

Thiago Matos Ferreira de Araújo

**Caracterização de nanopartículas contendo insulina em modelos de animais
induzidos ao diabetes**

Campinas

2010

Thiago Matos Ferreira de Araújo

**Caracterização de nanopartículas contendo insulina em modelos de animais
induzidos ao diabetes**

Dissertação de Mestrado apresentada
à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção
de título de Mestre em Ciências
Médicas, área de concentração em
Ciências Biomédicas.

Orientador (a): Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Durán

CAMPINAS

Unicamp

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ar15c Araújo, Thiago Matos Ferreira de
Caracterização de nanopartículas contendo insulina em modelos de
animais induzidos ao diabetes / Thiago Matos Ferreira de Araújo.
Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores: Nelci Fenalti Höehr, Nelson Durán
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Nanopartículas. 2. Insulina. 3. Diabetes. I. Höehr, Nelci
Fenalti II. Duran, Nelson. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês: Characterization of nanoparticles containing insulin in
animal models induced diabetes**

Keywords: • Nanoparticles
• Insulin
• Diabetes

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr
Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino
Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo

Data da defesa: 05-08-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Thiago Matos Ferreira de Araújo

Orientador(a): Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr

Membros:

1. Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr -



2. Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino -



3. Profa. Dra. Patricia da Silva Melo -



Curso de pós-graduação em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/08/2010

Dedicatória

A Ele por estar presente em todos os momentos da minha vida, concedendo todas as dádivas. Em quem deposito toda minha confiança.

Aos meus amados pais, Rejane e Joaquim, os quais sempre me apóiam em todas as empreitadas da minha vida. Ao grande amor que por eles sinto.

À querida amiga Profa. Nelci, pelos momentos de aconselhamento, carinho, sorrisos e lágrimas. A confiança depositada em mim.

Agradecimentos

A todas as amizades longas e verdadeiras de Kleiton, Nessinha, Peré, Lulu, Kênya, Lú Soriano, Aninha, Mifera, Kaká e todos que mesmo distante estão presentes no coração e na lembrança.

Ao André Nazário, o grande responsável pela minha vinda a Campinas, pelo auxílio, amizade, confiança e companheirismo.

À grande companheira Larissa Jatobá, minha irmã Lari, que acreditou e abraçou a loucura de vir embora, sendo a grande incentivadora na decisão de fazer o meu mestrado.

À Zaine Teixeira pelas conversas, ensinamentos, carinho, dedicação e confiança.

Aos amigos Aline, Gláucia e Jonathan que tanto no grupo de pesquisa quanto nos momentos de descontração, conversaram, debateram, desesperaram, mas sempre sorriram ao final.

Ao companheirismo de Bárbara e Paula que mais do que companheiras de república são amigas e detêm como grande virtude a honestidade.

Às amigas Eloá e Juliana pelos grandes momentos de bom papo.

Aos novos amigos, mas tão importante quanto os antigos, Paulo e Kenner, que sempre abriram um sorriso e bateram um bom papo nas longas noites.

Aos colegas do Laboratório de Pâncreas Endócrino (Helena, Luiz, Sandrinha, Gustavo, Thays, Thiago, Flávia, Lely, Rô, Pri, Amon, Bia, Júnia) em especial ao Prof. Boscherro, e a todos os demais que me auxiliaram na obtenção desses resultados.

Ao Prof. Nelson Durán pelos momentos de conversa, apoio e dedicação na construção da minha tese.

Aos colegas do Laboratório de Química Biológica (Priscyla, Dri, Ana, Chico, Jú) que sempre me auxiliaram na vida laboratorial.

Ao Ricardo, pessoa que entrou no meio dos meus experimentos para dar esperança quando “o desespero do CLAE chegou”.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica do Hospital das Clínicas (UNICAMP) e do Departamento de Patologia Clínica, em especial Marielza, Hilda e Regina que sempre me auxiliaram.

Ao Prof. Roberto Rittner, pelo apoio e incentivo constante a todo grupo de pesquisa.

A todos os meus familiares que mesmo distantes são extremamente carinhosos e presentes na minha vida.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Issac Newton

“Aquele que tentou e não conseguiu é superior àquele que nada tentou.”

Arquimedes

“Não se pode ensinar tudo a alguém, pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo.”

Galileu Galilei

Lista de abreviaturas

A/O	água/óleo
A/O/A	água/óleo/água
ATP	Adenosina trifosfato
Au	Ouro
Bact	Beta actina
BCO	Branco
°C	Graus <i>Celsius</i>
CASP	Caspase
CAT	Catalase
CO₂	Dióxido de carbono
CH₂Cl₂	Diclorometano
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm²	Centímetro quadrado
CTL	Controle

Cu	Cobre
DISC	Complexo sinalizador de indução da morte
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DMEM	Dulbecco's modificado
ERO	Espécies reativas de oxigênio
F.A.	Fase aquosa
FasI	Ligante de início da morte celular
FDA	<i>USA Food and Drug Administration</i>
Fe	Ferro
F.O.	Fase orgânica
g	Gramma
GPx	Glutathione peroxidase
GS	Somatotrofina
GSH	Glutathione reduzido

H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
INS	Insulina
I	Litro
I.T.T.	Teste de tolerância a insulina
H₂O	Água
K	Cloro
kg	Quilograma
KCl	Cloreto de potássio
kV	Quilovolts
M.E.V.	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
mg/dl	Miligrama por decilitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro

mM	Milimolar
mmol	Milimol
mmol/l	Milimolar por litro
MTS	(3-(4,5-dimetiltioazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio)
mV	Milivolts
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Nano 1	Nanopartículas preparada com 100 µl de insulina
Nano 2	Nanopartículas preparada com 600 µl de insulina
NAR	Nanopartículas de naringenina
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
O₂⁻	Superóxido
OH	Hidróxido de oxigênio
ONOO⁺	Peróxinitrito
PCL	Poly-ε-caprolactona

PCR	Reação de polimerase em cadeia
Pd	Chumbo
P.D.I.	Índice de polidispersidade
PDX	Peróxido dismutase
PGA	Poliglicolato
PHA	Polihidroxicanoato
PLA	Polilactato
PLGA	Co-polímero de lactato e glicolato
Pluronic F68	<i>poly(ethylene glycol)-block-poly(propylene glycol)-block-poly(ethylene glycol)</i>
PPARγ	Receptor ativado da proliferação do peroxissoma
PVA	Polivinil álcool
RNA	Ácido ribonucléico
r.p.m.	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina

TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TZDs	Tiazoludinedionas
U.I.	Unidades internacionais
VS.	Versus
Zn	Zinco
A	Alfa
B	Beta
μm	Micrometro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro

Lista de figuras

- Figura 1-** Número de portadores de diabetes em diversos países do mundo de 2000 e 2010, e se percentual de aumento.
- Figura 2-** Produção pancreática da insulina com órgãos participantes e estruturas celulares.
- Figura 3-** Estrutura química da insulina e sua seqüência de aminoácidos.
- Figura 4-** Modificações estruturais das nanopartículas poliméricas (nanocápsulas ou nanoesferas).
- Figura 5-** Processos de degradação da matriz polimérica.
- Figura 6-** Estruturas monoméricas dos principais polímeros utilizados na aplicação biomédica.
- Figura 7-** Resumo esquemático dos mecanismos de ativação das caspases.
- Figura 8-** Reações pró-oxidativas e os antioxidantes mais relevantes para sistemas biológicos.
- Figura 9-** Modelo experimental para preparação de nanopartículas poliméricas de insulina.
- Figura 10-** Curva analítica para quantificação de insulina por CLAE.
- Figura 11-** Curva analítica de reprodutibilidade da técnica analítica (CLAE).

- Figura 12-** Micrografia de nanopartículas poliméricas contendo insulina X 10.000.
- Figura 13-** Micrografia de nanopartículas poliméricas contendo insulina X 15.000.
- Figura 14-** Micrografia de nanopartículas poliméricas contendo insulina X 20.000.
- Figura 15-** Viabilidade celular avaliado por *MTS assay* em células MIN 6.
- Figura 16-** Expressão da Caspase 3 em células MIN 6.
- Figura 17-** Teste de tolerância a insulina prévio a indução do diabetes (injeção intraperitoneal).
- Figura 18-** Níveis glicêmicos em ratos Wistar induzidos ao diabetes por estreptozotocina pós-injeção subcutânea das formulações.
- Figura 19-** Área sobre a curva das glicemias dos animais nos diferentes tratamentos e tempos.
- Figura 20-** Expressão da catalase em fígado de ratos tratados com as formulações (RT-PCR).
- Figura 21-** Expressão do peróxido dismutase em fígado de ratos tratados com as formulações (RT-PCR).
- Figura 22-** Expressão da superóxido dismutase em fígado de ratos tratados com as formulações (RT-PCR).

Figura 23- Expressão da Caspase 3 em fígado de ratos tratados com as formulações (*Western blotting*).

Lista de Tabelas

- Tabela 1-** Lista de países com aumento expressivo do número de casos estimados de 2000 e 2010.
- Tabela 2-** Classificação etiológica do *Diabetes Mellitus*.
- Tabela 3-** Características dos primers randômicos utilizados para o RT-PCR.
- Tabela 4-** Características físico-químicas das nanopartículas contendo insulina.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	27
ABSTRACT	31
1- INTRODUÇÃO	35
1.1- Diabetes <i>Mellitus</i>	37
1.2- Insulina	42
1.3- Nanopartículas	45
1.4- Nanopartículas de insulina em modelos experimental de diabetes	50
1.5- Hepatotoxicidade farmacológica	51
1.5.1- Caspase 3.....	52
1.5.2- Estresse oxidativo.....	53
2- OBJETIVOS	57
3- MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1- Preparação de nanopartículas de insulina	63
3.2- Caracterização das nanopartículas de insulina	65
3.2.1- Determinação de eficiência de encapsulamento...	65
3.2.2- Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.).....	67
3.2.3- Tamanho médio, distribuição de tamanho das partículas e potencial zeta.....	68
3.3- Cultura de células	68
3.3.1- Citotoxicidade das formulações.....	68
3.4- Método para indução do diabetes	70
3.5- <i>Imunoblotting</i>	70

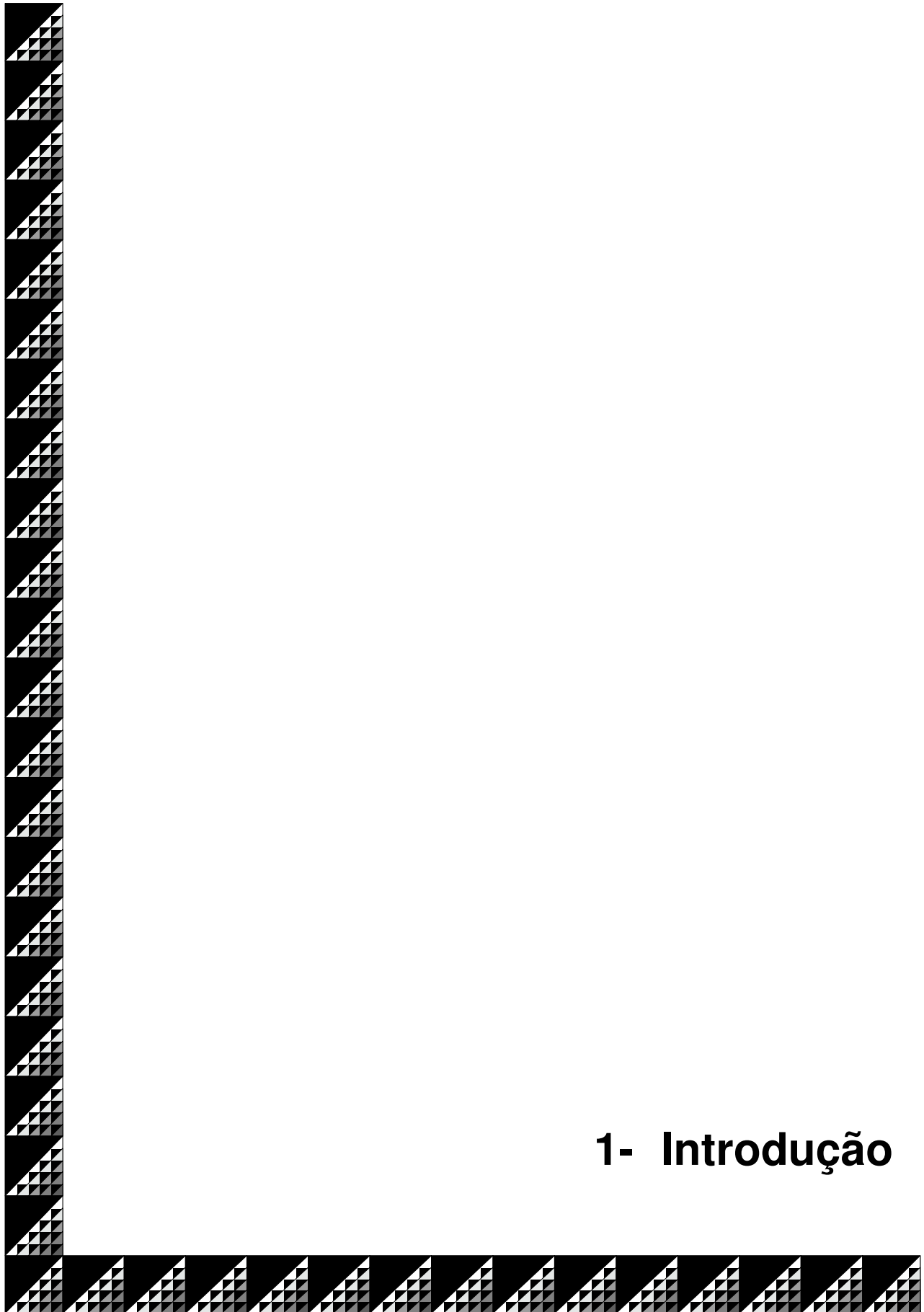
3.6- Extração de RNA e PCR em tempo real.....	72
3.7- Análise estatística.....	73
4- RESULTADOS.....	75
5- DISCUSSÃO.....	89
6- CONCLUSÕES.....	97
7- REFERÊNCIAS.....	101
ANEXOS	

