 Espectro do FTIR de Metotrexato

O Espectro FTIR do fármaco metotrexato puro (Figura 3.7) apresenta as seguintes bandas: a banda entre $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ atribuída à vibração da ligação de N-H, uma banda larga de $3300\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ relativa ao grupamento O-H do ácido carboxílico e uma banda em 1643 cm^{-1} relativa à vibração C=O. O anel aromático caracteriza-se por três bandas em 1491 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} e 1601 cm^{-1} .

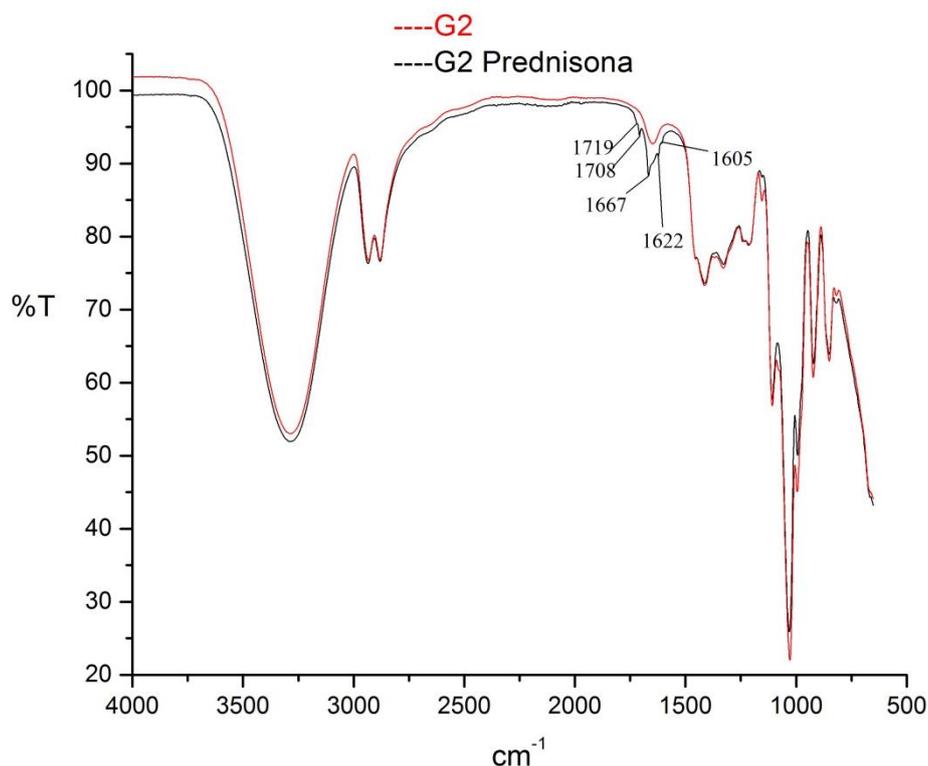


Figura 3.8 Espectro do FTIR de prednisona associado ao dendrímero G2

A figura 3.8 mostra o espectro FTIR do fármaco prednisona associado ao PGLD de segunda geração (G2). Podemos conferir no espectro FTIR que as bandas de vibrações em 1721 cm^{-1} , 1709 cm^{-1} , 1668 cm^{-1} , que correspondem a ligações de C=O da prednisona não sofreram alteração na associação do fármaco com o dendrímero. (LEONARDI et al, 2007). O perfil do espectro FTIR do G2 permaneceu após a associação.

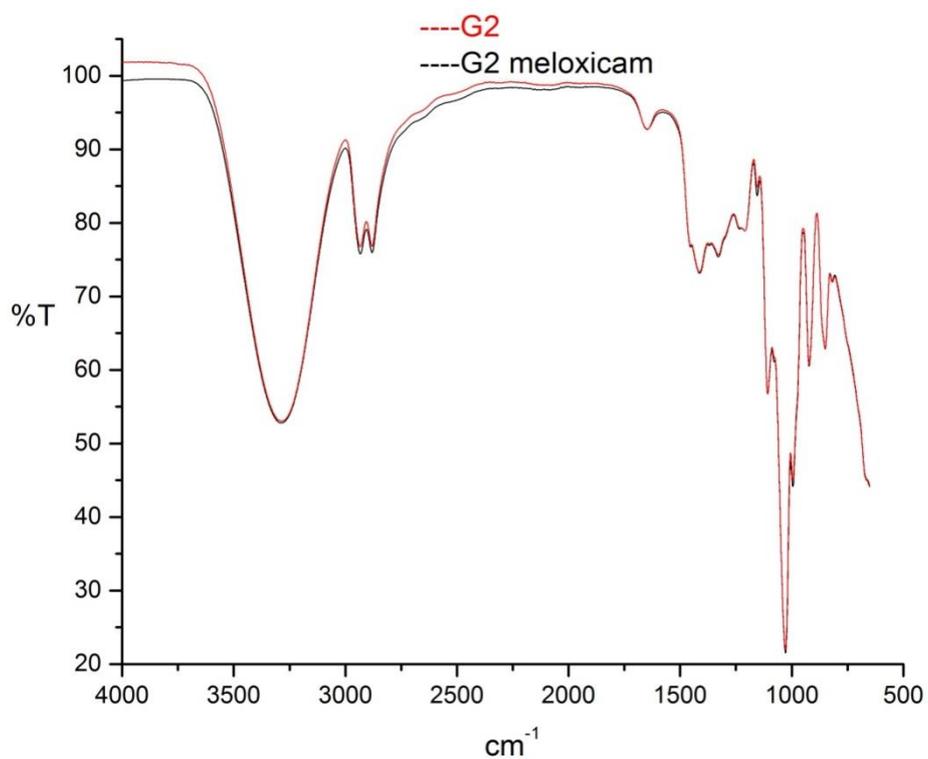


Figura 3.9 Espectro do FTIR da meloxicam associado ao dendrímero G2

A figura 3.9 mostra o espectro FTIR do meloxicam associado ao dendrímero G2. Não são observadas diferenças entre o espectro do dendrímero puro e o dendrímero contendo o fármaco. As bandas de absorção das vibrações características do meloxicam não foram observadas no espectro FITR devido à baixa concentração do fármaco.

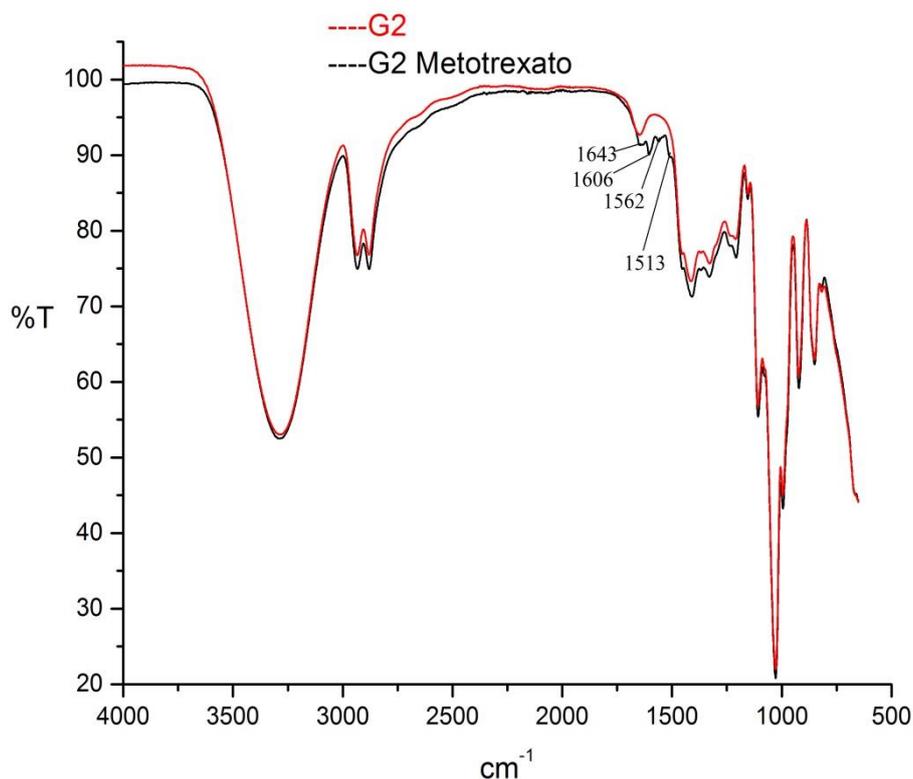


Figura 3.10 Espectro do FTIR do metotrexato associado ao dendrímero G2

A figura 3.10 mostra o FTIR do metotrexato associado ao dendrímero G2. No espectro do dendrímero contendo o metotrexato encontramos as bandas de vibração do fármaco em 1643 cm^{-1} , que corresponde à ligação C=O, e as vibrações correspondentes ao anel aromático (1513 , 1562 e 1606 cm^{-1}) que no fármaco puro, aparecem em menores valores de número de onda (1491 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} e 1601 cm^{-1} , respectivamente). O deslocamento das bandas de vibração deve estar associado à interação entre o fármaco e o dendrímero G2. Esta interação é confirmada no ligeiro deslocamento das bandas de vibração da ligação C-O do dendrímero, entre $1300 - 1000\text{ cm}^{-1}$.

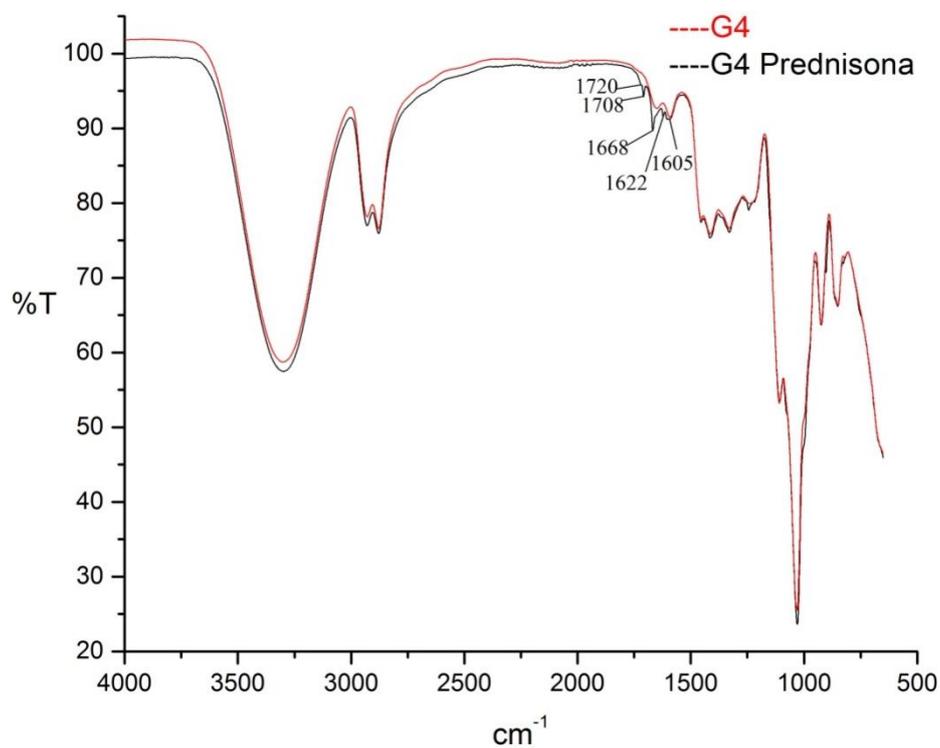


Figura 3.11 Espectro de FTIR de prednisona associado ao dendrímero G2

A seguir discutimos os espectros de FTIR dos fármacos associados no dendrímero G4. A figura 3.11 mostra o espectro FTIR da prednisona imobilizada no dendrímero G4. Semelhante aos resultados obtidos para o dendrímero G2 as bandas de absorção de vibração características do fármaco não mudaram com relação ao espectro de FTIR do fármaco puro.

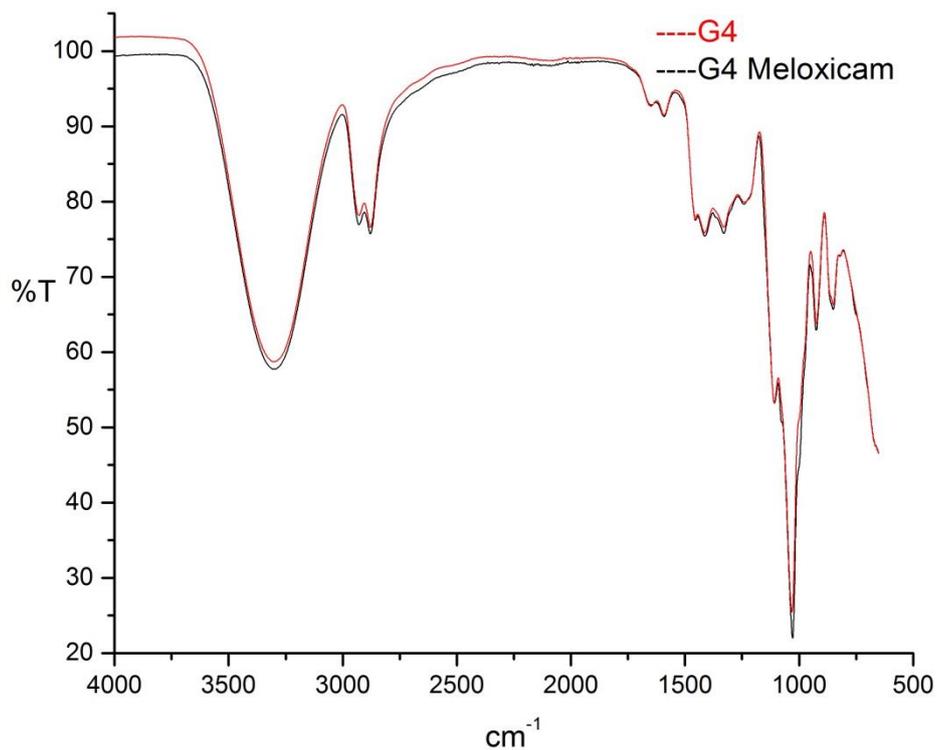


Figura 3.12 Espectro de FTIR de meloxicam associado ao dendrímero G4

A figura 3.12 mostra o espectro FTIR do fármaco meloxicam associado no dendrímero G4. Assim como no dendrímero G2 não foram observadas mudanças no espectro FTIR do dendrímero G4 associado quando comparado com o dendrímero G4 puro.

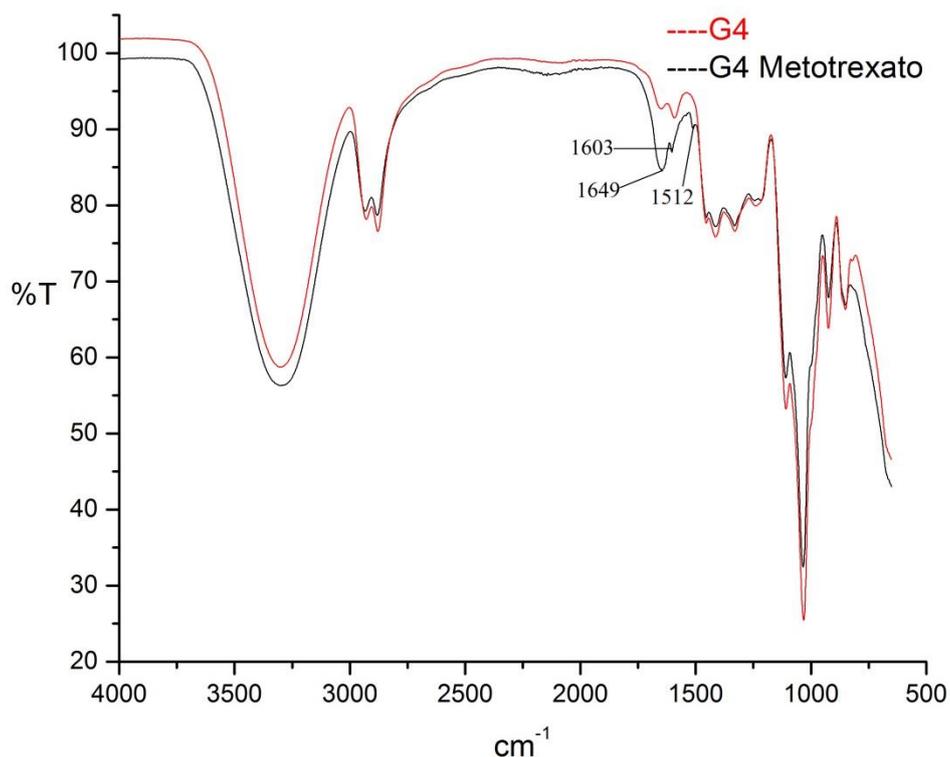


Figura 3.13 Espectro de FTIR de metotrexato associado ao dendrímero G4

A figura 3.13 mostra o espectro FTIR do fármaco metotrexato associado no dendrímero G4. No espectro a banda de absorção da ligação C=O do fármaco aparece sobreposta à banda de absorção do G4 nesta região. A banda de absorção em 1520 cm⁻¹, de pequena intensidade, pode ser atribuída ao fármaco como pode ser conferido no espectro FTIR do metotrexato puro (Figura 3.7).

3.2 Análise termogravimétrica (TGA)

O PGLD apresenta grupos OH tanto na periferia (primários), como no interior (secundários) da macromolécula. A densidade dos grupos OH secundários aumenta proporcionalmente ao número de geração do PGLD, resultando em um maior número de ligações de hidrogênio intramolecular, o que poderia conferir maior estabilidade térmica a estrutura dendrítica (CARNEIRO, 2014). Os resultados da análise termogravimétrica dos dendrímeros puros, fármacos puros e fármacos associados aos dendrímeros são apresentados e discutidos a seguir:

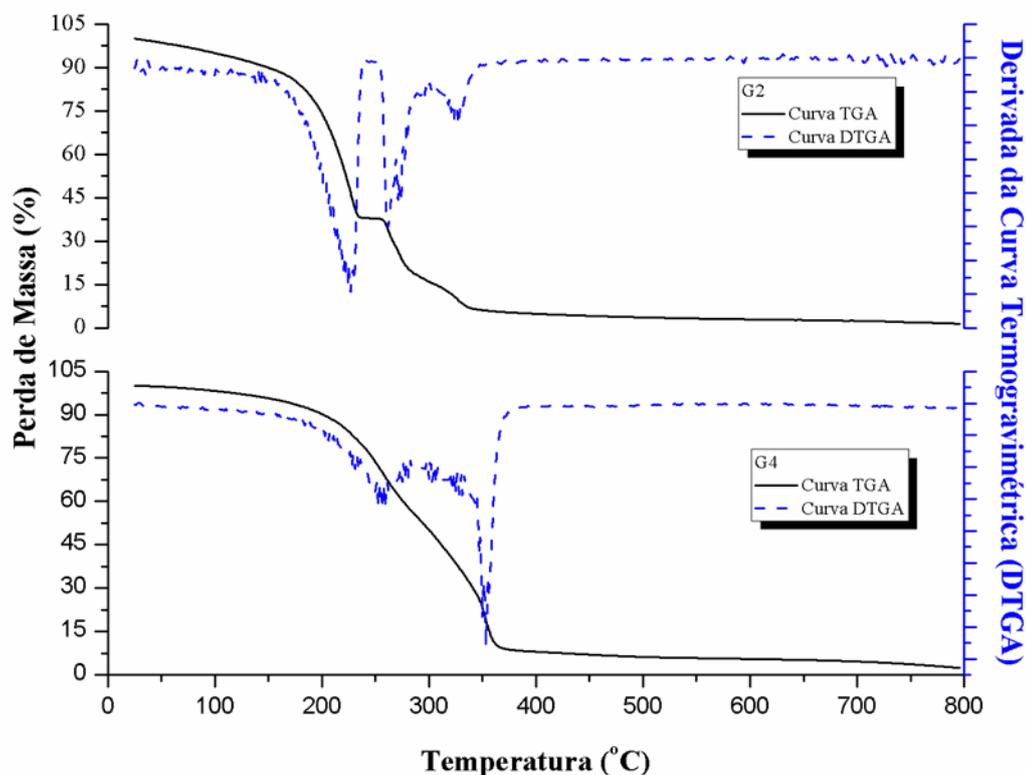


Figura 3.14 Curvas termogravimétricas de G2 e G4 puros

A figura 3.14 mostra que existe um aumento da estabilidade térmica do PGLD, uma diminuição no número de etapas de decomposição e um maior teor de resíduo (material não degradado) à medida que aumenta o número de gerações da macromolécula de G2 a G4. O dendrímero G2 permanece estável até aproximadamente 74°C. A partir dessa temperatura apresenta perda de cerca de 65% da massa inicial até 233°C, com maior velocidade de perda em 227°C como mostra o pico da curva de DTGA. Analisando a curva termogravimétrica, observamos que permanece estável até 256°C, onde se inicia uma nova perda com velocidade máxima em 262°C que se estende até 340°C onde se tem uma perda de aproximadamente 33% da massa e um resíduo de 2% ao final do experimento.

Observamos na curva termogravimétrica do dendrímero G4 que este mantém sua estabilidade térmica até aproximadamente 126°C, a partir daí perde 92% da massa inicial

até 380°C apresentando dois eventos com velocidades máximas de perda em 256°C e 353°C como mostram os picos da curva de DTGA. Finalmente, observamos que a curva de TGA do dendrímero G4 apresenta um resíduo de 8% estável até 800°C.

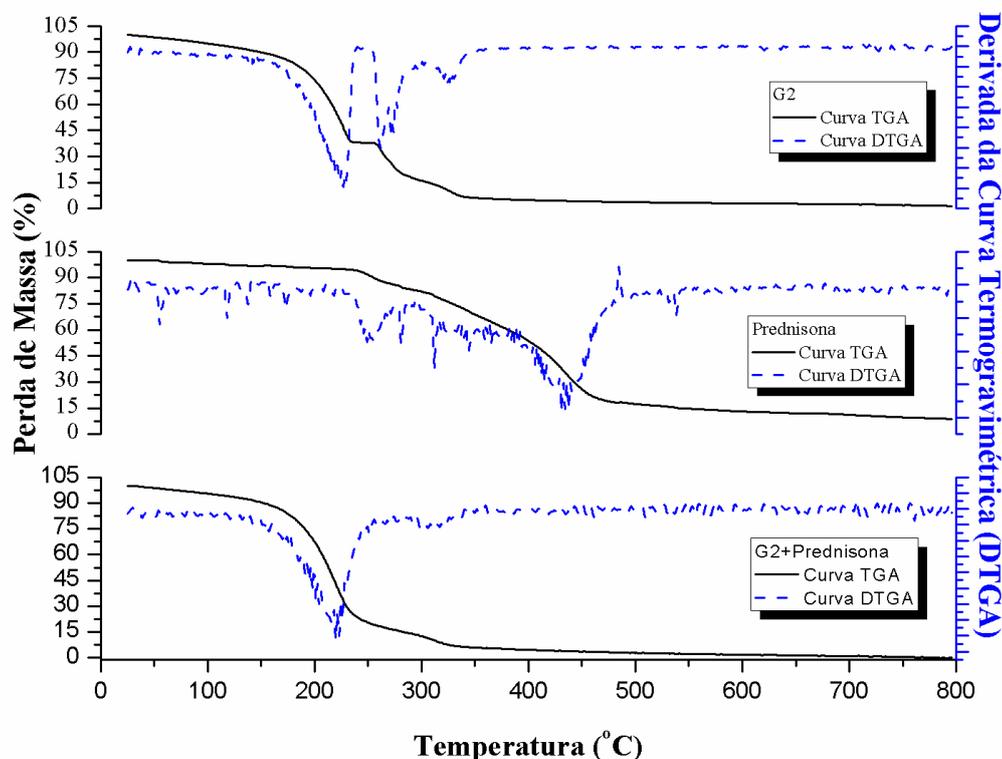


Figura 3.15 Curvas termogravimétricas de G2 puro, prednisona pura e prednisona associada ao G2.

Na curva TGA da Prednisona pura (Figura 3.15), observamos que esta permanece estável até aproximadamente 250°C, onde começa sua degradação. A curva mostra que até 505°C a amostra perde 92,5% de sua massa inicial, ficando um resíduo de 7,5% até 800°C. A curva termogravimétrica do dendrímero G2 associado com a prednisona inicia sua perda de massa em 85°C, sendo mais estável quando comparado a G2 puro (74°C). Também se observa que o perfil da curva de degradação muda significativamente, pois, a degradação do dendrímero G2 puro que acontecia em três estágios, ocorre quase completamente até 250°C, apresentando um evento importante com velocidade máxima de perda de massa em 220°C, como mostra o pico da curva DTGA. A segunda etapa de degradação aparece na mesma faixa de temperatura do G2 puro, entre 250°C e 350°C. Finalmente a curva termogravimétrica da prednisona associada ao G2 mostra que até 800°C a degradação é completa, pois não há resíduo. Os resultados obtidos sugerem que

existe uma forte interação entre a prednisona e o G2. Podemos concluir que a prednisona influencia consideravelmente o mecanismo de degradação do dendrímero G2. A degradação da prednisona associada ao G2 não é observada de maneira independente na curva termogravimétrica devido à sua baixa concentração.