Resumo

O Diabetes *Mellitus* é uma patologia cujos casos têm aumentado, devido aos maus hábitos de vida da sociedade. Inúmeras estratégias vêm sendo desenvolvidas para o tratamento do diabetes, especialmente a liberação controlada de fármacos. A utilização errônea da insulina como tratamento base do diabetes assume uma problemática, visto que a dose elevada do fármaco pode levar a quadros graves de hipoglicemia. O emprego do encapsulamento de fármaco por polímeros biodegradáveis e biocompatíveis vem sendo uma boa estratégia na liberação controlada de fármacos, permitindo que o agente seja liberado de modo contínuo e sustentado. Nesse contexto, a produção e caracterização de nanopartículas contendo insulina se apresentam como uma estratégia de liberação controlada desse hormônio. Sendo assim, este projeto consistiu na preparação e caracterização de nanopartículas biodegradáveis de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) como carreador de insulina e sua aplicação *in vivo* e *in vitro*. As nanopartículas foram preparadas pelo método de dupla emulsão a/o/a e evaporação de solvente. A caracterização das nanopartículas foi realizada pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), observando-se nanopartículas esféricas e com diferentes tamanhos. A eficiência de encapsulação foi de 90,6% ($\pm 1,6$), analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) por via indireta. O diâmetro médio das nanopartículas foi de 796 nm (P.D.I. = 0,49) e o potencial zeta, medido através da mobilidade eletroforética, de $-29,4 \pm 2,7$ mV. O estudo de viabilidade celular foi realizado em células β tumorais pancreáticas (MIN 6) em diferentes concentrações e tempos usando o método MTS. Observamos uma redução da viabilidade celular somente em 72h em todas as concentrações. A avaliação da liberação sustentada do fármaco foi realizada através de estudos *in vivo*, com ratos Wistar machos diabéticos tipo 1, os resultados confirmaram que as nanopartículas contendo insulina apresentam liberação contínua e sustentada se comparadas a insulina não encapsulada. Além disso, verificamos que o tratamento com as nanopartículas contendo insulina não promoveram hepatotoxicidade, através da avaliação da morte celular (clivagem da caspase 3), e estresse oxidativo (catalase, superóxido dismutase e peroxiredoxina). O emprego do

Abstract

Diabetes Mellitus is a disease whose cases have increased due to the bad habits of life of society. Several strategies have been developed for the treatment of diabetes, especially the controlled release of drugs. The erroneous use of insulin as basal treatment of diabetes takes a problem, since the high dose of the drug can lead to severe hypoglycemia. The use of drug encapsulation by biocompatible and biodegradable polymers has been a good strategy for the controlled release of drugs, allowing the agent to be released on a continuous and sustained. In this context, the production and characterization of nanoparticles containing insulin are presented as a strategy of controlled release of this hormone. Thus, this project consisted of the preparation and characterization of biodegradable nanoparticles of poly (ϵ -caprolactone) (PCL) as a carrier of insulin and its application in vivo and in vitro. The nanoparticles were prepared by the method of double emulsion w / o / a and solvent evaporation. The characterization of nanoparticles was performed by Scanning Electron Microscope (SEM), observing and spherical nanoparticles with different sizes. The encapsulation efficiency was 90.6% (± 1.6), analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) via indirect. The average diameter of nanoparticles was 796 nm (PDI = 0.49) and zeta potential as measured by photon correlation spectroscopy (PCS) of -29.4 ± 2.7 mV. The cell viability was performed in tumoral pancreatic β cells (6 min) at different concentrations and times using the MTS. A decrease in cell viability only at 72 at all concentrations. The evaluation of sustained release of drug was performed by in vivo studies with male Wistar rats with type 1 diabetes, results confirmed that the nanoparticles containing insulin present continuous and sustained release as compared to non-encapsulated insulin. Furthermore, we found that treatment with nanoparticles containing insulin did not cause liver toxicity by evaluating cell death (caspase 3 cleavage), and oxidative stress (catalase, superoxide dismutase and peroxiredoxins). The use of insulin nanoencapsulated pharmacokinetic advantages over the use of insulin free, and no reported hepatotoxicity. Thus, our results add important values in the clinical treatment of type 1 diabetes, leading to a promising future in the use of these polymeric nanoparticles containing insulin.



1- Introdução

1.1- Diabetes *Mellitus*

O Diabetes *Mellitus* (DM) inclui-se num grupo de doenças metabólicas crônicas e é caracterizada pela alta concentração de glicose sanguínea (hiperglicemia), resultante da deficiência de insulina e/ou resistência à insulina.

Essa patologia é considerada a doença do século XXI, por ser a quarta principal causa de morte em países desenvolvidos e também, segundo alguns estudos, é considerada uma epidemia global acometendo cerca de 140 milhões de pessoas no mundo, porém apenas 50% dos casos têm diagnóstico confirmado. O sedentarismo e a obesidade estão diretamente associados ao abrupto aumento dos casos, visto que há uma desenfreada modificação do estilo de vida da população mundial (Zimmet *et al.*, 2001).

Roglic e colaboradores (2005) estimaram uma elevação absurda nos números de pessoas acometidas com o Diabetes. Em 2000, cerca de 2,9 milhões de pessoas morreram de complicações dessa injúria, totalizando 5,2% de todas as mortes do mundo (Roglic *et al.*, 2005). Dados do ano de 2000 demonstraram que o Brasil estava na oitava posição entre os países com maior número de pessoas doentes por causa do Diabetes, cerca de 4.6 milhões de pessoas e estima-se que em 2030 nosso país terá um aumento de 145% de casos, cerca de 11.3 milhões de doentes, levando o Brasil para o sexto na lista dos países com maior número de portadores da Diabetes (Figura 1). Nos países em desenvolvimento, a maioria dos casos de portadores está em torno de 45 e 64 anos em contraste com países desenvolvidos onde a idade dos portadores é acima de 64 anos. Em 2030, é estimado que as pessoas com idade maior que 64 anos diabéticas serão 82 milhões em países em desenvolvimento e 48 milhões em países desenvolvidos, o que pode ser observado na tabela 1 (Zimmet *et al.*, 2001; Wild, *et al.*, 2004).

Tabela 1- Lista de países com aumento do número de casos estimados de 2000 e 2030 (Adaptado de Wild, et al., 2004).

“Ranking”	2000		2030	
	Países	Portadores do Diabetes (milhões)	Países	Portadores do Diabetes (milhões)
1	Índia	31.7	Índia	79.4
2	China	20.8	China	42.3
3	Estados Unidos	17.7	Estados Unidos	30.3
4	Indonésia	8.4	Indonésia	21.3
5	Japão	6.8	Paquistão	13.9
6	Paquistão	5.2	Brasil	11.3
7	Rússia	4.6	Bangladesh	11.1
8	Brasil	4.6	Japão	8.9
9	Itália	4.3	Filipinas	7.8
10	Bangladesh	3.2	Egito	6.7

O aumento dos níveis de glicose sanguínea ocorre porque o fígado e o músculo esquelético não conseguem armazenar o glicogênio, de modo que os tecidos tornam-se incapazes de captar e utilizar a glicose. Ao ultrapassar o limiar renal para reabsorção, a glicose transborda na urina (glicosúria) acarretando a diurese osmótica (poliúria), que por sua vez resulta em desidratação e maior ingestão de líquidos (polidipsia). Ocorre também nessa patologia um desgaste protéico pela conversão de proteína em carboidratos e, pela ausência de insulina, ocorre cetose, que é o fracionamento das gorduras para acetil-CoA. Na ausência do metabolismo dos carboidratos, acetil-CoA é convertida para acetoacetato, β -hidroxibutirato e acetona (Contran *et al.*, 1994; Gilman *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2004).

Muitas consequências podem ocorrer devido aos distúrbios metabólicos observados no Diabetes, principalmente em longo prazo. Doenças dos vasos sanguíneos grandes (doença macrovascular), e pequenos (microangiopatias) são características peculiares da cronicidade (Oliveira *et al.*, 2004). A doença macrovascular deriva de ateroma acelerado, bem mais comum e grave em

pacientes diabéticos, enquanto as microangiopatias caracterizam o DM afetando particularmente retina e rins. A hipertensão coexistente está associada a dano renal progressivo, e seu tratamento torna mais lenta a progressão da nefropatia diabética.

A hiperglicemia, a dislipidemia, a hipertensão e o aumento de espécies reativas de oxigênio são alguns dos fatores que modificam o funcionamento endotelial, aumentando a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Nessas condições pode ocorrer o aparecimento de doenças como trombose, responsável por cerca de 80% das mortes de pacientes diabéticos, sendo 75% desta estatística relacionado a disfunções cardiovasculares (Lecker *et al.*, 2004; Ead, 2009).

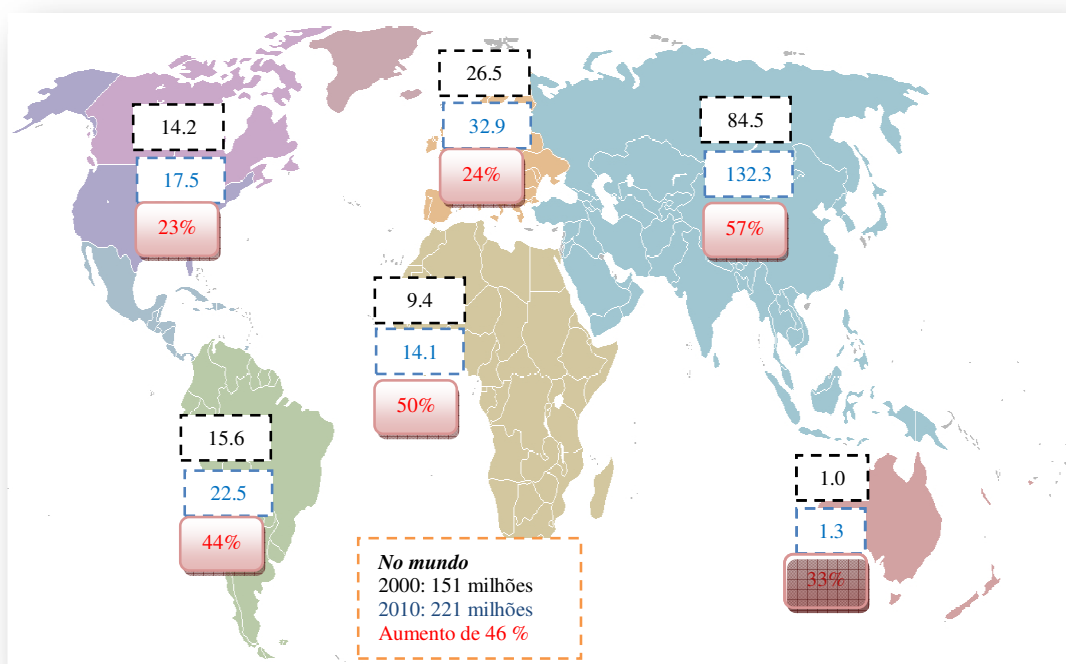


Figura 1- Número de portadores em diversos locais do mundo (valores em preto), referente ao ano 2000 e número de pessoas que estão acometidas em 2010 (valores em azul). Valores expressos em milhões, e percentual de aumento (valores em vermelho) respectivamente (Adaptado de Zimmet *et al.*, 2001; Kolb & Mandrup-Poulsen, 2010).

As principais formas de classificação atuais para o Diabetes são tipo 1 e 2, anteriormente descritos como insulino-dependente e não-insulino dependente, porém esses termos foram eliminados. Como terceiro e quarto tipo na classificação podemos citar Diabetes de outros tipos específicos e a Diabetes gestacional. No Diabetes tipo 1, ocorre deficiência absoluta de insulina, pela destruição das células β do pâncreas (figura 2), que geralmente ocorre por insulite auto-imune, condição na qual estão presentes auto-anticorpos circulantes (anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina), sendo esta forma da doença conhecida como tipo 1^a, ou menos comumente, de causa desconhecida. O tipo 1B, ou forma idiopática, é caracterizado pela ausência tanto de insulite quanto dos anticorpos relacionados ao Diabetes auto-imune. Contudo alguns subtipos desta forma possuem instalação e evolução fulminante (Contran *et al.*, 1994; Martins *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2002). Geralmente, a instalação desse quadro é abrupta, e caso o indivíduo não se trate com insulina ele pode ir a óbito por cetoacidose diabética, podendo também o indivíduo identificar o início da sintomatologia. O quadro de cetoacidose é a expressão máxima da deficiência da insulina e pode também ocorrer na presença de estresse infeccioso, ou de qualquer etiologia ou ser decorrente do uso inadequado da insulina. A incidência de portadores de Diabetes tipo 1 é dos 10 aos 14 anos de idade, havendo a seguir uma diminuição progressiva da incidência até os 35 anos. No entanto, indivíduos de qualquer idade pode desenvolver o Diabetes tipo 1. De modo geral os portadores apresentam índice de massa corpórea normal, mas a presença de obesidade não exclui o diagnóstico (Martins *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2002).

O Diabetes tipo 2 é mais frequente que o tipo 1, perfazendo 90% dos casos de Diabetes segundo Contran e colaboradores. Nesse tipo de Diabetes, ocorre tanto resistência à insulina quanto uma menor secreção desta, porém sua etiologia específica ainda não está totalmente esclarecida como no tipo 1. A destruição auto-imune das células pancreáticas não está envolvida, mas ao contrário dos portadores do Diabetes tipo 1, os pacientes com tipo 2 na sua maioria apresentam

obesidade. A incidência dos casos do tipo 2 é bastante variável, no entanto tem maior frequência após os 40 anos de idade, com pico de incidência ao redor dos 60 anos (Contran *et al.*, 1994; Oliveira *et al.* 2004; Ead, 2009).

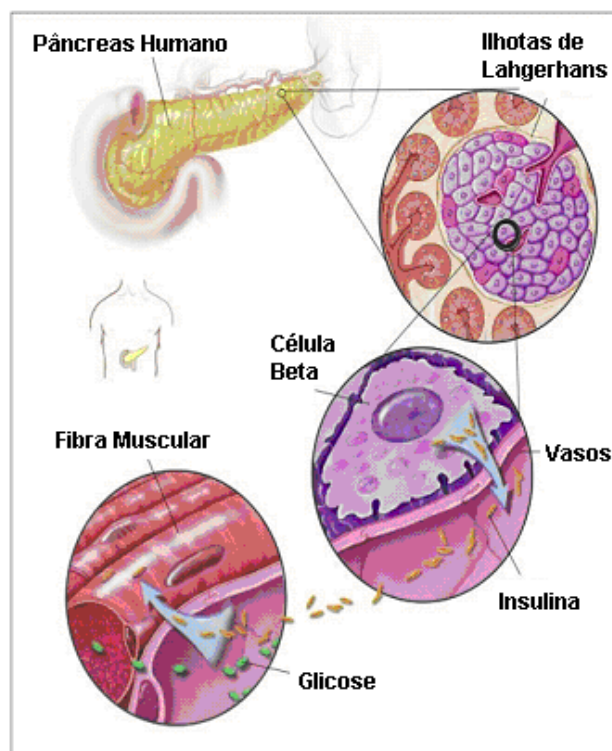


Figura 2- Produção de insulina no pâncreas humano. O pâncreas é localizado no abdomen, adjacente ao duodeno. As ilhotas de Langerhans representam a porção hormono-funcional do órgão, e nela se encontram as células beta, que produzem e secretam insulina. As células beta são localizadas adjacente a corrente sanguínea, e regulam a concentração de glicose no sangue, ajustando a liberação de insulina. Disponível em: < www.Diabetesmonitor.com/b379.htm>. Acesso em 20 agosto 2007.

A obesidade aliada à idade superior a 40 anos indicam o ponto de corte da idade como discriminatório entre os tipos de Diabetes, de outro modo a associação com a ausência de processos agudos de cetoacidose e idade acima de 20 anos são indicadores da presença do Diabetes tipo 2. Com isso a idade isoladamente parece não ser fator para definição da classificação, mas se aliada a variáveis como obesidade e ausência de cetoacidose podem sugerir o tipo do Diabetes. A cetoacidose pode ocorrer em ambos os tipos de Diabetes, mas em

situações diferenciadas; no tipo 1 essa é a característica principal pela deficiência insulínica, já no tipo 2 o portador pode ter episódios frequentes graves de infecções ou episódios agudos de patologias cerebrovasculares, levando em algumas ocasiões à cetoacidose. A tabela abaixo detalha os tipos de Diabetes e sua etiologia (tabela 2) (Gross, *et al.*, 2002; Ead, 2009).

Tabela 2- Classificação quanto à etiologia do *Diabetes Mellitus* (adaptado de Gross *et al.* 2002; Oliveira *et al.* 2004)

I. Diabetes tipo 1
· destruição das células beta G14 geralmente levando a quadro de deficiência completa de insulina
A. auto-imune
B. idiopático
II. Diabetes tipo 2
· variação de diminuição da secreção e resistência à insulina
III. Outros tipos específicos
A. defeitos genéticos na função da célula β pancreática
B. defeitos genéticos na ação da insulina
C. patologias do pâncreas exócrino
D. Endocrinopatias
E. Induções farmacológicas ou por produtos químicos
F. Infecções
G. Tipos incomuns de Diabetes imuno-mediado
IV. Diabetes gestacional
· graus variados de diminuição de tolerância a carboidratos, podendo persistir ou não após o parto

1.2- Insulina

A insulina é um polipeptídeo tem massa molecular de aproximadamente 6 KD, que consiste em duas cadeias peptídicas conectadas por duas ligações de

dissulfeto. Sua sequência de aminoácidos foi determinada por Sanger *et al.* em 1955 (figura 3). Ela é formada pela clivagem proteolítica de um precursor protéico maior, com uma única cadeia (massa molecular de aproximadamente 9 KD) denominada pró-insulina (Berg *et al.*, 2002; Gilman *et al.*, 1996). A proteólise remove um peptídeo de conexão, o peptídeo C, e a insulina assim produzida juntamente com o peptídeo C associado, é armazenado nos grânulos das células β . O principal fator que controla a síntese e a secreção de insulina é a concentração sanguínea de glicose. Seu efeito global é a conservação dos fornecimentos de combustíveis corporais. Seu efeito imediato mais óbvio consiste em reduzir o açúcar sanguíneo, refletindo sua função fisiológica geral de facilitar a capacitação, a utilização e o armazenamento da glicose, dos aminoácidos e das gorduras após uma refeição (Contran *et al.*, 1994; Gilman *et al.*, 1996; Berg *et al.*, 2002).



Figura 3- Estrutura química da insulina primária, sequência de aminoácidos. Disponível em: <<http://fai.unne.edu.ar/biologia/macromoleculas/figacro/3-15.gif>> Acesso em 14 agosto 2007.

O mecanismo de ação da insulina está relacionado à sua fixação a um receptor específico sobre a superfície das células-alvo. O receptor é um complexo glicoprotéico que consiste em duas subunidades α e duas subunidades β ligadas

por ligações dissulfeto. As subunidades α são completamente extracelulares e possuem local fixador para insulina, já as subunidades β manifestam atividade de tirosina-quinase, agindo sobre si mesmas (autofosforilação). Após interação com a insulina, esses receptores se agregam em cadeias, e os complexos insulina/receptor subsequentemente são internalizados em vesículas. A perda desses receptores da membrana celular seria a provável causa da resistência à insulina, porém este assunto ainda é controverso (Contran *et al.*, 1994; Gilman, *et al.*, 1996).

O tratamento com insulina é muito utilizado em pacientes diabéticos, seja tipo 1 ou tipo 2, sendo que em alguns casos há a necessidade da associação a outras drogas via oral (metformina, sulfoniluréias, tiazolidinedionas e inibidores da α -glicosidase como a acarbose), esses fármacos são de ação específica e sua associação tem grande auxílio a terapêutica:

- ❖ Metformina (biguadinas) – atuam no nível hepático e muscular, inibindo a liberação de glicose do fígado e aumentando a sensibilidade periférica à insulina, porém seu alvo molecular é pouco conhecido;
- ❖ Sulfoniluréias – tem ação nas células β pancreáticas elevando a secreção de insulina. O seu alvo molecular são os receptores sulfoniluréia – canal de K^+ ATP-dependente;
- ❖ Tiazolidinedionas (TZDs) – elevam a sensibilidade dos tecidos à insulina e seu alvo molecular é a PPAR γ ;
- ❖ Inibidores da α -glicosidade (acarbose) – tem atividade intestinal, diminuindo a absorção de carboidratos; alvo molecular é a α -glicosidade.

O potencial dos fármacos anti-diabéticos são extremamente explorados, mas há algumas limitações para seu uso, tais como:

- ❖ Uma grande intensidade do uso da própria insulina pode agravar a resistência a insulina;

- ❖ Alguns portadores de Diabetes tipo 2 não apresentam controle glicêmico com utilização dos agentes de ação específica;
- ❖ Ou pode ainda ocorrer um não restabelecimento normal da sensibilidade à insulina ou do funcionamento das células β .

Durante muitos anos admitiu-se que a normalização da glicose plasmática poderia prevenir as complicações diabéticas, e isso foi provado há pouco mais de 10 anos pela *American Diabetes Association*, pois pacientes submetidos a um controle intensivo mantinham concentrações médias mais baixas de glicose sanguínea (2,8 mmol/l mais baixas) comparados com pacientes submetidos a um controle convencional, e apresentam uma redução substancial na ocorrência e progressão da retinopatia, nefropatia e neuropatia (Contran *et al.*, 1994; Gilman *et al.*, 1996; Marins *et al.*, 2003; Emilen *et al.*, 1999; Bailey *et al.*, 2000).

Avanços na terapia com insulina foram desencadeados por desenvolvimentos biotecnológicos. A insulina *lispro*, primeiro análogo da insulina sintetizado teve seu início de utilização em 1996 nos Estados Unidos e Europa, comparada à insulina regular a *lispro* apresenta vantagens como: ação mais rápida (cerca de 15 min. após sua administração), pico menor de concentração de insulina e diminuição expressiva em reações alérgicas (Emilien *et al.*, 1999).

1.3- Nanopartículas

Os estudos de nanopartículas como carreadores coloidais de agentes terapêuticos têm aumentado nas últimas décadas, pois esses sistemas aumentam a eficácia e/ou reduzem a toxicidade de drogas. Nanopartículas são sistemas coloidais submicrométricos, geralmente na faixa de 1 a 1000 nm. Suas vantagens como carreadores de drogas devem-se ao tamanho sub-celular, a biocompatibilidade com tecidos e células e à versatilidade de formulações. Elas são administradas por injeção direta em tecidos biológicos ou órgãos, em cavidades do organismo, ou por infusão intravenosa (Schaffazick, *et al.*, 2003; Cui, *et al.*, 2006; Durán *et al.*, 2006). O termo nanopartículas inclui as nanocápsulas e

as nanoesferas (figura 4), as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural; as nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas não apresentam uma fase oleosa em sua composição, são apenas formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Schaffazick *et al.*, 2003).

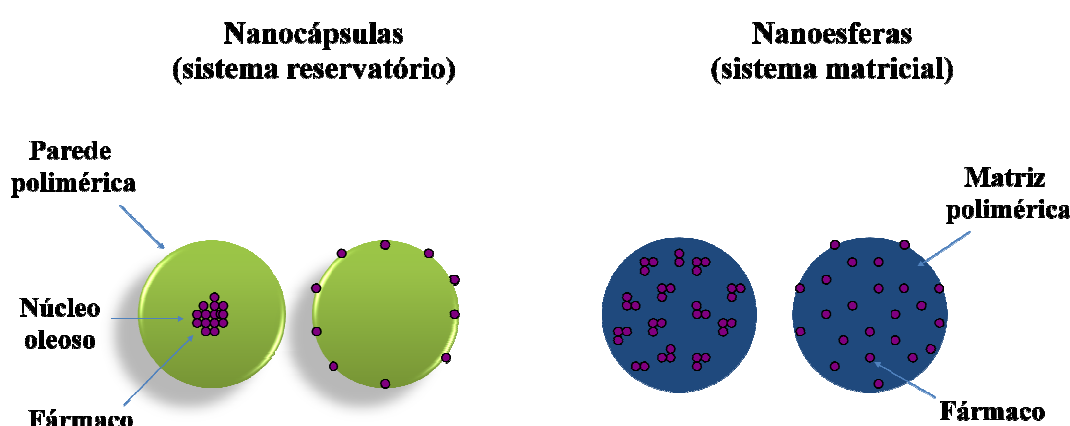


Figura 4- Diferenças estruturais entre nanocápsulas e nanoesferas (adaptado de Schaffazick *et al.*, 2003)

Porém, a aplicação dessa tecnologia (microesferas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas) têm suas restrições físicoquímicas e fisiológicas, porque os polímeros usados devem ser biocompatíveis e biodegradáveis a metabólitos inócuos ao organismo. Para a liberação controlada do fármaco, o polímero usado tem fundamental importância, e isso pode ocorrer de três formas: 1) por sistemas difusos, onde a liberação da droga é feita por difusão através da membrana polimérica; 2) por sistemas erosivos, onde a liberação é baseada na erosão ou biodegradação do polímero e 3) por combinação de ambos os mecanismos. Na administração parenteral de drogas os sistemas biodegradáveis têm mostrado grande utilidade (Durán *et al.*, 2006). Na biodegradação o uso de micropartículas tem sido proposto, no entanto os maiores problemas encontrados

são o tamanho e a natureza dessas partículas que devem ser biocompatíveis e muito pequenas para evitar embolismo. A liberação total do polímero após eliminação do princípio ativo tem a vantagem de dispensar o inconveniente da intervenção cirúrgica para a remoção de implantes (Durán *et al.*, 2006; Grenha *et al.*, 2007; Soppimath *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2006).

Há algumas restrições físicoquímicas e biológicas quanto aos polímeros utilizados na preparação desses sistemas, dentre elas que sejam biodegradáveis e biocompatíveis e seus metabólitos inócuos ao organismo. Os polímeros são macromoléculas de elevada massa molecular, formadas a partir de unidades estruturais menores (monômeros) através de reações químicas de polimerização. Grau de polimerização é o número de unidades estruturais repetidas numa macromolécula. Em geral, os polímeros contêm os mesmos elementos nas mesmas proporções relativas que seus monômeros, mas em maior quantidade absoluta. Os polímeros biodegradáveis são aqueles nos quais a quebra das cadeias resulta em unidades monoméricas com peso molecular suficientemente pequeno para serem eliminadas pelas vias metabólicas normais, como por exemplo, ácido láctico, ácido glicólico, e o dióxido de carbono (Reis *et al.*, 2006; Schaffazick *et al.*, 2003).