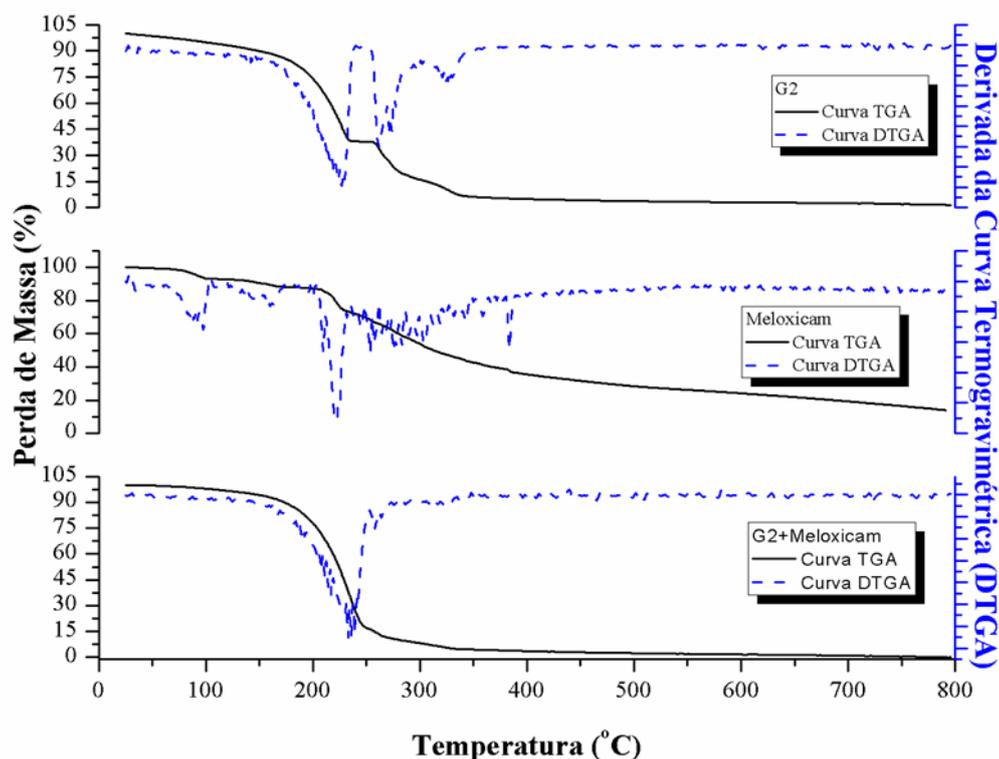


Figura 3.16 Curvas termogravimétricas de G2 puro, meloxicam puro e meloxicam associado ao G2.

A análise termogravimétrica do meloxicam puro mostra estabilidade térmica até 70°C, a partir daí ocorre perda de 10% da massa inicial até 100°C, provavelmente pela perda de água da molécula. Esse evento apresenta maior velocidade de perda em 98°C, visualizado através do pico da curva DTGA. Após a primeira perda de massa a curva de TGA apresenta uma estabilidade até 207°C, quando se inicia uma perda que vai até 400°C correspondendo a 60% da massa. Finalmente, o meloxicam continua degradando até 800°C e perde 20% de massa, ficando um resíduo de 10% a 800°C. A curva termogravimétrica do meloxicam associado com o G2 mostra um perfil de degradação semelhante ao da prednisona associada ao G2. Porém, podemos afirmar que o meloxicam

confere uma maior estabilidade, pois a temperatura que corresponde a maior velocidade de perda de massa é mais alta para a associação com meloxicam (240°C) do que para a associação com prednisona (220°C). Pode-se dizer que existe uma forte interação entre o meloxicam e o G2 que se manifesta na maior estabilidade térmica da associação quando comparado com G2 puro. A estrutura química de ambos os fármacos apresentam grupos estabilizadores de radicais livres, o que poderia explicar a estabilidade que ambos conferem ao G2.

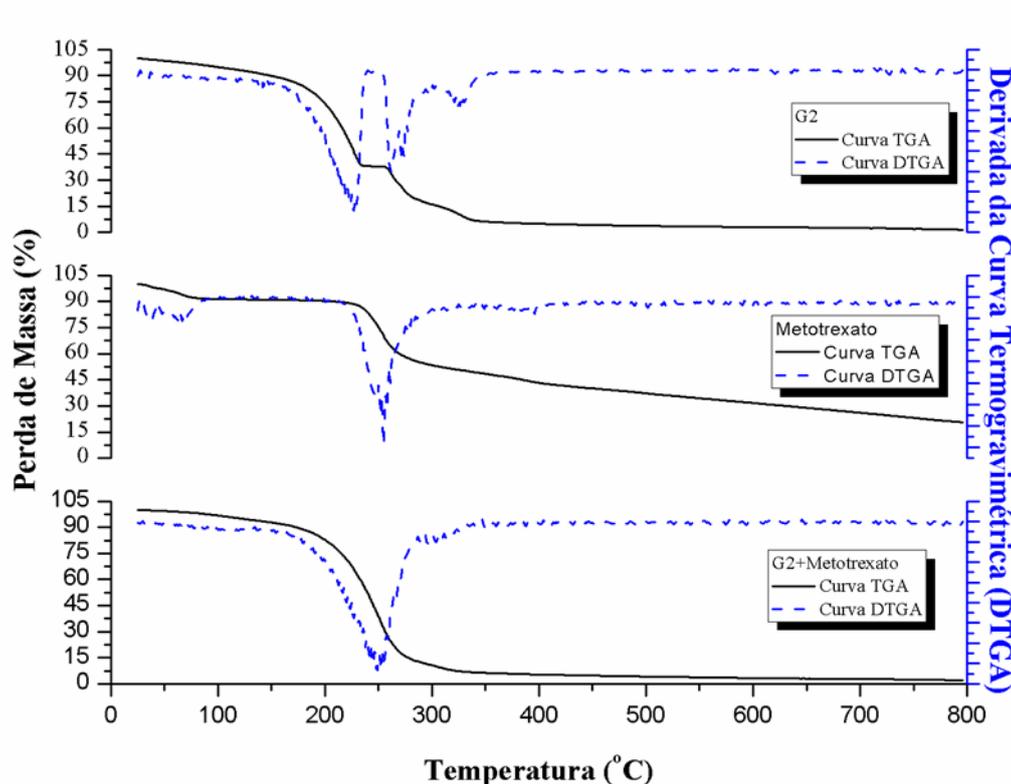


Figura 3.17 Curvas termogravimétricas de G2 puro, metotrexato puro e do metotrexato associado ao G2.

Na figura 3.17 se observa que o metotrexato puro tem uma perda de massa de 10% referente à perda de água da molécula até 70°C. Depois manteve certa estabilidade até 250°C, onde teve início sua maior perda de massa, com maior velocidade em 256°C. Até 500°C se observa uma perda de 60% da massa inicial, após esta temperatura a degradação continua até 800°C, perdendo-se aproximadamente um 77,5% da massa inicial. A 800°C a curva de TGA mostra um resíduo de 22,5%. Quando o fármaco metotrexato é associado ao G2 se observa um comportamento semelhante ao observado com os fármacos anteriormente estudados. Porém, pela análise da curva termogravimétrica podemos

afirmar que a estabilização térmica do G2 na presença do metotrexato é ainda maior que a observada com os outros fármacos. A curva DTGA mostra uma maior velocidade de degradação a uma temperatura mais alta, aproximadamente em 250°C.

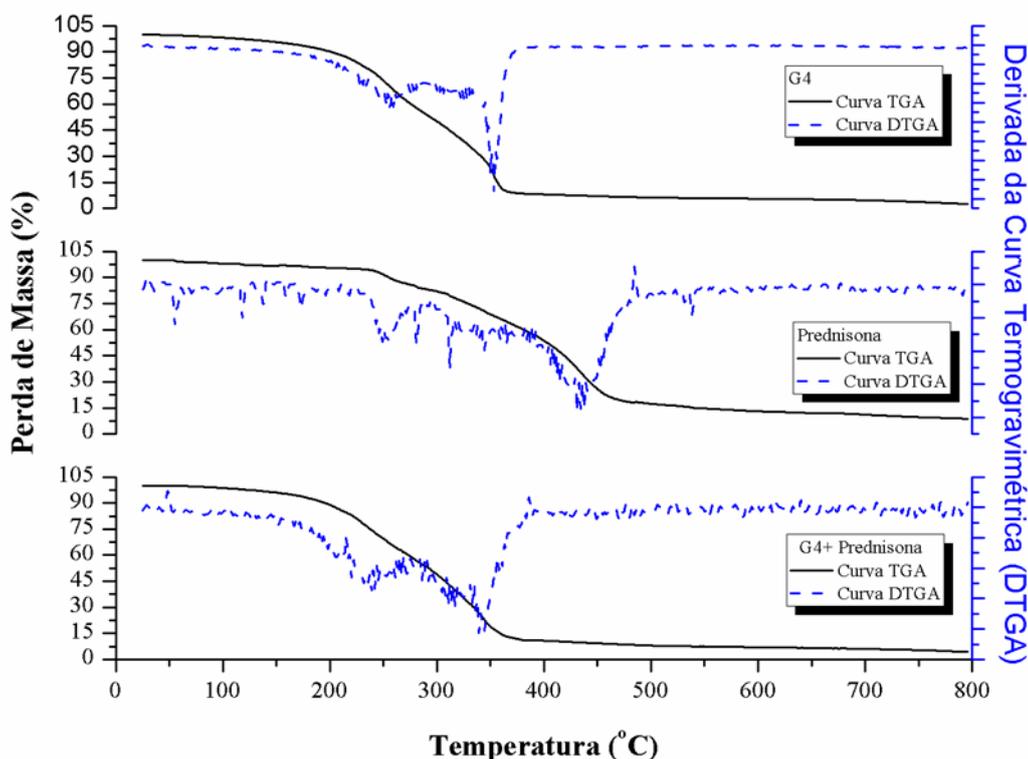


Figura 3.18 Curvas termogravimétricas de G4 puro, prednisona pura e a prednisona associada ao G4.

Como tínhamos concluído anteriormente o dendrímero G4 apresenta maior estabilidade térmica se comparado ao G2. Isto é explicado pela maior densidade de grupos OH secundários, no G4, que aumentam a interação intramolecular. Esta maior interação deve também ser a causa da menor associação do fármaco prednisona na matriz do dendrímero. Pois a curva termogravimétrica da prednisona associada ao G4, como mostra a Figura 18, não muda significativamente o perfil de degradação do dendrímero G4 puro.

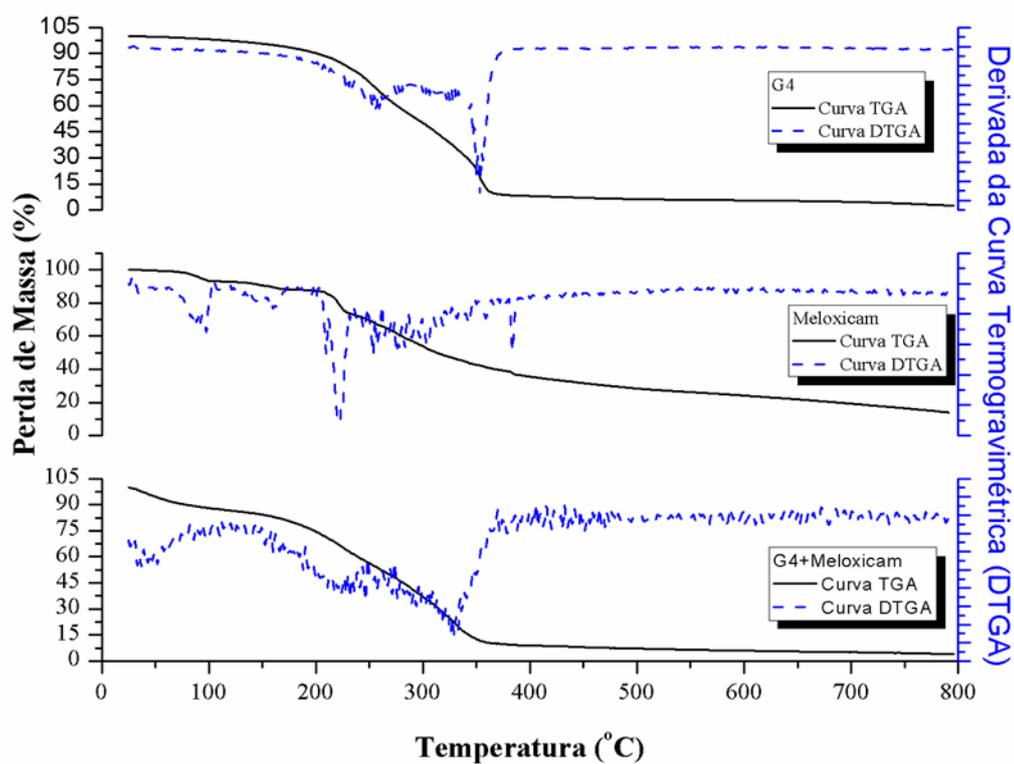


Figura 3.19 Curvas termogravimétricas de G4 puro, meloxicam puro e o meloxicam associado ao G4.

A figura 3.19 mostra a curva termogravimétrica do meloxicam associado com o G4. A curva de TGA mostra um perfil de degradação semelhante ao da prednisona associada ao G4, indicando que a presença do meloxicam não influencia na degradação térmica do dendrímero G4.