O papel da modulação exercida pelos polímeros na caracterização das nanopartículas é bem diferente do papel dos excipientes inertes em formulações farmacêuticas. Os polímeros influenciam diretamente na liberação do princípio ativo, na estabilização da droga no organismo e na toxicidade. Esses polímeros têm características peculiares por serem: biodegradáveis (a degradação é mediada, total ou parcial por um sistema biológico), bioabsorvível (o polímero pode ser assimilado por um sistema biológico), bioreabsorvíveis ou bioerodíveis (ocorre processo de dissolução ou desgaste da superfície de um material polimérico).

Os materiais poliméricos podem ser degradados de muitas formas, como erosão e degradação. Na erosão ocorre quebra da unidade monomérica localizada na extremidade da cadeia, enquanto na degradação, ocorre

transferência aleatória ou clivagem de ligações ao longo da cadeia polimérica (Figura 5). A quebra dos polímeros pode ser aleatória se for mediada por enzimas. Esses materiais diferem-se na velocidade e forma de degradação de acordo com a energia necessária para ocorrer a quebra, o que irá depender da ocorrência de ligação covalente na cadeia principal ou de grupos não hidrolisáveis, o que aumenta o tempo para sua degradação (Durán *et al.* 2006).

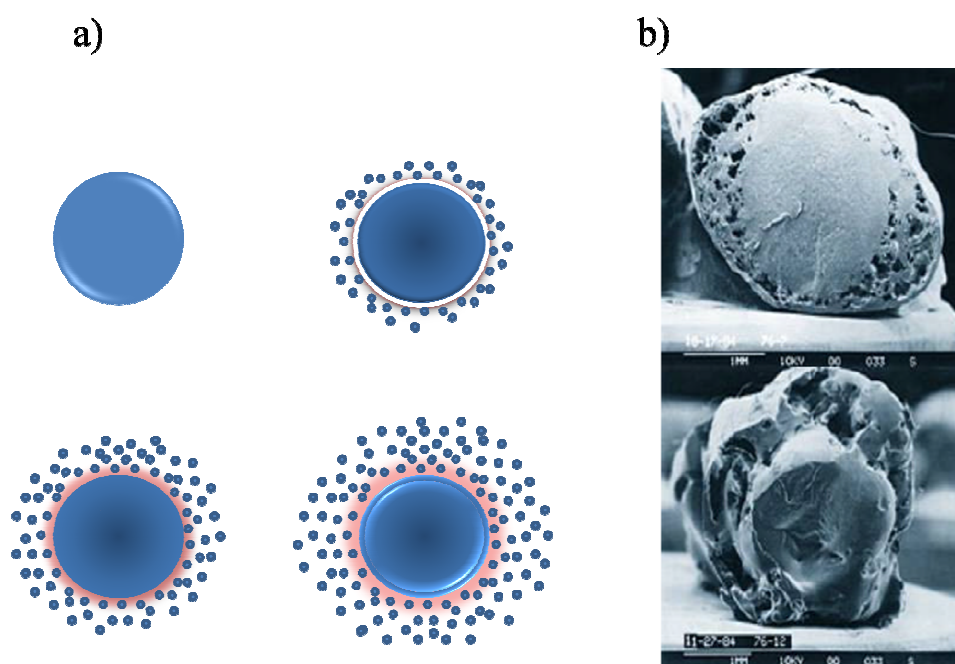


Figura 5- Processo de degradação de materiais poliméricos, a) processo de difusão e b) processo erosivo (adaptado de Durán *et al.* 2006).

Durante a formação da maioria dos polímeros biodegradáveis ocorre acoplamento de grupos hidroláveis (amida, éster, uréia e uretano) ao longo da cadeia carbônica. Portanto, muitos polímeros que utilizam ligações de ésteres, em especial poliésteres alifáticos, estão sendo bem usados na classe médica. Esses poliésteres são degradados enzimaticamente ou por hidrólise da ligação éster, ou por combinação das duas formas. Alguns fatores como composição química, mecanismo de hidrólise, fatores físico-químicos, características físicas,

temperatura, entre outros, podem influenciar negativamente na modulação dos poliésteres alifáticos (Durán *et al.*, 2006; Grenha *et al.*, 2007; Johsen *et al.*, 2007).

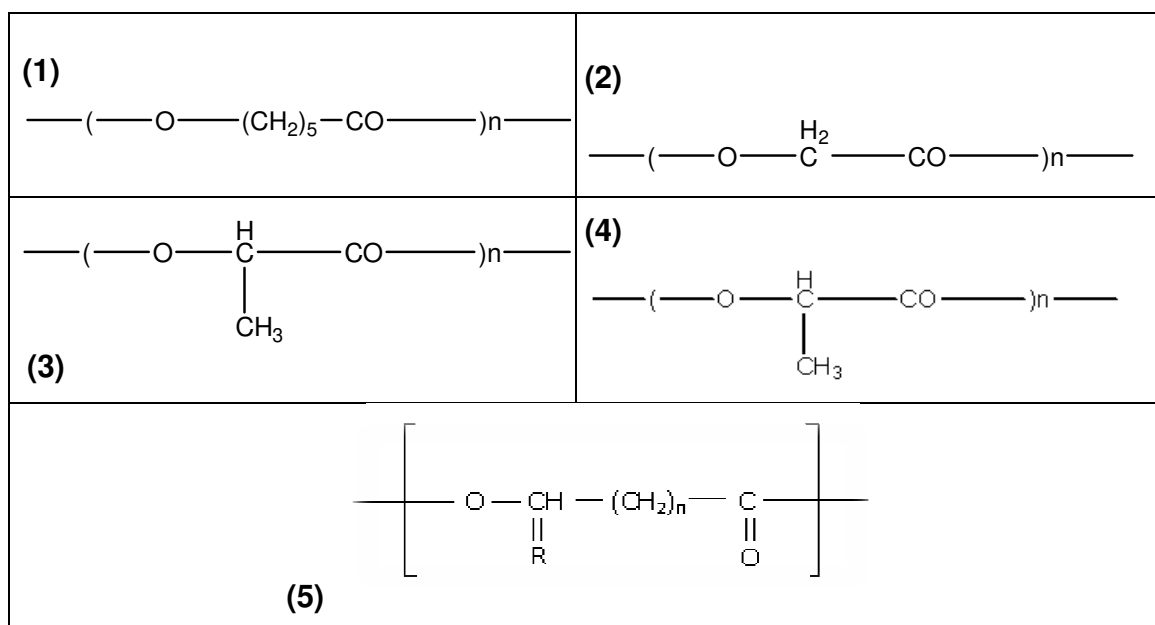


Figura 6- Estrutura de alguns monômeros, constituinte primário de todos os polímeros: (1) poli-ε-caprolactona (PCL), (2) poliglicolato (PGA), (3) polilactato (PLA), (4) co-polímero de lactato e glicolato (PLGA) e (5) polihidroxialcanoato (PHA).

Há muitos polímeros alifáticos, de grande interesse para o desenvolvimento de nanopartículas. O polilactato (PLA), poliglicolato (PGA) e um co-polímero do poliglicolato, o PLGA fazem parte do grupo de homopolímeros de ácido láctico, podendo ser lactato ou glicolato (Figura 6). Esses polímeros derivados do ácido láctico e glicólico estão em destaque por ter aprovação da FDA (*USA Food and Drug Administration*), para serem usados em humanos, principalmente como fios cirúrgicos para suturas que são reabsorvidos pelo organismo. O poli-ε-caprolactato (PCL) é estudado desde a década de 30, pela facilidade da ε-caprolactona sofrer polimerização por abertura de anel. A identificação do PCL como produto biodegradável emergiu, principalmente, por resultado de estudos que mostram que a PCL é mais resistente à hidrólise química e se degrada mais lentamente que os polímeros PLA e PLGA, sendo mais adequado para liberação de longo

prazo. Existem também os polihidroxialcanoatos (PHA), que constituem uma categoria de poliésteres de ácidos hidroxi-alcanóicos biodegradáveis. A produção de PHA é feita por processo biotecnológico: após uma fase de crescimento da bactéria produtora, esta é mantida sob condições favoráveis à formação de biopolímero, ou seja, excesso de fonte de carbono e limitação de nutriente essencial ao crescimento. Após produção biotecnológica dos PHA estes devem ser extraídos do interior das células bacterianas. Esses polímeros também podem ser produzidos *in vitro* por enzimas bacterianas purificadas e substratos puros, porém há elevação dos custos (Durán *et al.*, 2006).

1.4- Nanopartículas de insulina em modelo experimental de Diabetes

A utilização do modelo animal para o estudo das nanopartículas de insulina é de grande valor, pois possibilitará a análise de parâmetros que não podem ser realizados em humanos, como a indução do Diabetes. Estudos atuais descrevem modelos animais de Diabetes utilizando camundongos e ratos (Cui *et al.*, 2006; Lin *et al.* 2007). Trabalhos recentes de preparação das nanopartículas poliméricas de insulina são encontrados na literatura e o método de preparação mais empregado é o da dupla emulsão, utilizando o PCL ou PLA como polímeros (Grenha *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007, Rieux *et al.*, 2006).

A preparação de nanopartículas poliméricas de insulina utilizando-se o PCL, que é um polímero biodegradável e biocompatível, pode levar a um aumento da meia-vida do fármaco no organismo dos animais diabéticos, o que traria maior conforto no tratamento e amenizaria os efeitos tóxicos que o uso clínico a longo prazo da droga promove (Duran *et al.*, 2006; Grenha *et al.*, 2007; Rieux *et al.*, 2006).

1.5- Hepatotoxicidade farmacológica

Alguns fármacos empregados rotineiramente na clínica geram reações adversas, e muitas vezes alterações hepáticas o que limita seus benefícios e utilização. Existem basicamente seis tipos de alterações hepáticas induzidas por medicamentos, afetando a morfologia e função do órgão, são elas:

- ❖ respostas citolíticas direcionadas às células T, que posteriormente levam a produção e liberação de citocinas inflamatórias e à instalação de um processo inflamatório, e promovendo hepatotoxicidade mediada por neutrófilos;
- ❖ citotoxicidade mediada por anticorpos, que pode ocasionar a biotransformação farmacológica, ou seja, formação de produtos inativos. Essas moléculas formadas são grandes o bastante para serem alvos imunológicos, e migrar para a superfície dos hepatócitos induzindo a formação de anticorpos;
- ❖ alterações nas enzimas do citocromo P-450 podem levar a modificações da homeostase dos canais de cálcio intracelulares com consequente ruptura das fibrilas de actina da superfície das células hepáticas e finalmente lise celular;
- ❖ interação fármaco/proteínas exportadoras de sais biliares, o fármaco se liga a essas proteínas e provoca a interrupção do fluxo biliar;
- ❖ apoptose ou morte celular programada derivada de agregação imunológica, a qual destrói os hepatócitos pelas vias do TNF e da Fas que culminam com a ativação de caspases efetoras e consequente fragmentação da cromatina celular;
- ❖ esteatose hepática causada por estresse oxidativo Quando a medicação interage negativamente com as mitocôndrias, agredindo-as por inativação, ligação a enzimas respiratórias ou ao DNA mitocondrial, há uma desregulação da oxidação dos ácidos graxos e na produção da ATP, aumentando as espécies reativas de oxigênio.

Esses fatores conjunta ou isoladamente, causam danos hepáticos de graus variados, sendo que, os principais responsáveis da hepatotoxicidade são os metabólitos farmacológicos, e não os fármacos em si.

Especial atenção deve ser dada para identificação de fatores causadores de risco do desenvolvimento de reações adversas a fármacos, de acordo com a interação fármaco-fármaco ou até mesmo fármaco-patologia. Em geral, esses efeitos ocorrem em pacientes com co-morbididades hepáticas, como hepatites virais ou alcoólicas, pela perda da massa funcional do órgão (Maddrey, 2005; Deng *et al.*, 2009; Norris *et al.*, 2008; Jaeschke *et al.*, 2002)

1.5.1 Caspase 3

Apoptose ou morte celular programada é um tipo de morte celular ativa que requer energia, síntese e degradação protéicas e é induzida pela ativação de um programa intrínseco celular. Trata-se de um mecanismo fisiológico de controle celular que regula diversos mecanismos no organismo como, por exemplo, o tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose.

A apoptose está diretamente ligada à concentração e ativação de caspases, que são proteases específicas que clivam ligantes também específicos em uma série de proteínas celulares. Caspases que clivam substratos selecionados para produzir as mudanças associadas à morte celular são conhecidas como efetoras (caspases 3, 6 e 7). Os efeitos da ação dessas caspases distinguem a apoptose de outras formas de morte celular. Na maioria dos casos as efetoras são iniciadas pelas caspases ativadoras (caspases 8, 9 e 10) (figura 7). De modo geral, nas células dos mamíferos há um mínimo de duas etapas na cascata proteolítica para o progresso da morte celular (Boatright *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2008).