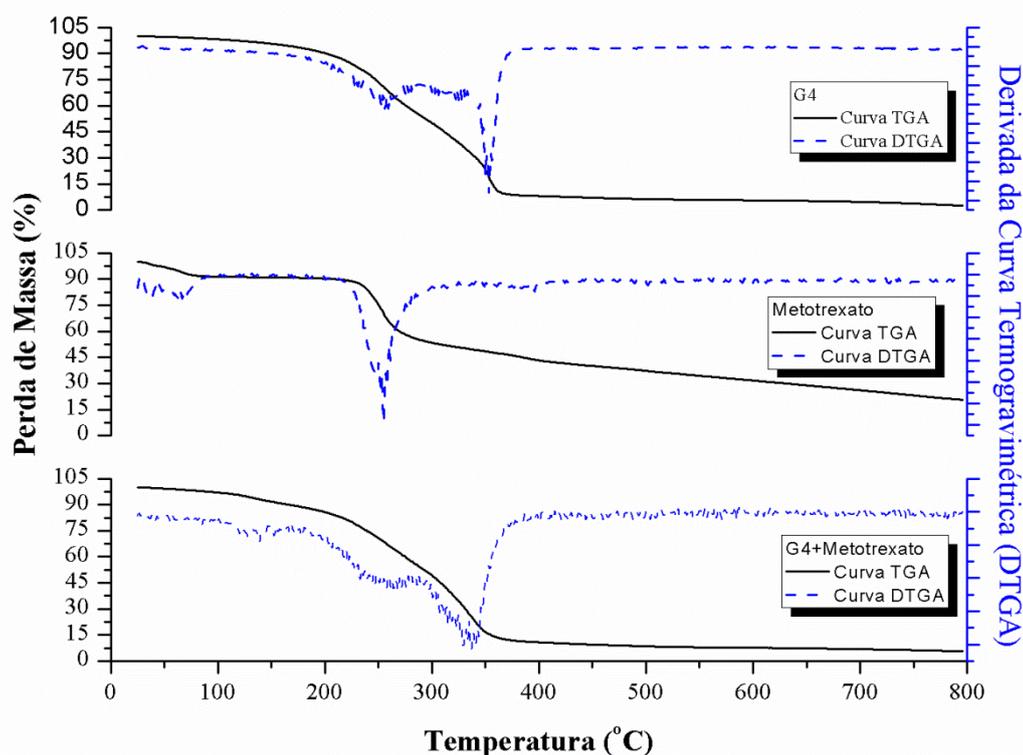


Figura 3.20 Curvas termogravimétricas de G4 puro, metotrexato e G4 associado ao metotrexato

A figura 3.20 apresenta os dados termogravimétricos do metotrexato associado ao dendrímero G4. Semelhante ao ocorrido com os fármacos anteriores pode-se concluir a partir da curva de TGA que o perfil de degradação do metotrexato associado ao G4 não muda quando comparado ao dendrímero G4 puro, sugerindo que o metotrexato não influencia na degradação térmica do dendrímero G4.

3.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A calorimetria diferencial exploratória é uma técnica de análise térmica que permite obter experimentalmente as temperaturas e o fluxo de calor associado com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo. Estas transições podem estar associadas a alterações físicas e químicas, como transição de fase de primeira ordem (fusão, cristalização) ou segunda ordem (transição vítrea - borrachosa) e reações químicas de reticulação, decomposição, desidratação ou dissociação (MOTHÉ, 2009).

Nesse trabalho, a análise DSC foi feita com o objetivo de encontrar a temperatura de transição vítrea (T_g) dos dendrímeros de poliglicerol e avaliar sua mudança após a associação do PGLD de segunda geração (G2) e quarta geração (G4) com os fármacos utilizados no estudo. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos a seguir:

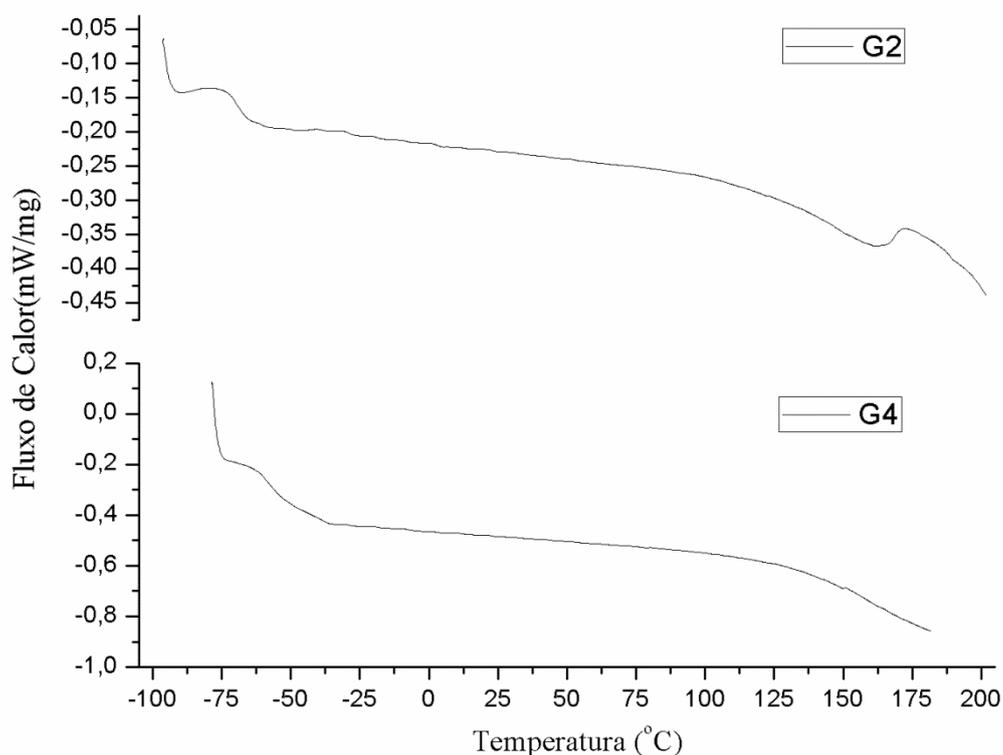


Figura 3.21 Curvas DSC normalizadas de segundo aquecimento de G2 e G4

A partir da figura 3.21 podemos obter os valores da temperatura de transição vítrea – borrachosa (T_g) dos dendrímeros puros. A T_g é uma transição endotérmica de segunda ordem que se caracteriza por uma mudança de inclinação na curva fluxo de calor versus temperatura, a T_g de G2 é de -69°C e a T_g de G4 é -55°C . Observamos que com o aumento do número de gerações da macromolécula ocorre um aumento significativo da T_g . Como tínhamos discutido na análise termogravimétrica, o aumento da geração acarreta o aumento da densidade de grupo OH secundários, aumentando assim a magnitude das interações intramoleculares e, portanto dificultando a mobilidade molecular da macromolécula. Assim a T_g (relacionada macroscopicamente com a

temperatura na qual a macromolécula passa de um estado vítreo a uma mobilidade restringida a segmentos de até 12 átomos de carbono) aumenta de acordo com o número de gerações do dendrímero (de G2 a G4), onde existe maior rigidez devido ao maior grau de interações intramoleculares.

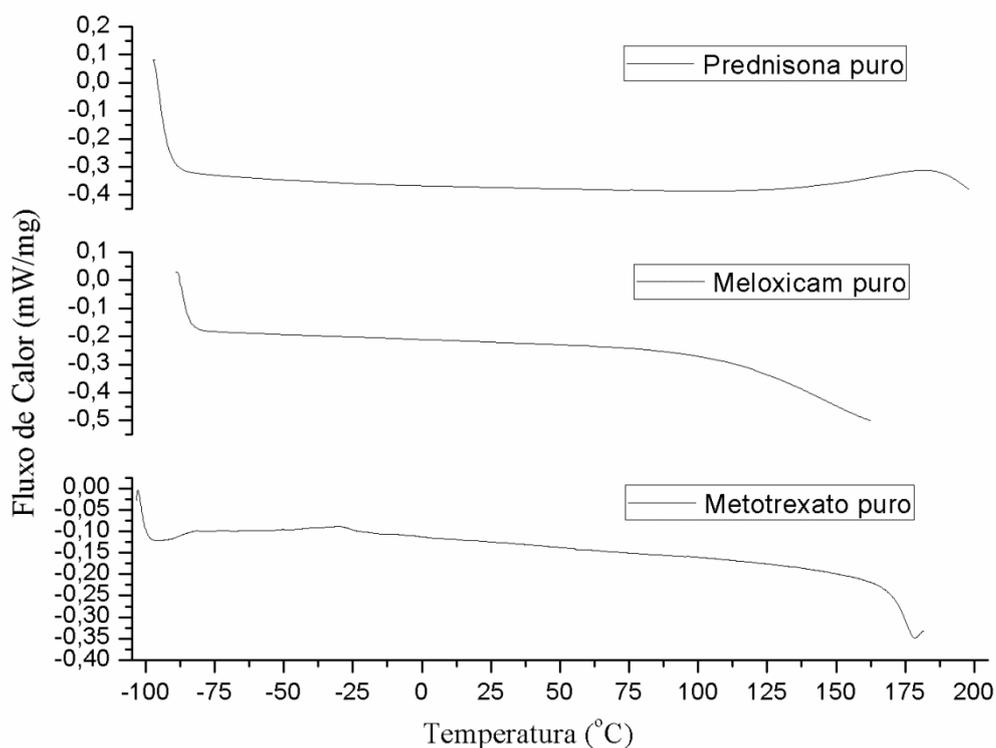


Figura 3.22 Curvas DSC normalizadas de segundo aquecimento dos fármacos puros

Os fármacos puros não apresentam temperatura de transição vítrea – borrachosa (T_g) por serem substâncias simples de baixa massa molecular. Mas como são substâncias cristalinas apresentam transição de primeira ordem, relacionada à fusão da fase cristalina (T_f). A T_f é uma transição endotérmica e se caracteriza por um pico na curva de fluxo de calor versus temperatura. As curvas de DSC da figura 3.22 foram conduzidas até 180°C para evitar a degradação dos fármacos e dos dendrímeros, que como foi observado nas curvas de TGA começa próximo a 200°C.

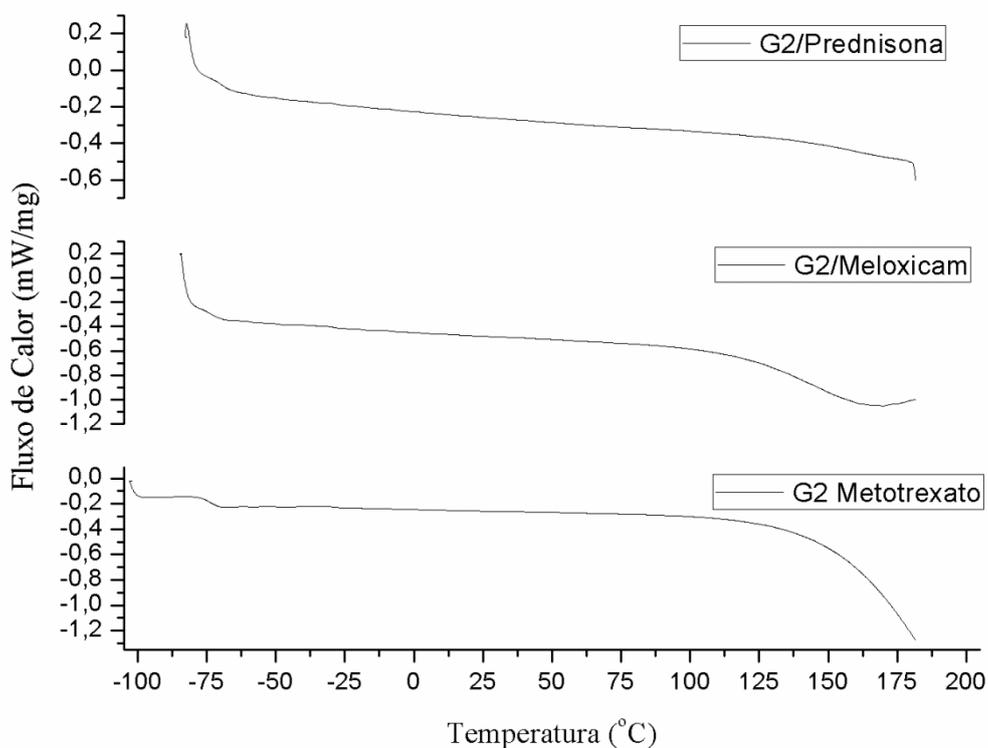


Figura 3.23 Curvas DSC normalizadas de segundo aquecimento dos fármacos associados ao G2.

A figura 3.23 apresenta as curvas de DSC dos compostos formados a partir da associação dos fármacos (prednisona, meloxicam e metotrexato) com o PGLD de segunda geração (G2). A transição vítrea – borrachosa é observada em todos os dendrímeros G2, podendo-se comprovar que independentemente do fármaco a T_g não muda de maneira significativa se comparado ao G2 puro. Isto sugere que no G2, estrutura com menor densidade de grupos OH secundários, a interação fármaco-G2 (comprovada por TGA) não afeta a mobilidade da cadeia macromolecular do G2.

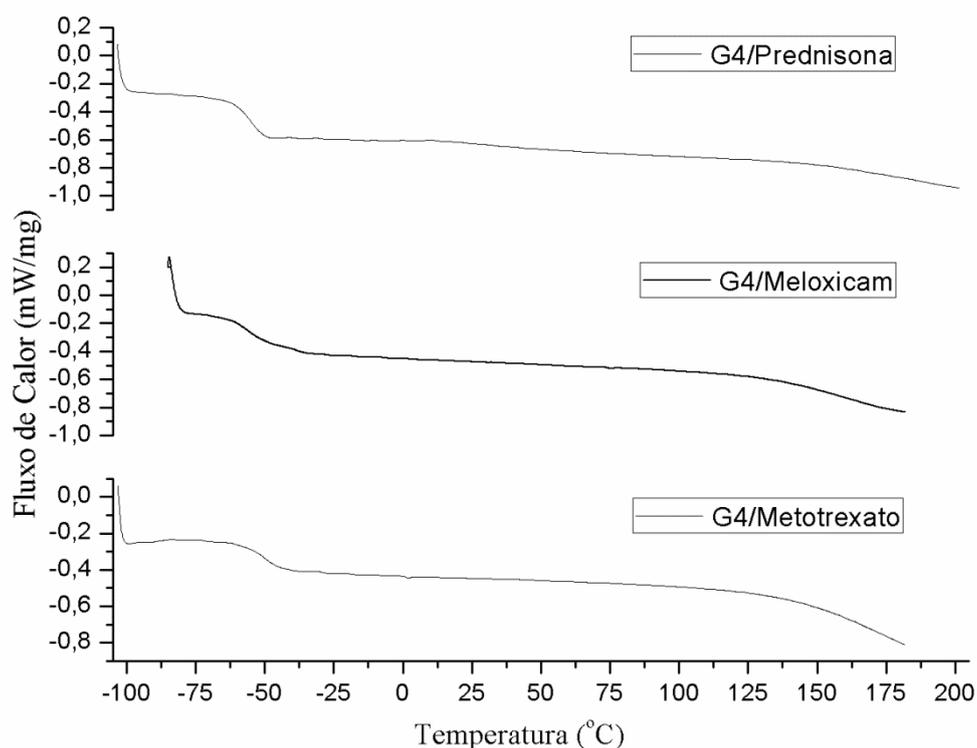


Figura 3.24 Curvas DSC normalizadas de segundo aquecimento dos fármacos associados ao G4

A partir da curva de DSC da figura 3.24, podemos concluir que a Tg do dendrímero G4 associado com os fármacos prednisona e meloxicam não muda significativamente, devido ao fato de que a interação que prevalece é a forte interação entre os OH secundários da matriz do dendrímero. Porém, um ligeiro aumento na Tg é observado na curva de DSC do dendrímero G4 associado ao fármaco metotrexato. A Tg aumenta de -55°C no G4 puro a -51°C no G4 contendo metotrexato. Não podemos atribuir este aumento de rigidez ao aumento na interação entre o fármaco e os grupos OH secundários (internos) da estrutura do G4, pois os resultados de TGA mostraram que os fármacos apresentam mais dificuldade de difundir para o interior do dendrímero quando aumenta a densidade de grupos OH de acordo com o aumento da geração (de G2 a G4). Mas, considerando que a Tg envolve mobilidade intra e intermolecular, podemos sugerir que nos dendrímeros de maior geração a interação favorecida é entre o fármaco e os grupos OH primários (exteriores) da estrutura dendrítica. Então, podemos concluir a partir dos resultados, que o dendrímero G4 interage com maior intensidade com o fármaco metotrexato, o que se manifesta em uma menor mobilidade do dendrímero e, portanto, um ligeiro aumento na Tg.

3.4 Hemocompatibilidade

A hemostasia é um processo multifuncional, complexo e de regulação finamente controlada, envolvendo a participação de diversos componentes fisiológicos celulares e acelulares, incluindo a parede vascular e a membrana basal, microfibrilas e colágeno, ativação plaquetária e as cascatas de coagulação da fibrinólise (BERGER et al., 2014). Avaliações da interação do material com o sangue indicam respostas biológicas relevantes como, por exemplo, a adesão e agregação plaquetária causadas pela adsorção de proteínas à superfície do material, que pode vir a ocasionar a formação de trombos (BRAUNE, 2011).

Estudos recentes sobre a hemocompatibilidade de polímeros epoxídicos demonstraram que esses materiais possuem boas propriedades de antitrombogenicidade e adequada ausência de citotoxicidade, sugerindo que tais materiais possuem propriedades biológicas favoráveis para aplicações de revestimentos em dispositivos cardiovasculares (GONZALES GARCIA et al., 2016).

3.4.1 Tempo de protrombina, INR e Tempo de tromboplastina parcial ativada

As hemácias, os leucócitos e as plaquetas podem ser profundamente afetados pelo contato com as superfícies dos dendrímeros sintéticos. Fenômenos como a adesão e a agregação plaquetária (que regulam a homeostasia e a coagulação) podem ser desencadeados, deprimindo significativamente a função das células sanguíneas.

A finalidade da coagulação sanguínea é formar um coágulo no local da lesão vascular. Além da formação do coágulo, que funciona como um tampão para evitar a hemorragia, esta ação pró-coagulante deve ser restrita ao local da lesão, ou seja, ela não pode disseminar-se pelo sistema circulatório. Assim, no momento em que ocorre a lesão vascular, também se desencadeia a ação do sistema fibrinolítico e dos inibidores fisiológicos da coagulação.

O modelo proposto por Macfarlane e Davie&Ratnoff, em 1964, da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue, usado ainda hoje por razões didáticas, divide a coagulação em uma via extrínseca e uma via intrínseca que

convergem no ponto de ativação do fator X (início da via final ou comum). O TP avalia a via extrínseca da coagulação, portanto avalia os fatores VII (via extrínseca) e X, V, II e I (via comum). O TTPA avalia a via intrínseca da coagulação, portanto avalia os fatores VIII, IX, XI e XII, bem como os fatores X, V, II e I da via comum. É o teste indicado, juntamente com o TP, quando há queixas hemorrágicas e nas rotinas pré-operatórias.

O resultado do Tempo de Protrombina é expresso em números de segundos levados desde a adição do reagente TP até a formação do coágulo de fibrina. No resultado pode-se incluir o Tempo de Protrombina (TP), e a Relação entre o Paciente e um Controle Normal (obtido pela determinação do TP de um plasma ou “pool” de plasma conhecidamente normal) e da Relação Internacional Normalizada ou INR da sigla em inglês “International Normalized Ratio”. O cálculo é feito da seguinte forma:

$$\text{INR} = \left[\frac{\text{TP do paciente}}{\text{TP do “pool” de plasmas normais do dia}} \right]^{\text{ISI}}$$

O INR deve sempre ser informado, especialmente em pacientes submetidos à terapia anticoagulante. Os valores de referência do TP são 11-15 s e INR entre 0,9 e 1,2.

O resultado do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado é expresso em números de segundos levados desde a adição do reagente Cloreto de Cálcio até a formação do coágulo de fibrina. Em geral, testes para TTPA com plasmas normais apresentarão tempos de formação do coágulo que variam de 30-45 segundos.

Foram realizados os ensaios de TP e TTPA com os fármacos puros, dendrímeros G2 e G4 puros e para as associações de fármacos com dendrímeros. Os resultados desses experimentos estão representados abaixo:

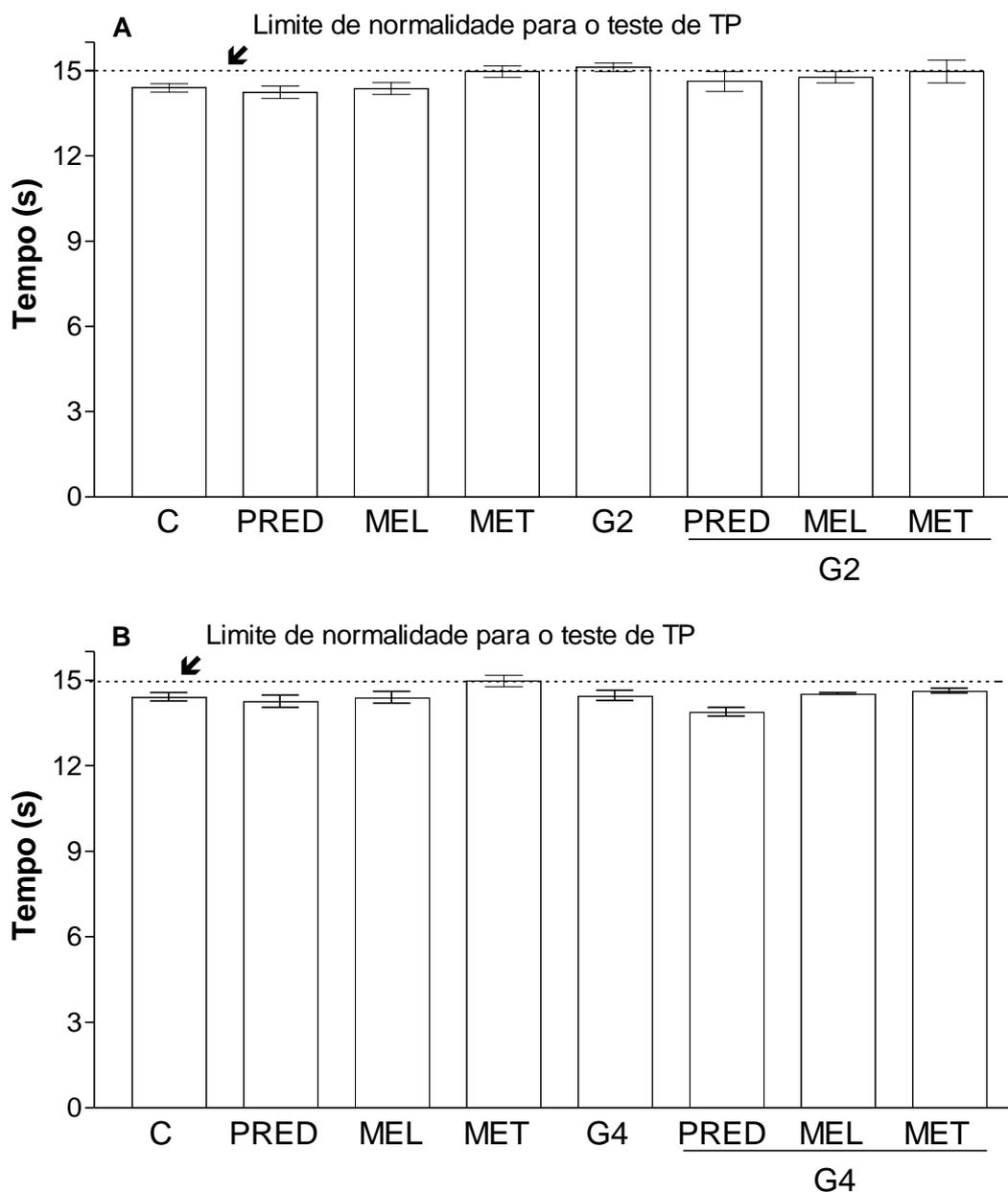


Figura 3.25 Gráfico do TP para os fármacos puros, G2 puro e ambos associados (A) e gráfico do TP para fármacos puros, G4 puro e associações(B).

A figura 3.25 (A) mostra que dos tempos obtidos para os fármacos puros, o metotrexato apresentou valor igual ao limite normal superior (tempo médio 15,0 segundos), prednisona e meloxicam apresentaram valores normais. Já o tempo de protrombina para G2 puro e associado com metotrexato apresentaram valores iguais ao limite normal superior para TP (tempo médio de 15,0 segundos), prednisona e meloxicam associados a G2 obtiveram valores dentro da normalidade. Esses dados mostram que os dendrímeros de poliglicerol de segunda geração (G2), tanto isolados quanto associados com os fármacos, não interferem no tempo de protrombina (TP) do

sangue, indicando que esse material pode ser usado com segurança, pois não induziu alteração da via extrínseca da coagulação do sangue.

Na figura 3.25 **(B)** notamos que para o teste de protrombina (TP) de G4 puro e suas associações todos os grupos apresentaram valores normais para o tempo de protrombina. Dessa forma, os resultados apresentados mostram que a interação do PGLD de quarta geração (G4) com os fármacos para tratamento da artrite reumatoide não interferiram na via extrínseca da coagulação, indicando que o material estudado pode ser utilizado com segurança em contato com a corrente sanguínea.