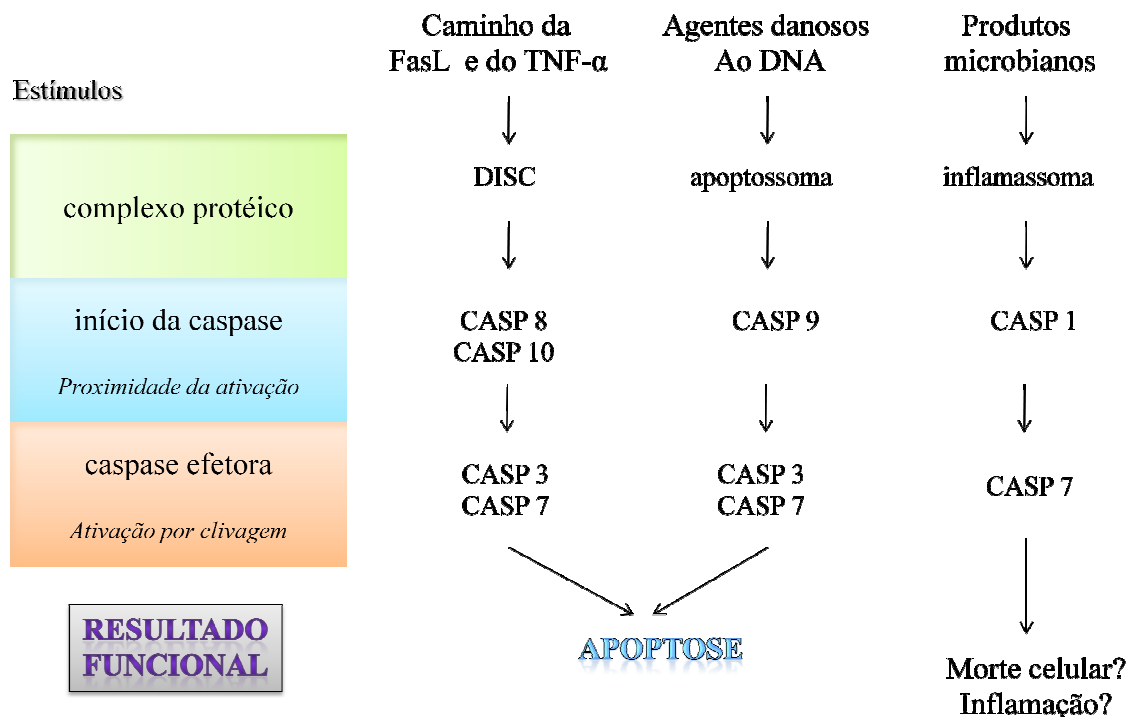


Figura 7- Resumo esquemático dos mecanismos de ativação das caspases. A cascata de ativação das caspases é realizada em dois tempos, primeiramente com as caspases inicializadoras (caspases 1, 8, 9, 10) sendo ativadas por grandes complexos de proteínas citosólicas por auto-ativação. As caspases 8 e 10 são acionadas pelo complexo sinalizador de indução da morte ("DISC") após estimulação do receptor de morte, caspase 9 ativada pelo apoptossoma em resposta a estresse gênico e caspase 1 em condições inflamatórias. Num segundo momento, a ativação direta da caspase 3 e/ou 7 leva a apoptose ou inflamação e há aumento da aderência de complexos específicos e substratos. (Adaptado de Lamkanfi e Kanneganti, 2010).

1.5.2- Estresse oxidativo

O processo oxidativo é caracterizado pela remoção e/ou redução do ganho de elétrons. Quimicamente, um radical livre pode agir como um agente oxidante por roubar elétrons de outras espécies ou como um agente redutor por doar elétron para outras espécies. Os radicais livres são espécies que contém um ou mais elétrons pareados, ou seja, elétrons livres ocupando um orbital atômica ou molecular; e uma vez que os elétrons são mais estáveis quando pareados nos orbitais, os radicais livres geralmente reagem com outras espécies (elétrons não pareados têm a tendência de formar pares estáveis). Com isso cada radical

poderia doar elétrons não pareados para outra molécula, ou poderia tirar um elétron de outra molécula na sequência para parear. Concluindo o processo, quando um radical doa um elétron ou recebe um elétron de outra molécula, esta torna-se um radical, podendo ocorrer uma reação em cadeia.

A terminologia antioxidante é conceituada como qualquer substância que quando em concentrações baixas comparado a um substrato oxidante, retarda ou previne a oxidação desse substrato; já as substâncias pró-oxidativas são distintas para substância com poder de induzir estresse oxidativo, ou qualquer substância com poder de gerar espécies reativas. O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo inclusive ocasionar a morte celular. Essa lesão oxidativa é definida então pelo desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes em favor das substâncias oxidantes, levando a um quadro de dano celular (Kubota *et al.*, 2001; Cultler, 2005; Chelikani *et al.*, 2004).

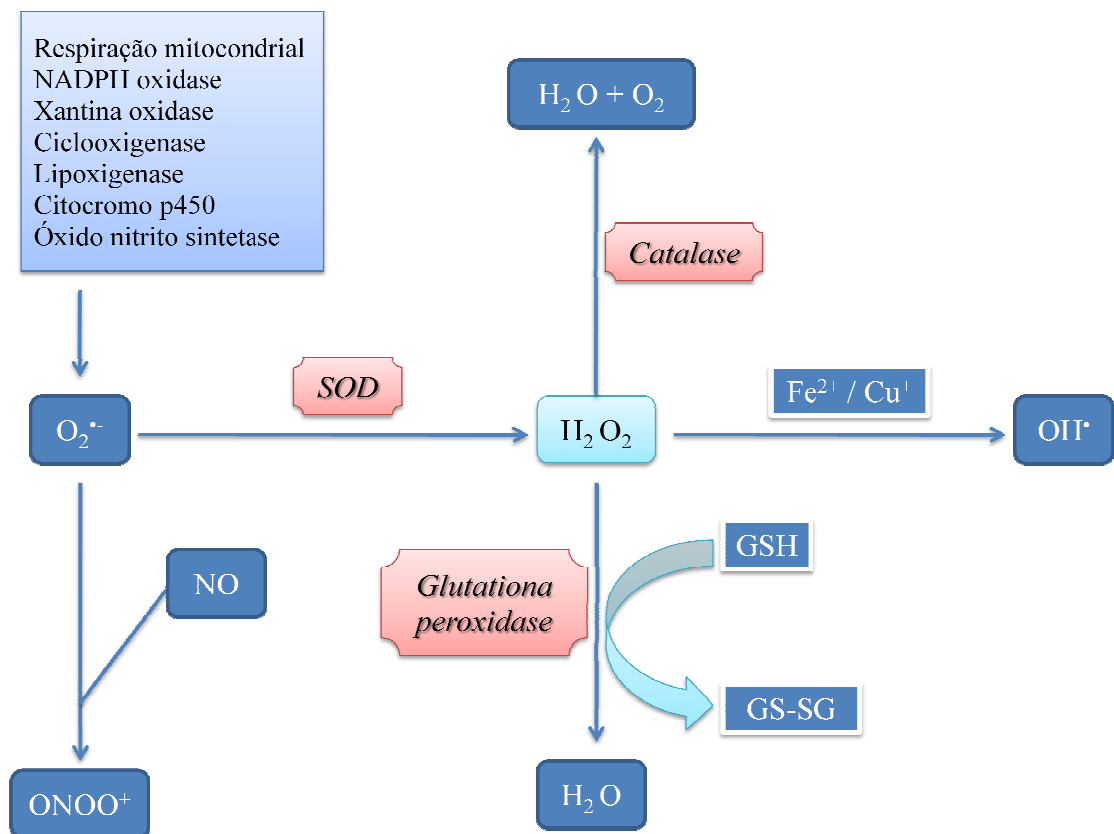


Figura 8- Reações pró-oxidantes e antioxidantes mais relevantes para sistemas biológicos. O superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido de inúmeras ações surgidas de espécies reativas. $O_2^{\bullet-}$ reage rapidamente com o óxido nítrico (NO) para produzir peróxinitrito ($ONOO^+$) ou é catalisado pelo superóxido dismutase (SOD) para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2). H_2O_2 pode ser neutralizado pela catalase ou pela glutatona peroxidase. Contudo, na presença de metais de transição, como o ferro (Fe^{2+}) e o cobre (Cu^+), os radicais livres ($OH^{\bullet}$), altamente tóxico, podem ser produzidos por H_2O_2 via reação. Espécies reativas são mostradas em azul, as enzimas antioxidantes em tom avermelhado (Kubota *et al.*, 2001).

No contexto fisiológico ou em desordens celulares há três diferentes classes de espécies reativas de interesse biológico: as espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies de nitrogênio e de cloro. As espécies reativas podem ser ou não radicais livres, portanto o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são ERO radical e não-radical, respectivamente. Dentre as espécies reativas, o radical livre ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) tem grande importância por ser a primeira ERO a ser produzida pelas células, mas outras espécies como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) são derivados

do $O_2^{\cdot-}$ como produto de uma reação em cadeia. Portanto o $O_2^{\cdot-}$ pode ser produzido pela corrente de transporte de elétrons mitocondrial, NADPH oxidase, xantina oxidase, cicloxigenase, lipogenase, óxido nítrico sintase e citocromo P450 (Kubota *et al.*, 2001).

Os principais meios de defesa antioxidante no organismo podem ser divididos em dois grupos, enzimáticos e não-enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathiona, particularmente a glutathiona peroxidase. Outras enzimas, como a glutathiona redutase e a glicose-6-fosfato-desidrogenase, também promovem propriedades enzimáticas antioxidantes. Outros sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes operando em conjunto com as enzimas citadas anteriormente incluem a superóxido dismutase (SOD), dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofatores, onde ocorre a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, bem como a catalase, que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular nas hemácias. A SOD é um agente de defesa contra os superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), enquanto as enzimas catalase e peroxidase atuam sobre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (figura 8). Deste modo decidiu-se estudar a expressão dessas enzimas no fígado dos ratos tratados com a insulina nanoencapsulada ou livre para avaliar a ocorrência ou não de hepatotoxicidade induzida por estresse oxidativo (Kubota *et al.*, 2001; Cultler, 2005; Chelikani *et al.*, 2004; Peskin *et al.*, 2000; Rojkind, *et al.*, 2002).

2- Objetivos

Geral

Preparar e avaliar as características físico-químicas de nanopartículas poliméricas contendo insulina, bem como suas atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*.

Específicos

Avaliar:

- ❖ Possíveis efeitos citotóxicos *in vitro* da formulação de nanopartículas em células β pancreáticas de linhagem MIN 6;
- ❖ Liberação controlada do ativo em animais previamente induzidos ao diabetes;
- ❖ Efeito fisiológico (hipoglicemiante) das nanopartículas contendo insulina;
- ❖ Expressão da caspase 3 em células MIN 6 e em tecidos (fígado) de ratos após 48 horas de tratamento com as formulações de nanopartículas contendo insulina e insulina livre;
- ❖ Expressão de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido-desmutases e glutational peroxidase) em fígado dos animais tratados e não tratados.



3- Materiais e métodos

3.1- Preparação de nanopartículas de insulina

Na técnica de emulsificação/evaporação de solvente, utiliza-se polímeros pré-formados como PCL no encapsulamento de um ativo, no caso a insulina, cujas características e propriedades físicoquímicas e biológicas são bem conhecidas. Agentes ativos incorporam-se nas nanopartículas de diferentes modos, dentro delas durante o processo de fabricação ou na superfície de nanopartículas já formadas, sendo a droga adsorvida ou ligada quimicamente.

A técnica de emulsificação/evaporação de solvente foi utilizada na formação das nanopartículas, e é um método simples, porém deve ser feita em condições assépticas para garantia da qualidade do produto final. Poli- ϵ -caprolactona (0,05 g) (Aldrich) e um agente emulsificante, o Span 60 (0,012 g) (Aldrich), foram dissolvidos em diclorometano (CH_2Cl_2) 6 mL, solvente volátil e imiscível em água (P.M.= 84,93). A fase orgânica foi vertida em uma fase aquosa, a própria insulina humana *Humulin regular* (Lylli), 100 μl ou 600 μl , contendo 10 U.I. e 60 U.I., respectivamente. Essa formulação, contendo a fase aquosa e a orgânica, foi levada ao homogenizador de alta eficiência, o Ultra-turrax T 18 basic IRA® Labotechnik, a 11.000 r.p.m. por 20 segundos. Nessa emulsão foi vertida uma segunda fase aquosa contendo tampão fosfato (100 ml), Pluronic F68 (0,12 g) (Oxiten). Em seguida, a mistura contendo as duas fases aquosas e a fase orgânica foi levada mais uma vez ao homogenizador a 3.000 r.p.m. por 40 segundos (Figura 9). Depois da formação da nanoemulsão, o solvente difunde-se na parte externa (extração da fase aquosa), até sua saturação. Com a evaporação do solvente sob pressão reduzida interface fase aquosa é re-estabelecido o gradiente de concentração. Seguida a eliminação dos solventes, o polímero precipita-se levando a formação das nanopartículas (nanoesferas). A fase de evaporação foi acelerada por pressão reduzida (bomba de vácuo); após essa fase a formulação foi levada a liofilização para estocagem no liofilizador do modelo LB 3.000 TT (Terroni-Fauvel) por 24h (Cui *et al.*, 2006; Grenha *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2007).

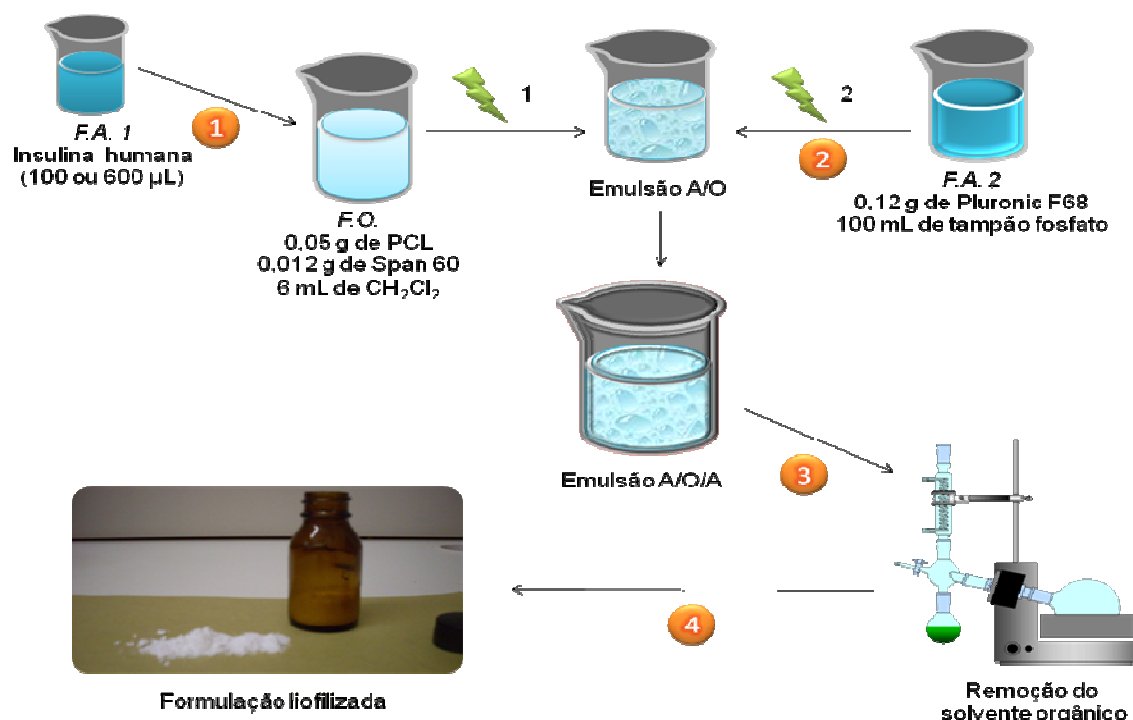


Figura 9- Modelo experimental para preparação de nanopartículas poliméricas no método de dupla emulsão. F.A. 1 e 2 representam a fase aquosa e F.O. a fase orgânica ou fase oleosa, por isso a emulsão primária é do tipo água em óleo (A/O), já a segunda emulsão é do tipo água, óleo em água (A/O/A). A F.A. 1 contém apenas o fármaco em diferentes concentrações, para duas formulações distintas; a F.O. contém o polímero biodegradável e biocompatível (poli- ϵ -caprolactona), Span 60 dissolvidos em diclorometano (CH_2Cl_2) e a F.A. 2 contém poly(ethylene glycol)-block-poly(propylene glycol)-block-poly(ethylene glycol) (Pluronic F68) em tampão fosfato. Os números em laranja representam as fases experimentais: (1) F.A. 1 vertida numa F.O., (2) F.A. 2 vertida nessa formulação contendo a F.A. 1 e a F.O., formando uma emulsão A/O/A, (3) formulação levada ao processo de remoção do solvente orgânico e por fim a fase (4) que é a fase de liofilização das amostras. Os raios em verde representam a utilização de um homogenizador de alta eficiência em 11.000 r.p.m. por 20 segundos e 3.000 r.p.m. por 40 segundos.

3.2- Caracterização das nanopartículas de insulina

3.2.1- Determinação da eficiência de encapsulamento

O conteúdo total de ativo encapsulado foi determinado empregando-se o método de ultrafiltração/centrifugação. Nesse método, 500 µL de suspensão aquosa de nanopartículas foi colocado num Eppendorf e centrifugado duas vezes por 10 minutos a 4.000 r.p.m. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,45 µm (Millipore Microcon 100), obtendo-se assim, o sobrenadante puro e livre de nanopartículas. A concentração de insulina no sobrenadante aquoso representa a insulina não associada às nanopartículas, e foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Utilizamos uma coluna C18 em temperatura ambiente. Como fase móvel, utilizou-se 30% de acetonitrila, em água deionizada acidificada com ácido ortofosfórico até pH 2,5.

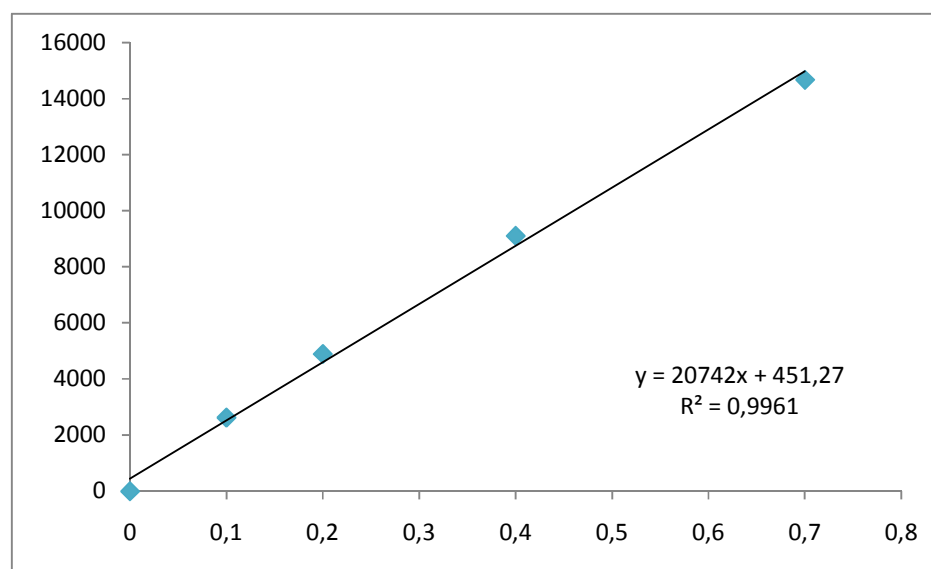


Figura 10- Curva de calibração da técnica analítica por CLAE (experimento realizado em triplicata). As concentrações utilizadas foram 0,1; 0,4; 0,7; 0,8 e 1 µL/mL com os seguintes resultados de área do pico: 198,925; 875,609; 1507,905; 1780,867 e 2253,025.

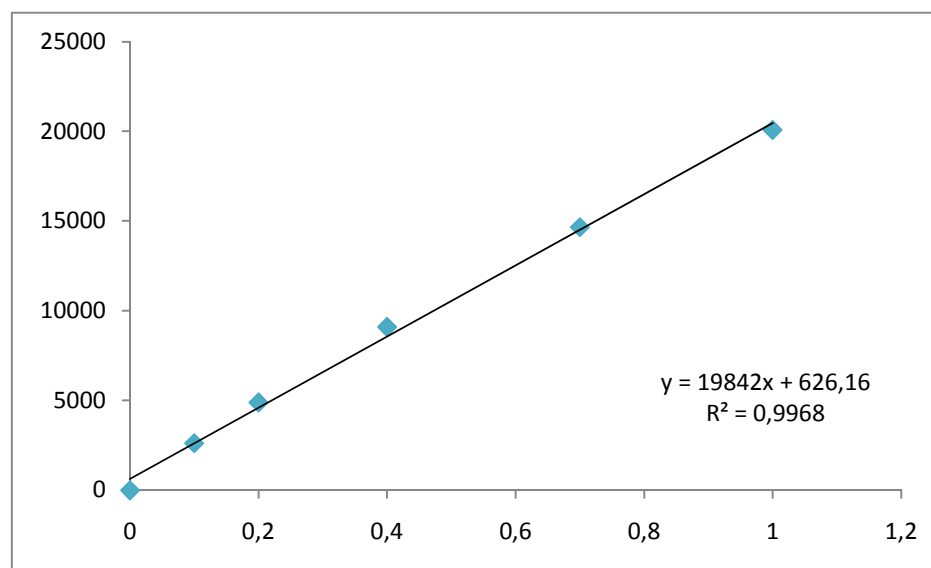


Figura 11- Curva de reprodutibilidade da técnica analítica (experimento realizado em triplicata). As concentrações utilizadas foram 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1 µL/mL com os seguintes resultados de área do pico: 2626,673; 4895,978; 9104,674; 16788,954 e 20083,850.

A amostra resultante do sobrenadante (200 µl) foi injetado no cromatógrafo acoplado a um detector UV em comprimento de onda a 205 nm e fluxo constante de 1,4 ml/min⁻¹. A quantidade de insulina encapsulada foi determinado pela concentração inicial de droga utilizada e o conteúdo quantificado no CLAE, através da curva de calibração previamente estabelecida (em concentrações de 0,1 a 2 µg/mL⁻¹) (figura 10).

A quantificação do sobrenadante retrata a quantidade de insulina livre, com a diferença do total utilizado no início da preparação das nanopartículas e o encontrado pela injeção no CLAE obtemos a real efetividade de encapsulamento. O método foi realizado num aparelho Shimadzu, bomba LC 20, coluna C 18 de 205 x 4,6 mm e detector UV. A metodologia foi reproduzida num aparelho Waters 600 E, com detector Waters 484 (“tunable absorbance detector”) produzindo também uma segunda curva de calibração (figura 11).

3.2.2- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As partículas foram caracterizadas quanto à morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A MEV é uma técnica capaz de produzir imagens de alta ampliação, de até 300.000 vezes e com ótima resolução. As imagens fornecidas pela MEV possuem um caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz a qual estamos habitualmente acostumados.

O funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 kV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes dos elétrons atingirem a amostra analisada.

Uma pequena quantidade de partículas, previamente lavadas por duas vezes, por processos de centrifugação a 4.000 r.p.m. por 10 min, foi adicionada a uma fita de carbono fixada em uma porta-amostra de latão. Em seguida, as amostras foram metalizadas com Au/Pd (ouro/chumbo) pelo processo de *Sputtering* (evaporação do metal e deposição de uma fina camada – 10nm – sobre a amostra), utilizando-se um metalizador BAL-TEC. As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6360LV, utilizando-se uma tensão de aceleração de 15 kV e detectores de elétrons secundários e elétrons retroespalhados.

3.2.3- Tamanho médio, distribuição de tamanho das partículas e potencial zeta

O diâmetro médio das nanopartículas e a distribuição das partículas (polidispersidade) em suspensão foi determinado por espectroscopia de auto-correlação da difusão de raio monocromático laser, no aparelho Zetasizer Nano ZS da Malven Instruments. Nessa técnica, mede-se a série temporal de intensidade espalhada por uma dispersão, que permite calcular o coeficiente de difusão e o diâmetro médio das partículas. O potencial zeta das nanopartículas foi determinado por mobilidade eletroforética, depois de diluição apropriada em KCl (1m/mol L^{-1}), no mesmo aparelho acima citado. As aferições foram realizadas em triplicata em temperatura ambiente.

3.3- Cultura de células

A linhagem de células tumorais pancreáticas (MIN6), cedida pelo Dr. Y. Oka e o prof. J.-I. Miyazaki (Tóquio, Japão), foi mantida em meio por Dulbecco's modificado (DMEM), contendo 11 mmol/L de glicose (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 U.I. de penicilina/mL (Sigma) e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Sigma). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO_2 , durante uma noite (overnight). A linhagem celular foi utilizada para os testes ao atingir 90% do índice de confluência. Em placas de 96 poços utilizamos $5 \times 10^4/100\mu\text{L}$ para o MTS (3-(4,5-dimetiltioazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio), e 1.5×10^5 para avaliação da morte celular.

3.3.1- Citotoxicidade das formulações

Os estudos de citotoxicidade foram realizados em placas de 96 poços, e as células foram tratadas com as nanopartículas. Os tratamentos foram baseados nas concentrações utilizadas em humanos (observando a quantidade celular para cada poço, a quantidade celular encontrada no organismo humano, e a dose de nanopartículas de insulina utilizada para o tratamento). Diferentes concentrações do composto (112, 225 e 550 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) foram utilizadas para determinar uma possível citotoxicidade em períodos variados (6, 24 e 72h) de tratamento com as nanopartículas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A taxa de sobrevivência celular foi quantificada por Elisa através do MTS. O MTS é um teste usado rotineiramente em vários laboratórios para determinar a citotoxicidade no sobrenadante de culturas celulares. O teste detecta células vivas, mas não células mortas e o sinal gerado é dependente do grau de ativação das células. Este método pode, portanto, ser utilizado para medir a citotoxicidade, proliferação ou ativação. Os resultados foram lidos num leitor de ELISA, e mostram alto grau de precisão. A principal vantagem da utilização desse método é a sua rapidez e precisão, bem como a não utilização de radioisótopos. Com esses benefícios a citotoxicidade foi realizada pelo teste de MTS. As placas de 96 poços contendo a linhagem proposta foram expostas a 100 μL de solução de Krebs contendo o composto MTS, de acordo com as instruções do fabricante (MTS Solution Cell Titer 96® - Promega). O composto MTS foi bioreduzido pelas células em um produto colorido, o formazan. Essa aferição foi realizada com absorbância de 490 nm no leitor de Elisa (Molecular Devices – Versa Max Tunable Microplate Reader), e é diretamente proporcional ao número de células sobreviventes em cultura. Após o tratamento, as células foram incubadas por 4 horas, o meio de cultura foi removido e 0,1 ml de etanol foi adicionado para solubilizar o formazan formado.

3.4- Método para indução do Diabetes

Para indução de Diabetes ratos machos Wistar com água e ração *ad libidum* e ciclos claro e escuro (12 horas / 12 horas), cedidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB-UNICAMP), de aproximadamente 150g receberam injeção intraperitoneal de 50 mg/kg de estreptozotocina (2-deio-2-(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glicopirranose) (STZ) num veículo de citrato em pH 4,5. O efeito desse fármaco é de reduzir a função endócrina pela destruição das células β do pâncreas, porém esse fármaco não é utilizado apenas para indução química do Diabetes em animais sadios, mas também papel principal e fundamental no tratamento de neoplasias malignas em células beta pancreáticas e outras cancerologias humanas.

Semanalmente, a glicemia dos animais foi aferida e, no 28º dia pós-injeção intraperitoneal, a última aferição foi realizada. Com isso, os animais com glicemia acima de 250 mg/dl foram selecionados para o teste de tolerância à insulina via subcutânea (Aguiar *et al.*, 2004; Cui *et al.* 2006; Delfino *et al.* 2002; Grenha *et al.* 2007; Yoo *et al.* 2004).