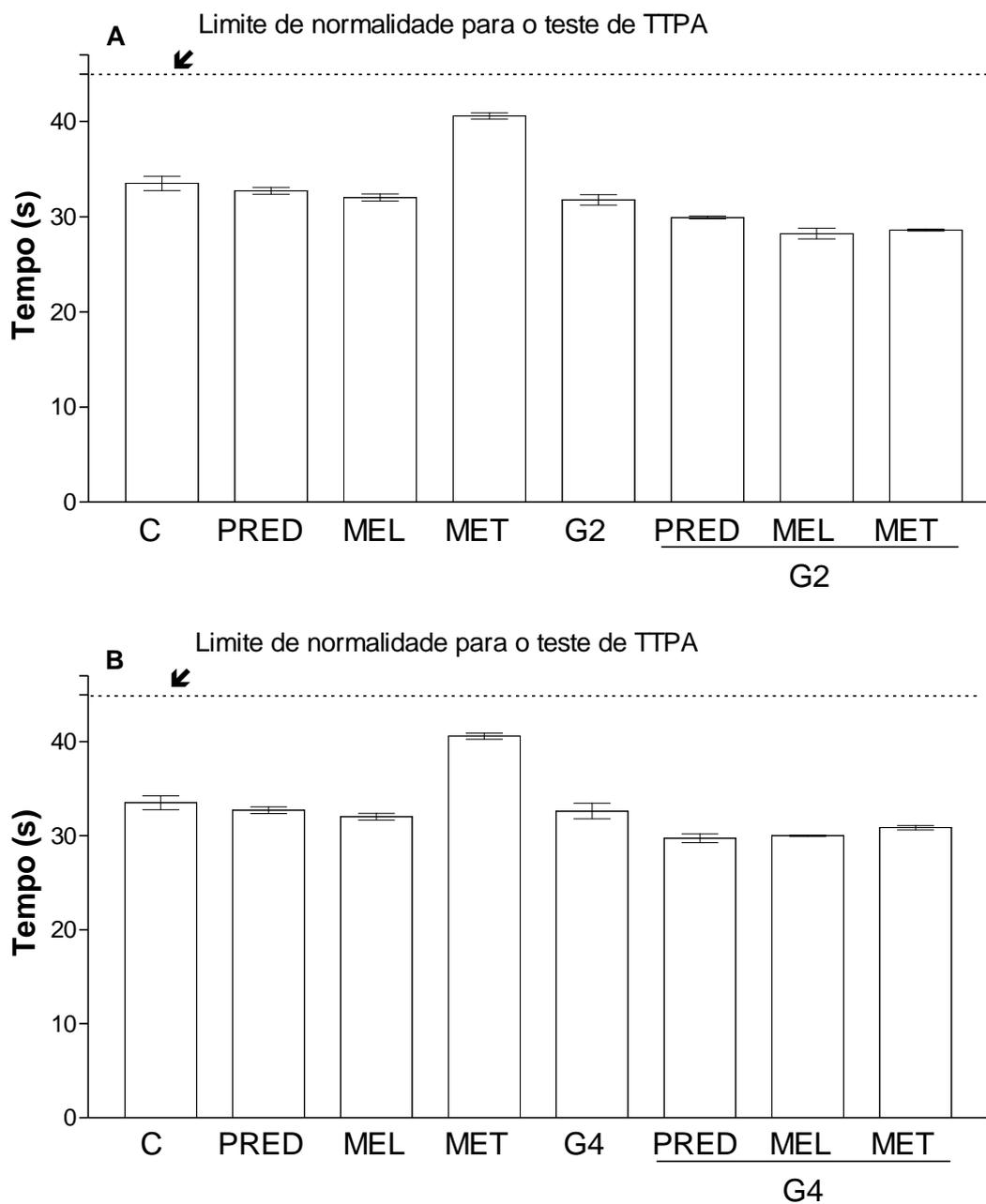


Figura 3.26 Gráfico do TTPA para os fármacos puros, G2 puro e ambos associados (A) e gráfico do TP para fármacos puros, G4 puro e associações(B).

A figura 3.26 mostra que os tempos obtidos para os fármacos puros, G2 e G4 puros e as associações dos dendrímeros com os fármacos se encontram dentro dos padrões de normalidade para o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). Esses dados indicam que os dendrímeros de poliglicerol de segunda geração (G2) e quarta geração(G4) e suas associações com os fármacos em estudo não interferem na via intrínseca da coagulação avaliada no teste de TTPA. Todos os testes realizados

apresentaram valores dentro dos padrões de normalidade, indicando que o poliglicerol com estrutura dendrítica pode ser usado com segurança, confirmando ser este um material promissor como transportador de fármacos para utilização local ou sistêmica para tratamento da artrite reumatoide.

O exame mais utilizado na prática clínica para controle da coagulação é o TP com a razão de normatização internacional (INR). O INR é um método de calibração do TP com o objetivo de reduzir a variação no resultado do TP, entre diferentes laboratórios clínicos. As médias dos INR obtidas no experimento estão representadas na tabela abaixo:

Tabela 3.1. Valores de INR.

COMPOSTO	INR	COMPOSTO	INR	COMPOSTO	INR
	(MÉDIA)		(MÉDIA)		(MÉDIA)
Dendrímero	1,05	G2	1,11	G4	1,05
Prednisona	1,05	G2+ Prednisona	1,11	G4+ Prednisona	1,05
Meloxicam	1,11	G2+Meloxicam	1,11	G4+Meloxicam	1,05
Metotrexato	1,11	G2+Metotrexato	1,11	G4+Metotrexato	1,05

A tabela 3.1 mostra que os valores de INR se encontram dentro dos padrões de normalidade (de 0,9 a 1,2). Os dados indicam que G2 e G4 puros e os compostos resultantes de suas associações não interferiram nos índices de INR quando em contato com o sangue humano, confirmando que os dendrímeros de poliglicerol não interferem na via extrínseca da coagulação, o que já foi demonstrado no teste de TP (**Figura 3.25**)

3.4.2 Adesão plaquetária

Os fatores da coagulação e as células envolvidas no processo podem interagir com os materiais nanoestruturados e promover a formação de coágulo sanguíneo. Essas características dependem diretamente da constituição dos componentes desses sistemas e não são desejáveis quando se trata de materiais para serem utilizados em contato com

a corrente sanguínea. Por isso os dendrímeros de poliglicerol foram avaliados quanto á sua capacidade de promover a adesão plaquetária em sua superfície.

Após a contagem automatizada das plaquetas realizada no controle, nas soluções dos fármacos puros, dendrímeros de poliglicerol de segunda geração (G2) e quarta geração (G4) puros e os compostos formados após associação os resultados obtidos estão representados na figura 3.27.

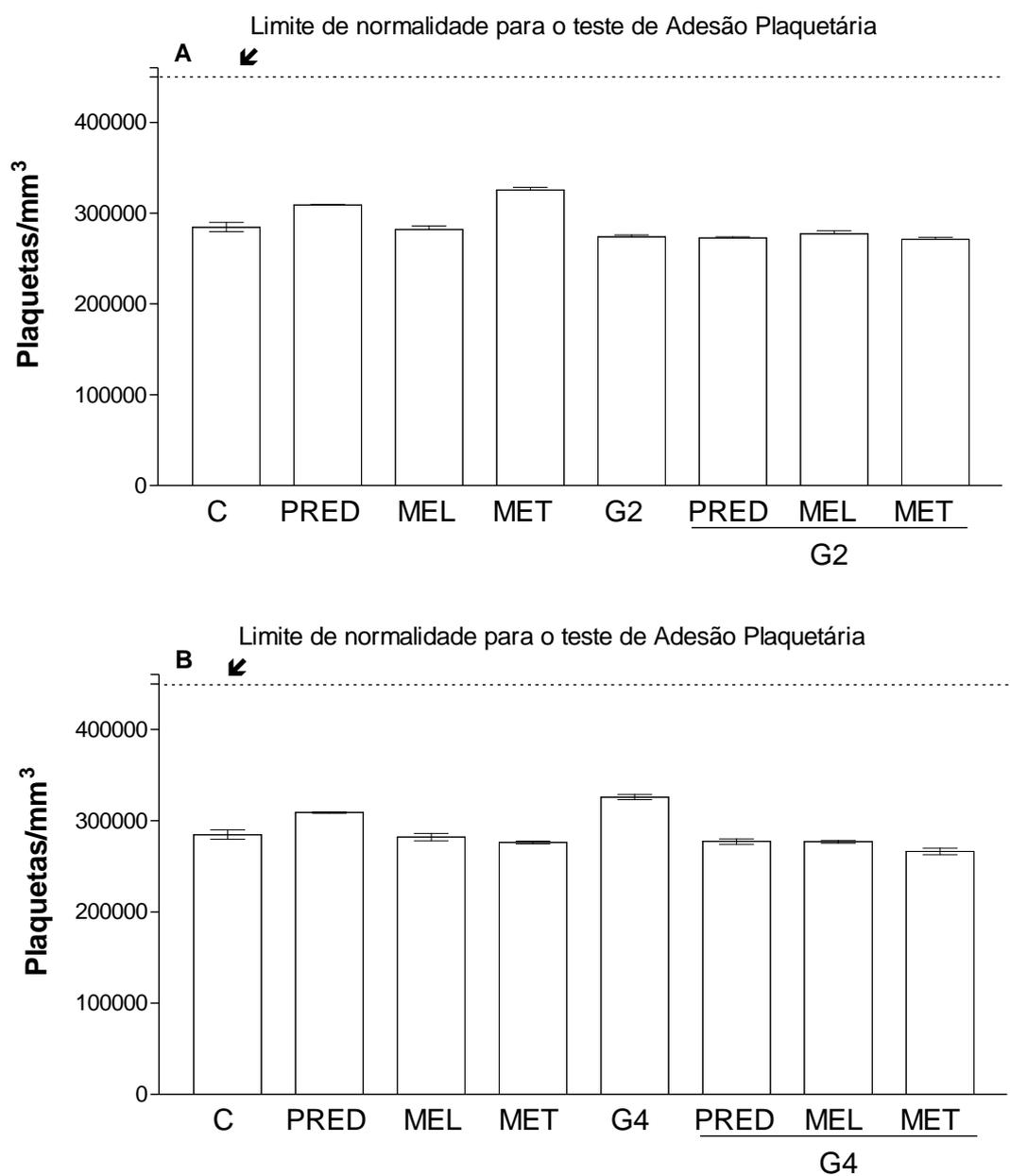


Figura 3.27 Gráfico das plaquetas/mm³ de sangue dos fármacos puros, G2 puro e associações (A) e gráfico dos fármacos puros, G4 puro e suas associações (B).

Na figura 3.27 observa-se que para os fármacos isolados, G2 e G4 puros e suas associações o número de plaquetas por milímetro cúbico de sangue está dentro dos valores normais que são de 150000 a 450000/mm³ de sangue. Esses dados indicam que não ocorreu adesão plaquetária na superfície dos materiais estudados, o que nos leva a concluir que o poliglicerol dendrítico é um sistema nanoestruturado com características desejáveis para aplicação sistêmica por não induzir adesão plaquetária e consequentemente não ocorrer formação de coágulos sanguíneos.

3.4.3 Ensaio de hemólise

A hemólise pode causar a liberação de hemoglobina assim como a liberação de componentes intracelulares e substâncias tromboplásticas pela ruptura de eritrócitos, que ativam o sistema de coagulação (MOHAN, 2013).

As porcentagens de hemólise resultantes das amostras em contato com o sangue humano estão ilustradas na tabela abaixo:

Tabela 3.2 Valores de porcentagem de hemólise após exposição aos compostos estudados

Composto	%Hemólise 1/3 X*	%Hemólise X*	%Hemólise 3X*
Prednisona	0,23	0,44	1,1
Metotrexato	1,7	1,5	1,9
Meloxicam	0	0	1,6
G2 Puro	1,2	0,8	1,7
G4 Puro	0,7	1,0	1,0
Prednisona+G2	0	0	0
Prednisona+G4	0	0,4	0
Metotrexato+G2	1,2	1,7	1,0
Metotrexato+G4	1,2	1,2	1,5
Meloxicam+G2	0,5	0	1,0
Meloxicam+G4	0	0	0

*X= Concentração que o fármaco atinge na circulação sanguínea

Os dados da tabela 3.2 mostram que a taxa de hemólise dos fármacos puros, G2 e G4 puros e suas associações podem ser classificados como não hemolíticos por apresentarem taxas de hemólise abaixo de 2% segundo o protocolo internacional E2524-08 de 2013, Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles da American Society for Testing and Materials para o estudo das propriedades hemolíticas de nanopartículas (DOBROVOLSKAIA & MCNEIL, 2013).

Os testes de hemocompatibilidade mostraram que não houve alteração na estabilidade do sangue quando em contato com os fármacos prednisona, meloxicam e metotrexato, G2 e G4 e com os compostos formados após conjugação, uma vez que os testes utilizados para avaliar a hemocompatibilidade permaneceram dentro dos padrões de normalidade.

Capítulo 4
CONCLUSÃO

4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos utilizando as técnicas físico-químicas nos permitem sugerir que ocorreu a conjugação dos fármacos estudados com os dendrímeros de poliglicerol de segunda geração (G2) e quarta geração (G4).

Os testes de hemocompatibilidade mostraram que os fármacos puros, dendrímeros puros e os fármacos conjugados aos dendrímeros são hemocompatíveis.