3.5- Immunoblotting

Fragmentos de aproximadamente 150 mg de tecido hepático foi coletado dos animais e homogeneizada com um Polytron (Kinematica. Suíça) em tampão de extração (SDS 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 100 mM) e incubados à 96°C por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para a remoção do material insolúvel. O mesmo procedimento foi realizado para a extração de proteínas de células MIN 6, mas a homogeneização foi feita com o uso de sonicador.

As células MIN 6 foram tratadas em discos de cultura com dimensão de 35 mm x 10 mm (TPP™, EUA). Após as células atingirem uma confluência de 80% nas garrafas de 75 cm², foi colocado o meio de cultura suplementado com a concentração de 225 g/ml⁻¹ nos discos de cultura, em três diferentes tempos de exposição: 6, 24 e 72h. As células foram coletadas para cada grupo experimental e, então, sonificadas em 0,1 mL de tampão de extração a 4º C. As amostras foram centrifugadas em 12.000 r.p.m. a 4º C por 20 minutos. A dosagem protéica dos sobrenadantes foi obtida utilizando o reagente de Bradford (Bio -Rad). As amostras foram fervidas por 5 minutos em 25% do volume em tampão Laemmli (fosfato de Na 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% α-mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram fracionadas no sistema de eletroforese (Mini Protean II – Bio-Rad), em gel de poliacrilamida a 12 %. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) na presença de 20% metanol e 0,02% SDS em voltagem constante de 120 Volts por 90 minutos. A membrana foi, então, saturada com solução bloqueadora contendo leite desnatado a 5% em solução basal (10 mM Trisma base, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) por 2 horas, em temperatura ambiente. A membrana foi incubada com anticorpo primário específico contra *caspase 3*, diluído em solução basal contendo albumina bovina 3%, “overnight”. Após este período, a membrana foi lavada três vezes (5 minutos), em solução basal a temperatura ambiente e incubada por 1 hora e 30 minutos, com anticorpo secundário conjugado com peroxidase-HRP diluído em solução basal contendo leite desnatado 1% a temperatura ambiente. As membranas, então, foram novamente lavadas com solução basal e incubadas em sala escura com substrato luminol quimioluminescente (Pierce) por 5 minutos e expostas ao filme autoradiográfico (Kodak T -Mat G/RA). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria.

3.6- Extração de RNA e PCR em tempo real

Para a extração dos RNAs total de fígado ($\pm 100\text{mg}$), foi utilizado o reagente *Trizol* (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma amostra de $2\mu\text{g}$ de cada RNA foi submetido à reação de transcrição reversa com *primers* randômicos. A expressão dos genes codificadores das proteínas superóxido dismutase cobre-zinco (SODCuZn), peróxido dismutase (PDX) e catalase (CATA) foram quantificadas por PCR em tempo real, utilizando o aparelho *StepOne™ Real-Time PCR System* da *Applied Biosystems* (Foster City, CA, USA) e o reagente SYBR Green como marcador fluorescente. SYBR Green é um reagente com alta afinidade ao DNA dupla fita. Quando ele não está ligado à dupla fita, emite uma fluorescência de baixa intensidade, mas quando ligado à dupla fita, emite uma fluorescência de alta intensidade. A determinação da expressão do gene (quantidade de duplas fitas) é diretamente proporcional à fluorescência emitida.

As reações foram realizadas em $25\mu\text{l}$ de uma mistura contendo $1\mu\text{l}$ do cDNA da amostra, $0,5\mu\text{l}$ de cada sequência de *primers* (sense e antisense), $10,5\mu\text{l}$ de água DEPC e $12,5\mu\text{l}$ do *mix* SYBR Green PCR Master (dNTP, tampão de reação, Taq DNA polimerase e SYBER Green I) (Abgene Life Sciences, Epsom, KT, Inglaterra). As condições do PCR em tempo real foram: primeiro ciclo (único) a 95°C por 15 min, para ativação da enzima, seguido de 45 ciclos com as fases de denaturação a 95°C por 60 s, anelamento (temperatura específica de cada gene investigado) por 60 s e extensão a 72°C por 60 s. As sequências e as temperaturas de anelamento dos *primers* utilizados estão descritas na tabela 3.

Também foi avaliada a expressão do gene da beta-actina (BACT) para normalizar os dados obtidos nas reações de amplificação. Estes genes foram selecionados a partir da análise de vários genes constitutivos, utilizando-se o software GeNorm. A quantificação da expressão dos genes de interesse foi determinada usando o método do ΔCt ($\text{Ct} = \text{threshold cycle}$; número de ciclo no

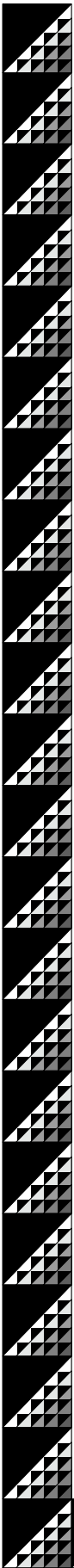
qual o produto do PCR atinge um limiar de detecção), utilizando o programa de análise qBase, tendo a expressão de beta actina como padrão interno.

Tabela 3- Características dos primers que foram utilizados no PCR em tempo real (RT-PCR)

Gene	Genbank	Sequências (sense, antisense)	TM (°C)
B-actina	49537792	5'- AGA GGG AAA TCG TGC GTA ACA -3'	96
		5'- TAG TGA TGA CCT GAC CGT CA -3'	
SODCuZn	49537784	5'- TGA AGA GAG GCA TGT TGG AGA -3'	96
		5'- TCA TCT TGT TTC TCG TGG ACC -3'	
PDX	49587782	5'- GAC CCG AGA GAC ACC TCA -3'	96
		5'- ACC CAA CTG GCT CTC GT -3'	
CAT	49537787	5'- GAT GAA GCA GTG GAA GGA GC -3'	96
		5'- TGC CAT CTC GTC GGT GAA A -3'	

3.7 – Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey). Adotamos $p < 0,05$ ou $p < 0,01$, quando necessários, como valores significativamente coerentes para a estatística.



4- Resultados



4.1 Caracterização das nanopartículas

4.1.1- Tamanho médio das partículas, potencial zeta e eficiência de encapsulamento

Nesse estudo, obtivemos uma eficiência de encapsulamento acima de 90%, caracterizando um método de alto poder de encapsulamento frente a outros sistemas poliméricos de liberação de insulina descritos na literatura. O elevado poder de encapsular grande quantidade de fármaco é característico ao método de dupla-emulsão, utilizado para preparação das nanopartículas, visto que há utilização de fases externa e aquosa, e a solubilidade da insulina, devido o preliminar ajuste do pH. O diâmetro médio das partículas obtidas foi de 796 nm (P.D.I = 0,49), e a polidispersidade é inerente a técnica utilizada para elaboração das nanopartículas. A análise do potencial zeta, medido através da espectroscopia de correlação de fótons, mostrou valor em torno de $-29,4 \pm 2,7$, que está ligado diretamente à utilização do poliéster (PCL) e ao estabilizante não iônico. A carga elétrica negativa das partículas foi demonstrada devido aos grupos carboxílicos provenientes da hidrólise do grupamento éster. Os resultados obtidos encontram-se relacionados na tabela 4.

Tabela 4- Características da insulina encapsulada (n=3)

	Nanopartículas de insulina
Tamanho médio (nm)	796 nm (P.D.I. = 0.49)
Potencial zeta (mV)	- 29.4 $\pm$ 2.7
Eficiência de encapsulamento (%)	90.6 $\pm$ 1.6

4.1.2- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As figuras 12, 13 e 14 representam imagens obtidas pela técnica de MEV das nanopartículas poliméricas contendo insulina. Podemos observar que as nanopartículas são esféricas e com diferentes formas, mas de acordo com o esperado.

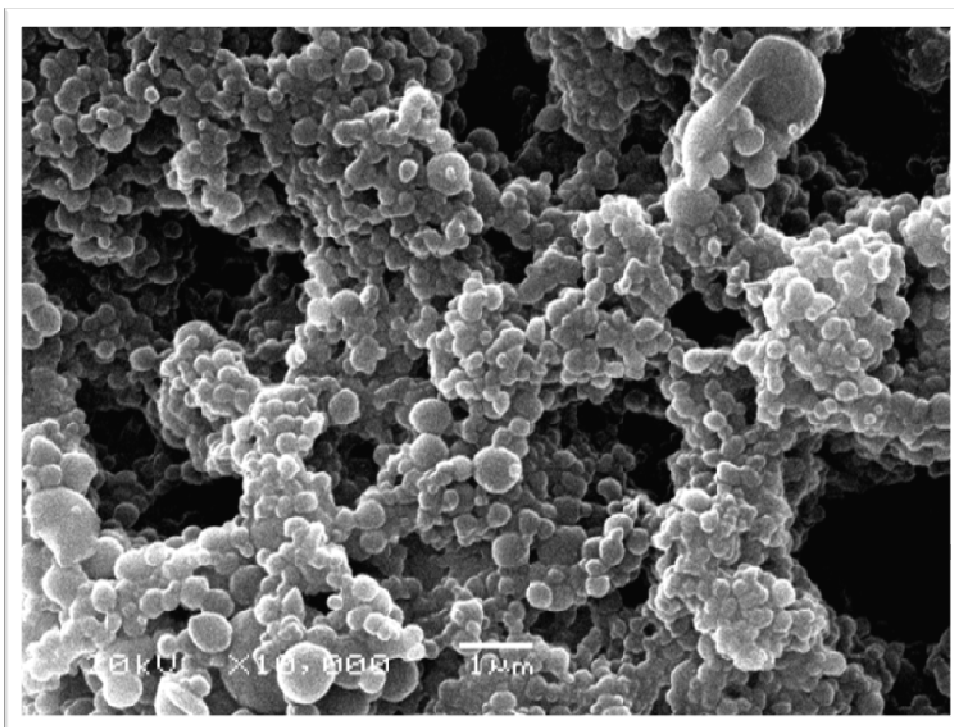


Figura 12- Micrografia de nanopartículas de PCL preparadas com os tensoativos Span 60 e Pluronic (F68) X 10,000.

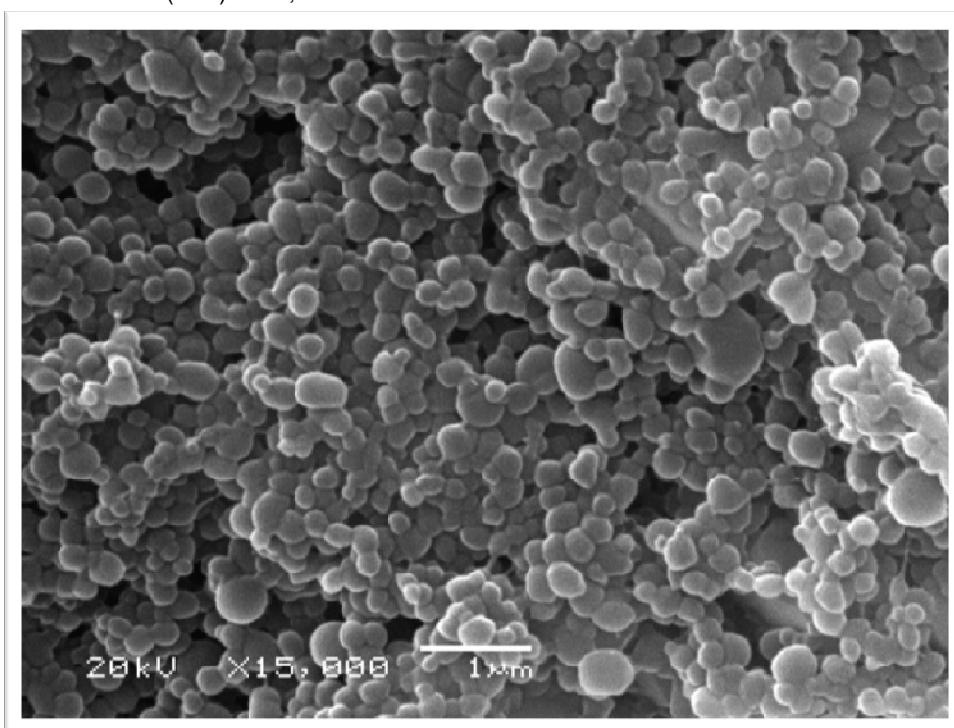


Figura 13- Micrografia de nanopartículas de PCL preparadas com os tensoativos Span 60 e Pluronic (F68) X 15,000.

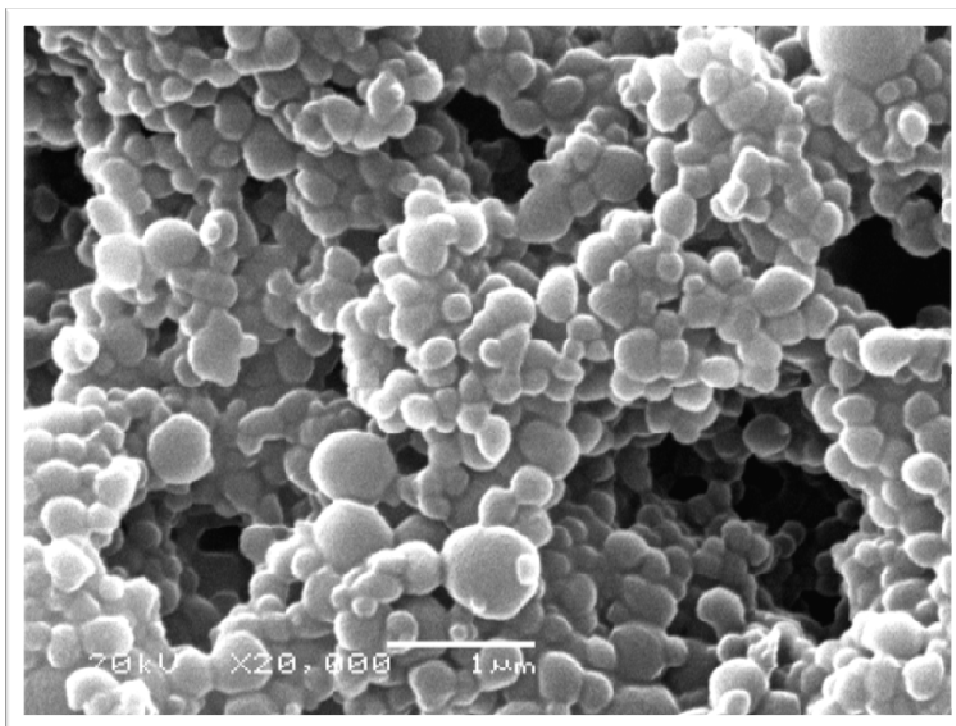


Figura 14- Micrografia de nanopartículas de PCL preparadas com os tensoativos Span 60 e Pluronic (F68) X 20,000.