4.1 Perspectivas futuras

Além da necessidade evidente do desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e que trazem menos efeitos adversos aos pacientes ressalta-se que muitos tratamentos são realizados com fármacos biológicos que muitas vezes são importados e acabam por gerar gastos elevados por parte do Governo Brasileiro e da população. Desta forma, observa-se uma enorme necessidade de desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro na área de nanofármacos que podem ser administrados localmente no sítio da inflamação ou que podem ser dirigidos para liberação da droga no local desejado. Futuramente, durante o doutorado será analisado o processo de interação dos fármacos com o PGLD através da ressonância magnética nuclear (RMN) e ensaios *in vivo* induzindo artrite em animais de experimentação para avaliação da citotoxicidade e eficácia dos nanofármacos na redução do processo inflamatório, induzido na artrite reumatoide.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABOURAZZAK, F.; EL MANSOURI, L.; HUCHET, D. *et al.* **A. Long-term effects of therapeutic education for patients with rheumatoid arthritis.** *Joint Bone Spine* v. 76, p. 648–53, 2009.
- ABRAMSON, S. **Drug delivery in degenerative joint disease: where we are and where to go?** *Advanced Drug Delivery Reviews*, New York, v. 58, p. 125– 127., 2006.
- ALARCON, R.T.; ANDRADE, L.E.C. **Anticorpos antiproteínas citrulinadas e a artrite reumatoide.** *Rev Bras Reumatol.* v.47, p. 180-187, 2007.
- ALETAHA, D.; NEOGI, T.; SILMAN, A. J. *et al.* **Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.** *Ann Rheum Dis.*v.69, p.1580–8, 2010.
- ALETAHA, D.; ALASTI, F.; SMOLEN, J. S. **Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials.** *Arthritis Res. Ther.* v. 17:229, p.1-10, 2015.
- ALMEIDA, M. S. T. M; ALMEIDA, J. V. M; BERTOLO, M. B. **Características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no Piauí, Brasil-Avaliação de 98 pacientes.** *Rev Brs Reumatol.* v. 54, p. 360-365, 2014.
- AMERICAN COLLEGE of RHEUMATOLOGY. Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. **Guidelines for the management of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.*v.46, 2002.
- ANDRIANAKOS, A.; TRONTZAS, P.; CHRISTOYANNIS, F. *et al.* **Prevalence and management of rheumatoid arthritis in the general population of Greece—the ESORDIG study.** *Rheumatology.* v. 45, p. 1549–54, 2006.
- ANQUETIL, F.; CLAVEL, C.; OFFER, G. *et al.* **IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies.** *J. Immunol.* v. 194, p. 3664–74, 2015.
- ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. **Cell-mediated delivery of nanoparticles: taking advantage of circulatory cells to target nanoparticles.** *J. Control. Release* v. 190, p. 531–541, 2014.
- ARNETT, F. C.; EDWORTHY, S. M.; BLOCH, D. A. *et al.* **The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* v. 31, p.315–24, 1998.
- BACALL, N. S. **Automated hematology analyser and the importance of validation of new equipment in the clinical laboratory.** *Rev Bras Hematol.* v.31, p. 218-220, 2009.

BADER R. A. The Development of Targeted Drug Delivery Systems for Rheumatoid Arthritis Treatment, INTECH Open Access Publisher, DOI: 10.5772/26155, 2012.

BARSANTE, M. M. *et al.* **Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats.** British Journal of Pharmacology. v. 153, p. 992-1002, 2008.

BERGER, M. *et al.* **Haemostasis: a brief review.** Caderno pedagógico, Lageado, v.11, n.1, p. 140-148, 2014.

BOHLER, C.; RADNER, H.; SMOLEN, J. S. *et al.* **Serological changes in the course of traditional and biological disease modifying therapy of rheumatoid arthritis.** Ann. Rheum. Dis. v. 72, p. 241–44, 2013.

BRAUNE,S.;HOENOW,A.; MROWIETZ,C. **Hemocompatibility of soft hydrophobic poly (n-butyl acrylate) networks with elastic moduli adapted to the elasticity of human arteries.**Clinical hemorheology and microcirculation. v.49, p.375-390, 2011.

BUHLEIER, E. *et al.* **Cascade and nonskid chain like syntheses of molecular cavity topologies.** Synthesis. v. 2, p.155–158, 1978.

BULARIO ANVISA. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmResultado.asp. Acesso em 10/06/2015

CALLAHAN, L. F.; PINCUS, T. **Education, self-care, and outcomes of rheumatic diseases: further challenges to the “biomedical model” paradigm.** Arthritis Care Res. v.10, p.283–88, 1997.

CANADIAN AGENCY FOR DRUGS AND TECHNOLOGY IN HEALTH. **Rituximab for Rheumatoid Arthritis.** Issues in Emerging Health Technologies, 2006.

CAPORALI, R.; CONTI, F.; ALIVERNINI, S. *et al.* **Recommendations for the use of biologic therapy in rheumatoid arthritis: update from the Italian Society for Rheumatology I. Efficacy.** Clin. Exp. Rheumatol. v. 29, Suppl 66, p. S7–14, 2011.

CARMONA, L.; VILLAVARDE, V.; HERNANDEZ-GARCIA, C. *et al.* **The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain.** Rheumatology. v. 41, p. 88–95, 2002.

CARNEIRO, T. M. C. **Poliéteres arborescentes oticamente ativos para a terapia fotodinâmica.** 2014. 127p Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Itajubá, UNIFEI, Itajubá, 2014.

CASTRO-SANTOS P e DÍAZ-PENÃ R. **Genética da artrite reumatoide: é necessário um novo impulso em populações latino-americanas.** Rev. Bras. Reumatol. v.56 p. 171–177, 2016.

COELHO, F. M, *et al.* **The chemokine receptors CXCR1/2 modulate antigen-induced arthritis byregulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature.** *Arthritis Rheum.* v. 58, p. 1329–2337, 2008.

COSTA, J. O. *et al.* **Tratamento da artrite reumatoide no Sistema Único de Saúde, Brasil: gastos com infliximabe em comparação com medicamentos modificadores do curso da doença sintéticos, 2003 a 2006.** *Cad. Saúde Pública,* Rio de Janeiro, vol. 30, n.2, p.283-295, fev, 2014.

COSTA, J. O. *et al.* **Infliximabe, metotrexato e sua combinação no tratamento da artrite reumatoide: revisão sistemática e metanálise.** *Rev bras reumatol,* v. 55, p.146–158, 2015.

COSTA, V. V. *et al.* **Lithothamnion muelleri treatment ameliorates inflammatory andhypernociceptive responses in antigen-induced arthritis in mice.** *PLOS ONE* DOI: 10.1371. *Journal Plos one.*0118356, 2015.

COSTA, V. V.; AMARAL F. A.; COELHO F. M. *et al.* **Lithothamnion muelleri Treatment Ameliorates Inflammatory and Hypernociceptive Responses in Antigen-Induced Arthritis in Mice.** *Plos One,* v. 10, p. e0118356, 2015.

CRONSTEIN, B. **How does methotrexate suppress inflammation?** *Clin. Exp. Rheumatol.* v. 28, Suppl 61, p. S21–3, 2010.

DA COSTA MOURA, C. **Development of Multifunctional Nanoparticles for Targeted Therapy and Imaging of Rheumatoid Arthritis:** Faculty of Engineering, University of Porto, 2013.

DA MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENO, C.V. *et al.* **Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide.** *Rev. Bras. Reumatol.* v. 52, p. 135-174, 2012.

DANKS, L.; TAKAYANAGI, H. **Immunology and bone.** *J. Biochem.* v. 154, p. 29–39, 2013.

DATASUS. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). **Morbidade Hospitalar do SUS – por local de internação – Brasil,** 2012.

DE AZEVEDO, A. B.; FERRAZ, M. B.; CICONELLI, R. M. **Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil.** *Value Health.* v.11, p. 869–77, 2008.

DERNEDDE, J. *et al.* **Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.,* v. 107, p.19679-19684, 2010.

DERNIS, E.; RUYSSSEN-WITRAND, A.; MOUTERDE, G. *et al.* **Use of glucocorticoids in rheumatoid arthritis – pratical modalities of glucocorticoid therapy: recommendations for clinical practice based on data from the literature and expert opinion.** *Joint Bone Spine.* v. 77, p. 451–7, 2010.

DUNLOP, D. D. *et al.* **The costs of arthritis.** *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research).* v. 15, p. 101-113, 2003.

FERNADES, E. G. R. *et al.* **Antithrombogenic properties of bioconjugate streptokinase-polyglycerol dendrimers.** *J Mat Sci. Mat Med.* v.17, p.105-111, 2006.

FIRESTEIN, G. S. **Evolving concepts of rheumatoid arthritis.** *Nature.* v. 423, p. 356-361, 2003.

FIRESTEIN, G. S. **Immunologic Mechanisms in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis.** *Journal of Clinical Rheumatology.* v. 11, p. S39-44, 2005.

FURST, D. E.; PANGAN, A. L.; HARROLD, L. R. *et al.* **Greater likelihood of remission in rheumatoid arthritis patients treated earlier in the disease course: results from the Consortium of Rheumatology Researchers of North America registry.** *Arthritis Care Res (Hoboken).* v. 63, p. 856–64, 2011.

GARCIA, F. G. **New trend for epoxy polymers. In vitro Biological properties of formulations for medical applications.** *Polímeros: Ciência e tecnologia.* v.19, p. 177-182, 2009.

GARCIA, M. C. **Micropartículas de metotrexato e ácido poli láctico-co-glicólico obtidas por“Spray-Drying”.** 2014. 83p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

GERWIN, N. *et al.* **Intra articular drug delivery in osteoarthritis.** *Advanced Drug Delivery Reviews.* v. 58, p.226–242, 2006.

GIAROLA, V. M. **Ressonância de plásmos de superfície aplicada ao desenvolvimento desistemas arborescentes hemocompatíveis.** 2007. 172p Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Itajubá, UNIFEI, Itajubá, 2007.

GOELDNER, I. *et al.* **Artrite reumatóide: Uma visão atual.** *J Bras Patol Med Lab.* v.47, p. 495-503, 2011.

Gonzalez, A.; Icen, M.; Kremers, H. M. *et al.* **Mortality trends in rheumatoid arthritis: the role of rheumatoid factor.** *J. Rheumatol.* v. 35, p. 1009–14, 2008.

GONZÁLEZ GARCIA, F.; DE QUEIROZ, A.A.A.; HIGA, O.Z.; BARATÉLA, F.J.C. **Epoxy/aliphatic amine networks with perspectives for cardiovascular applications: In vitro biological properties.** *Revista Matéria,* v. 21, n. 1, p. 115 – 128, 2016.

GOODMAN A. G. **Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics,** McGraw-Hill, New York 10^a edição. Quadro A.II.I Dados Farmacocinéticos. 2004.

GOODMAN & GILMAN. **Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics,** McGraw-Hill, New York 11^a edição, 2010.

GOODMAN, S. L.; COOPER, S.L.& ALBRECHT, R. M. **The effects of substrate-adsorbed albumin on platelet spreading.** J. Biomat. Sci.: Polymer Edition, v. 2, p.147, 1991.

GROBMYER, S. R.; IWAKUMA, N.; SHARMA, P. *et al.* **What is Cancer Nanotechnology?** Springer, 2010.

GRÖGER, D. *et al.* **Synthesis and Biological Evaluation of Radio and Dye Labeled Amino Functionalized Dendritic Polyglycerol Sulfates as Multivalent Anti-Inflammatory Compounds.** Bioconjug Chem, v. 24, p. 1507-1514, 2013.

GUILLEMIN, F.; SARAUX, A.; GUGGENBUHL, P. *et al.* **Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001.** Ann. Rheum. Dis. v.64, p. 1427–30, 2005.

HARRE, U.; GEORGESS, D.; BANG, H. *et al.* **Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin.** J. Clin. Invest. v. 122, p. 1791–802, 2012.

HARRIS, W. R. **Chondrosarcoma complicating total hip arthroplasty in Maffucci's syndrome.** Clin. Orthop. Relat. Res. v. 260, p. 212-214, 1990.

HOES, J. N.; JACOBS, J. W.; VERSTAPPEN, S. M. *et al.* **Adverse events of low- to medium-dose oral glucocorticoids in inflammatory diseases: a meta-analysis.** Ann. Rheum. Dis. v. 68, p. 1833–8, 2009.

HONDA, K.; LITTMAN, D. R. **The microbiome in infectious disease and inflammation.** Annu. Rev. Immunol. v. 30, p. 759–95, 2012.

KERKMAN, P. F.; FABRE, E.; VAN DER VOORT, E. I. *et al.* **Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis.** Ann. Rheum. Dis. v. 75, p. 1170-6, 2016.

KESHARWANI, P. *et al.* **Dendrimer as nanocarrier for drug delivery.** Progr Polym Sci, v. 39, p. 268-307, 2014.

KHURANA, S.; JAIN, N.K.; BEDI, P.M.S. **Nanoemulsion based gel for transdermal delivery of meloxicam: Physico-chemical, mechanistic investigation.** Life Sciences.v.92, p.383-392, 2013.

KIRWAN, J.R; POWER, L.L. **Glucocorticoids in rheumatic disease.** Reports on the Rheumatic Diseases Series 5. Topical Reviews. Arthritis Research Campaign. Number 13, 2007.

KLARESKOG, L.; MALMSTROM, V.; LUNDBERG, K. *et al.* **Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis.** Semin. Immunol. v. 23, p. 92–98, 2011.

KUMAR, P; BANIK, S. **Pharmacotherapy Options in Rheumatoid Arthritis.** Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders, 2013 .

LANDEVE, R. B. *et al.* **COBRA combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: long-term structural benefits of a brief intervention.** *Arthritis Rheum.* v. 46, p. 347–356, 2002.

LEONARDI, D. *et al.* **Development of prednisone: polyethylene glycol 6000 fast-release tablets from solid dispersions: solid-state characterization, dissolution behavior and formulation parameters.** *AAPS Pharm. Sci. Tech.* v. 8, Article 108, 2007.

LINEKER, S. C.; BELL, M. J.; BADLEY, E. M. **Evaluation of an inter-professional educational intervention to improve the use of arthritis best practices in primary care.** *J. Rheumatol.* v. 38, p.931–7, 2011.

LOVISI NETO, B.E.; JENNINGS, F.; BARROS OHASHI, C. *et al.* **Evaluation of the efficacy of an educational program for rheumatoid arthritis patients.** *Clin. Exp. Rheumatol.* v. 27, p. 28–34, 2009.

LUKAS, C.; COMBE, B.; RAVAUD, P. *et al.* **Favorable effect of very early disease-modifying antirheumatic drug treatment on radiographic progression in early inflammatory arthritis: Data from the Etude et Suivi des polyarthrites indifferenciees recentes (study and followup of early undifferentiated polyarthritis).** *Arthritis Rheum.* v. 63, p. 1804–11, 2011.

MACGREGOR, A. J.; SNIEDER, H.; RIGBY, A. S. *et al.* **Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins.** *Arthritis Rheum.* v. 43, p. 30–7, 2000.

MALOTTKI, K. *et al.* **Adalimumab, etanercept, infliximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: a systematic review and economic evaluation.** *Health Technol Assess.* v.15, p. 1-278, 2011.

MALIK, N. *et al.* US patent Issued US200364050, 2006.

MARKATSELI, T. E.; PAPAGORAS, C.; DROSOS, A. A. **Prognostic factors for erosive rheumatoid arthritis.** *Clin. Exp. Rheumatol.* v. 28, p. 114–23, 2010.

MASIERO, S.; BONIOLO, A.; WASSERMANN, L. **Effects of an educational-behavioral joint protection program on people with moderate to severe rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial.** *Clin. Rheumatol.* v. 26, p. 2043–50, 2007.

MEDINA, S. H.; EL-SAYED, M. E. **Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents.** *Chem. Rev.* v. 109, p. 3141–3157, 2009.

MILLAR, K.; LLOYD, S. M.; MCLEAN, J. S. *et al.* **Personality, socio-economic status and inflammation: cross-sectional, population-based study.** *PLoS One*, 0058256, 2013.

MINAUR, N.; SAWYERS, S.; PARKER, J. *et al.* **Rheumatic disease in an Australian Aboriginal community in North Queensland, Australia. A WHO-ILAR COPCORD Survey.** *J. Rheumatol.* v. 31, p. 965–972, 2004.

MOHAN, C.C.; CHENNAZHI, K.P.; MENON, D. **In vitro hemocompatibility and vascular endothelial cell functionality on titania nanostructures under static and dynamic conditions for improved coronary stenting applications.** *Acta Biomater.* V. 9, p.9568-9577, 2013.

MOTA, L. M. H. *et al.* **Diagnóstico por imagem da artrite reumatóide inicial.** *Rev Bras Reumatol.* v. 52, p. 757-766, 2012.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais.** Artliber, 2009

MOURA, R. M. **Avaliação do potencial citotóxico e antitumoral do dendrímero de poliglicerolsalicilado em diferentes linhagens celulares.** 2011. 139p. Dissertação (Mestrado- Universidade Federal de Itajubá, UNIFEI, Itajubá, 2011.

NEGREI, C. *et al.* **Management of rheumatoid arthritis: Impact and risks of various therapeutic approaches (Review).** *Experimental and therapeutic medicine.* v.11, p. 1177-1183, 2016.

NIELEN, M. M.; VAN SCHAARDENBURG, D.; REESINK, W. H. *et al.* **Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors.** *Arthritis Rheum.* v.50, p. 380–86, 2004.

O'DELL, J. R.; HAIRE, C. E.; ERIKSON, N. *et al.* **Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate alone, sulfasalazine and hydroxychloroquine, or a combination of all three medications.** *N. Engl. J. Med.* v. 334, p. 1287–91, 1996.

OLIVEIRA, L. M. *et al.* **Monitoring the functional capacity of patients with rheumatoid arthritis for three years.** *Rev Bras Reumatol.* v.55, p. 62-67, 2015.

PARK, J. H. *et al.* **Polymeric nanomedicine for cancer therapy.** *Prog Polym Sci,* v.33, n.1p 113-137, 2008.

PASSOS, E.; QUEIROZ, A.A.A., SACHS, D. ; PEREIRA, A.C.; GONZALÉZ, M. E.L. **Processo De Obtenção De Arcabouço Molecular Eletrofiado De Poliglicerol Arborescente Biofuncional.** Instituição de registro: Universidade Federal de Itajubá. Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150316771, data de depósito: 17/12/2015.

PAULISSEN, S.M.; VAN HAMBURG, J. P.; DANKERS, W. *et al.* **The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis.** *Cytokine.* v. 74, p. 43–53, 2015.

PHAM, C. T. **Nanotherapeutic approaches for the treatment of rheumatoid arthritis.** *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* v.3, p. 607– 619, 2011.

PINCUS, T.; CRONSTEIN, B.; BRAUN, J. **Methotrexate – the anchor drug – an introduction.** *Clin. Exp. Rheumatol.* v. 28, Suppl 61, p. S1–2, 2010.

SABHARWAL, U. K.; VAUGHAN, J. H.; FONG, S. *et al.* **Activation of the classical pathway of complement by rheumatoid factors. Assessment by radioimmunoassay for C4.** *Arthritis Rheum.* 1982; 25: 161–67.

SACHS, D.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V. *et al.* **Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice.** *British Journal of Pharmacology*, v. 162, p. 72-83, 2011.

SACHS, D. *et al.* **Cooperative role of tumour necrosis factor-a, interleukin-1b and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice.** *Brit J Pharmacol.* v.162, p. 72–83, 2011.

SAKAGUSHI, S. **Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.** *Nature Immunology.* V.6, P.354-352, 2005.

SANAM DOLATIA, B.; SANAM SADREDDINIC, D.; DAVOUD ROSTAMZADEHA, B. *et al.* **Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment.** *Biomedicine & Pharmacotherapy.* v. 80, p. 30–41, 2016.

SBR. SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. **Artrite Reumatoide: Diagnóstico e Tratamento**, 2002.

SCHER, J. U.; LITTMAN, D. R.; ABRAMSON, S. B. **Review: microbiome in inflammatory arthritis and human rheumatic diseases.** *Arthritis Rheumatol.* v. 68, p. 35–45, 2016.

SCHER, J. U.; UBEDA, C.; ARTACHO, A. *et al.* **Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease.** *Arthritis Rheumatol.* v.67, p. 128–39, 2015.

SENNA, E. R. *et al.* **Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach.** *J. Rheumatol.* v. 31, p.594-597, 2004.

SILMAN, A. J. *et al.* **Absence of rheumatoid arthritis in a Nigerian population.** *J. Rheumatol.* v.20, p. 618–622, 1993.

SILVEIRA, K. D. *et al.* **Anti-Inflammatory Effects of the Activation of the Angiotensin-(1-7) Receptor Mas in Experimental Models of Arthritis.** *J Immunol.* v.185, p. 5569-5576, 2010.

SHAPIRA, Y.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y. **Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases.** *Nat Rev Rheumatol.* v.6, p. 468-76, 2010.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; BIJLSMA, J. W. *et al.* **Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force.** *Ann. Rheum. Dis.* v. 69, p. 631–7, 2010.

SMOLEN, J. S.; LANDEWE, R.; BREEDVELD, F. C. *et al.* **EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs.** *Ann Rheum Dis* v. 69, p. 964–75, 2010. [Erratum in: *Ann Rheum Dis* v. 70, p.1519, 2011].

SOLER, M. *et al.* **Highly sensitive dendrimer-based nanoplasmonic biosensor for drug allergy diagnosis.** *Biosensors and Bioelectronics.* v. 66, p. 115-123, 2015.

STEINMEYERAND, J; KONTTINEN, Y.T. **Oral treatment options for degenerative joint disease--presence and future.** *Adv. Drug Delv. Rev.* v. 58, p.168–211, 2006.

SVENSON, S; Tomalia, D.A. **Dendrimers in biomedical applications – Reflections on the field.** *Adv Drug Deliv Rev.* v. 57, p. 2106-2129, 2005.

SVENSON, S. **Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications.** *Eur J Pharm Biopharm.* v. 71, p. 445–462, 2009.

STOFFER, M. A.; SCHOELS, M.; SMOLEN, J. S. *et al.* **Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: results of a systematic literature search update.** *Ann. Rheum. Dis.* v. 75, p. 16–22, 2016.

STRAND, V.; KIMBERLY, R.; ISAACS, J. D. **Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions.** *Nat Rev Drug Discov.* v.6, p.75-92, 2007.

SYMMONS, D.; MATHERS, C.; PFLEGER, B. **Global Burden of Disease 2000: the global burden of rheumatoid arthritis in the year 2000.** (WHO, Geneva, 2000).

SZEKANECZ, Z.; BESENYEI T.; SZENTPETERY, A. *et al.* **Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis.** *Curr. Opin.Rheumatol.* v. 22, p.299–306, 2010.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A. E. **Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis.** *Vascul. Pharmacol.* v. 51, p. 1–7, 2009.

TERRA, P. **Coagulação: interpretação clínica dos testes laboratoriais de rotina.** Atheneu, São Paulo, 3^o ed, 2004

TOMALIA, D. A. *et al.* **A new class of polymers: star burst dendritic macromolecules.** *Polymer Journal.* v. 17, p.117–132, 1985.

TORCHILIN, V. P. **Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives.** *Pharm. Res.* v. 24, p. 1–16, 2007.

VAN EVERDINGEN, A. A.; JACOBS, J. W.; SIEWERTSZ VAN REESEMA, D. R. *et al.* **Low-dose prednisone therapy for patients with early rheumatoid arthritis:**

clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Ann. Intern. Med.* v. 136, p. 1–12, 2002.

VAN GAALEN, F. A.; VAN AKEN, J.; HUIZINGA, T. W. *et al.* **Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* v. 50, p. 2113–21, 2004.

VENSON, R. *et al.* **Assessing efficacy, safety and tolerability of rituximabe for rheumatoid arthritis meta-analyses of randomized contolled trials.** *Biomed Biopharm Res.* v.10, p.225-234, 2013.

VISSER, K.; GOEKOOP-RUITERMAN, Y. P.; DE VRIES-BOUWSTRA, J. K. *et al.* **A matrix risk model for the prediction of rapid radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis receiving different dynamic treatment strategies: post hoc analyses from the BeSt study.** *Ann. Rheum. Dis.* v. 69, p. 1333–7, 2010.

VISSER, K.; KATCHAMART, W.; LOZA, E. **Multinational evidence-based recommendations for the use of methotrexate in rheumatic disorders with a focus on rheumatoid arthritis: integrating systematic literature research and expert opinion of a broad international panel of rheumatologists in the 3E Initiative.** *Ann. Rheum. Dis.* v. 68, p. 1086–93, 2009.

WANG, C. *et al.* **Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex.** *Biochem.Biophys. Res. Commun.* v. 402, p.773-777, 2010.

WANG, E. C.; WANG, A. Z. **Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology,** *Integr. Biol.* v. 6, p. 9–26. 2014.

WEGNER, N.; WAIT, R.; SROKA, A. *et al.* **Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fi brinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* v. 62, p. 2662–72, 2010.

WIPKE, B. T.; ALLEN, P. M. **Essential role of neutrophils in the initiation and progression of amurine model of rheumatoid arthritis.** *J. Immunol.* v.167, p. 1601–1608, 2001.

ZHAO, X.; OKEKE, N. L.; SHARPE, O. *et al.* **Circulating immune complexes contain citrullinated fi brinogen in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res. Ther.* v.10, R94, 2008.

ZHOU, H. F.; YAN, H.; SENPAN, A. *et al.* **Suppression of inflammation in a mouse model of rheumatoid arthritis using targeted lipase-labile fumagillin prodrug nanoparticles.** *Biomaterials.* v. 33, p. 8632–8640, 2012.