4.2- Cultura de células e teste de citotoxicidade

O teste MTS é um indicativo indireto da viabilidade celular, indiretamente à morte celular. Na figura 15, podemos observar resultados dos testes em cultura de células beta da linhagem MIN 6 exposta a três diferentes concentrações de nanopartículas (112, 225 e 550 $\mu\text{g/ml}$), em três diferentes tempos (6, 24 e 72h). Notamos que houve uma redução da viabilidade celular ($P < 0.05$) nas 72 horas pós-tratamento, em todas as concentrações. Esse resultado de redução da viabilidade celular demonstra que houve uma diminuição de 20% na concentração de células ativas.

De acordo com estes efeitos citotóxicos das nanopartículas de insulina, realizamos *Western Blotting* para expressão protéica da caspase 3, para verificar morte celular por apoptose (figura 16). A expressão da caspase 3 foi investigada apenas na concentração de 225 $\mu\text{g/ml}^{-1}$, que sugere a dose de 1 U.I./kg. Houve

elevação na expressão da protease efetora da morte celular em 6 e 24 horas, porém em 72 horas sua expressão foi normalizada frente ao controle.

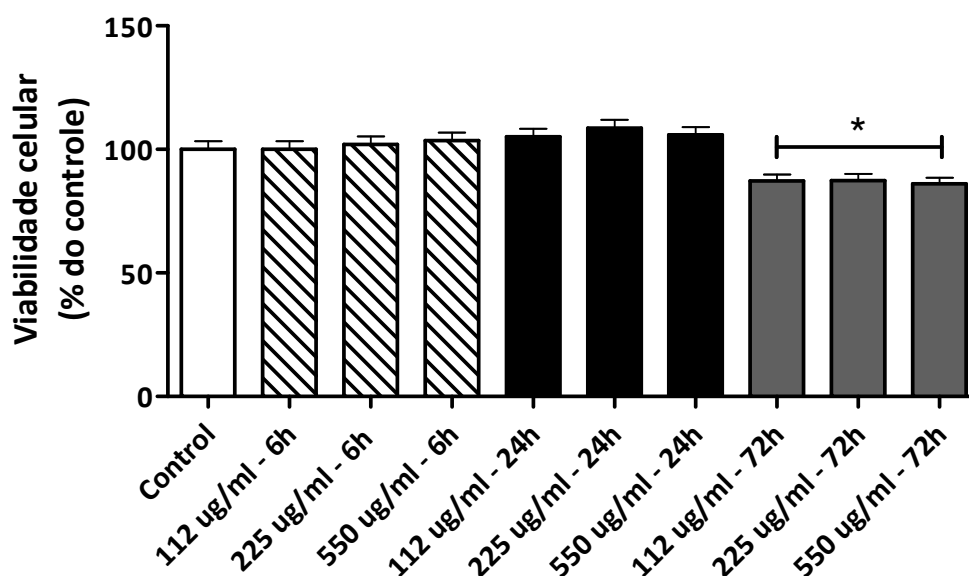


Figura 15- Efeitos das concentrações de concentrações de nanopartículas de insulina na viabilidade celular de células MIN 6. (*) representa a concentração as concentrações e tempo, onde houve redução estatisticamente considerável.

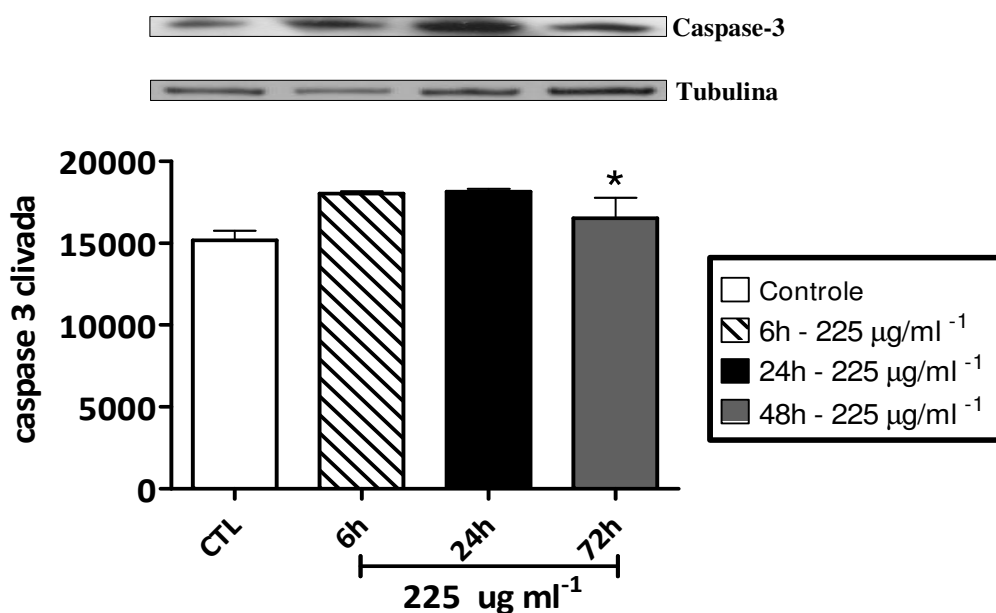


Figura 16- Expressão da caspase 3 (* $p < 0.05$ comparado ao tempo de 6 e 24h)

4.3- Experimentos *in vivo*

Preparamos três formulações de nanopartículas: nano 1 (100 µl ou 10 U.I.), nano 2 (600 µl ou 60 U.I.) e branco (nanopartículas preparadas com água deionizada, 100 µl). Nos experimentos foram utilizados 2 U.I./kg em todos os grupos experimentais (animais tratados com nano 1, nano 2, insulina comercial ou branco).

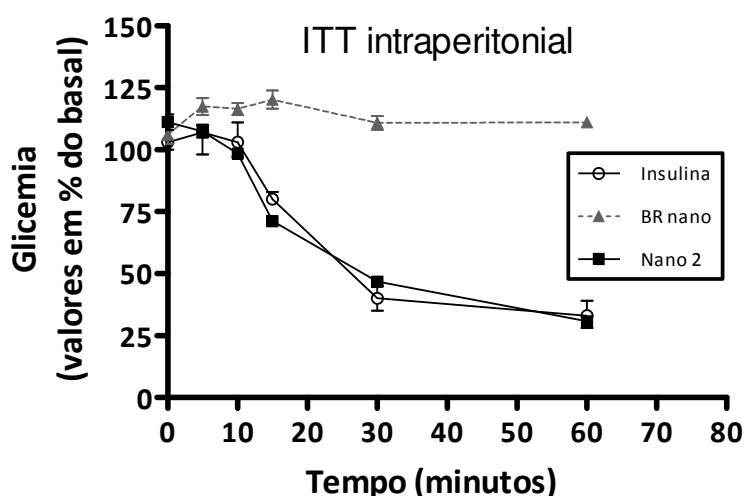


Figura 17- Níveis glicêmicos em teste de tolerância insulina (I.T.T.), prévio a indução do Diabetes com as diferentes formulações: (▲) branco de nanopartículas (BR nano) – foi utilizado 100 µl de água deionizada na formulação; (○) insulina livre 2 U.I./kg e (■) nanopartículas 2 (nano 2) foi utilizado 600 µl de insulina humana - 2 U.I./kg. Os pontos representam a média ± S.E.M., com n = 5 animais por grupo.

No experimento da figura 17, verificamos que o efeito hipoglicemiante das nanopartículas de insulina foi semelhante ao da insulina livre (comercial), e que a nanopartículas em si (grupo branco) não possui efeito hipoglicemiante fisiológico. Para verificar a farmacocinética da liberação da insulina nanoencapsulada em comparação a insulina livre aplicamos 2 U.I./kg de cada formulação (nano 1, nano 2, branco e insulina livre) em animais diabéticos tipo 1 (figura 18). Observamos que nos animais tratados com insulina livre houve um efeito hipoglicêmico abrupto no início do tratamento (15 minutos), com retorno aos valores hiperglicêmicos anteriores em apenas 60 minutos, evidenciando a interrupção de sua ação farmacológica. A farmacocinética das nanopartículas de insulina se mostrou

bastante diferenciada com uma menor redução inicial da glicemia e manutenção prolongada do efeito hipoglicemiante, retornando aos valores iniciais hiperglicêmicos apenas em 360 minutos (nano 1 e nano 2). Além disso, a preparação de nanopartícula em si (branco de nanopartículas) não possui efeito fisiológico hipoglicemiante.

Analizamos também a glicemia dos animais ponto a ponto: 0, 15, 30, 60, 180 e 360 minutos após injeção subcutânea das formulações (figura 19). A glicemia inicial dos animais foi semelhante entre os grupos estudados (figura 19 a). Após 15 minutos a glicemia dos animais tratados com insulina livre (ins.) foram reduzidos a cerca de 60% do valor inicial, enquanto os animais tratados com as formulações de nanopartículas (nano 1 e nano2) foram reduzidos a cerca de 85%, mostrando uma maior ação inicial da insulina livre em relação às nanopartículas (figura 1b). Após 30 minutos a glicemia do grupo ins. já começa a voltar aos valores iniciais (cerca de 75%), enquanto as nanopartículas (nano 1 e nano 2) continuaram a reduzir a glicemia dos animais (cerca de 75%), mostrando que a insulina livre já começa a perder seu efeito fisiológico, enquanto as nanopartículas de insulina aumentam seu efeito. A partir de 60 minutos a insulina livre não apresenta mais efeitos fisiológicos hipoglicemiantes, e os valores glicêmicos dos animais retornam aos seus valores iniciais (figuras 19 **d**, **e**, **f**). Enquanto isso as nanopartículas de insulina (nano 1 e nano 2) ainda apresentavam efeito hipoglicemiante aos 60 (figura 19 **d**) e 180 minutos (figura 19 **e**), cerca de 75% e 80% respectivamente, sendo que apenas após 360 minutos (figura 19 **f**) a glicemia dos animais tratados com nanopartículas de insulina retornou ao inicial.

Esses resultados corroboram nossa tese, visto que as nanopartículas contendo insulina possuem efeito hipoglicêmico controlado e sustentado.

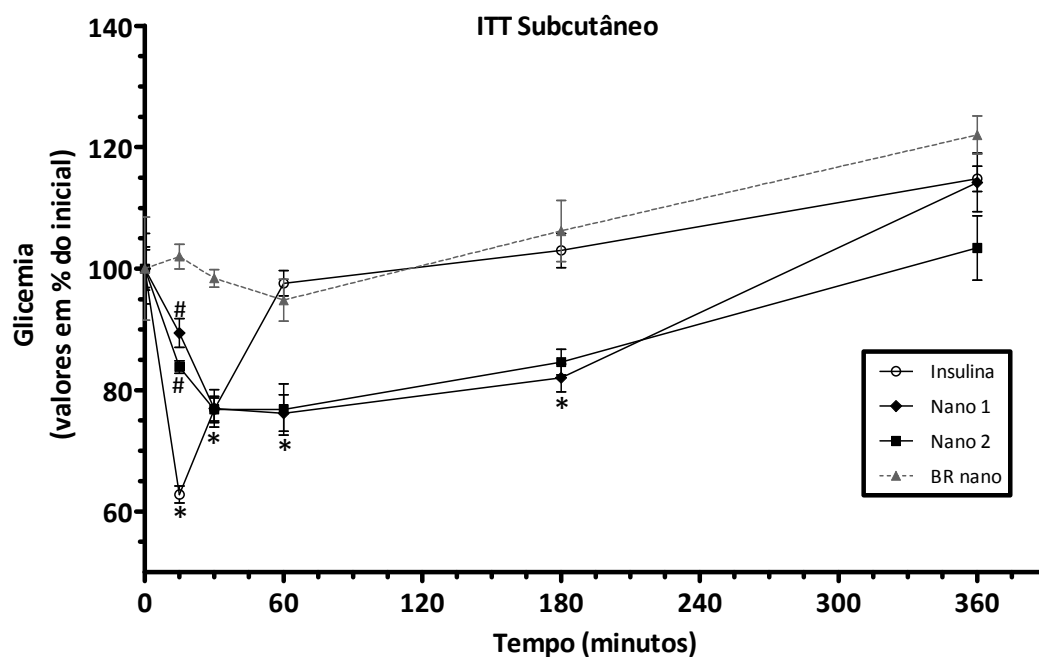


Figura 18- Níveis glicêmicos em animais induzidos ao Diabetes por estreptozotocina depois de injeção subcutânea das diferentes formulações: (▲) branco de nanopartículas – foi utilizado 100 µl de água deionizada na formulação, (○) insulina livre 2 U.I./kg, (◆) nanopartículas 1 – foi utilizado 100 µl de insulina humana - 2 U.I./kg e (■) nanopartículas 2 foi utilizado 600 µl de insulina humana - 2 U.I./kg. Os pontos representam a média ± S.E.M., com n = 5 animais por grupo.

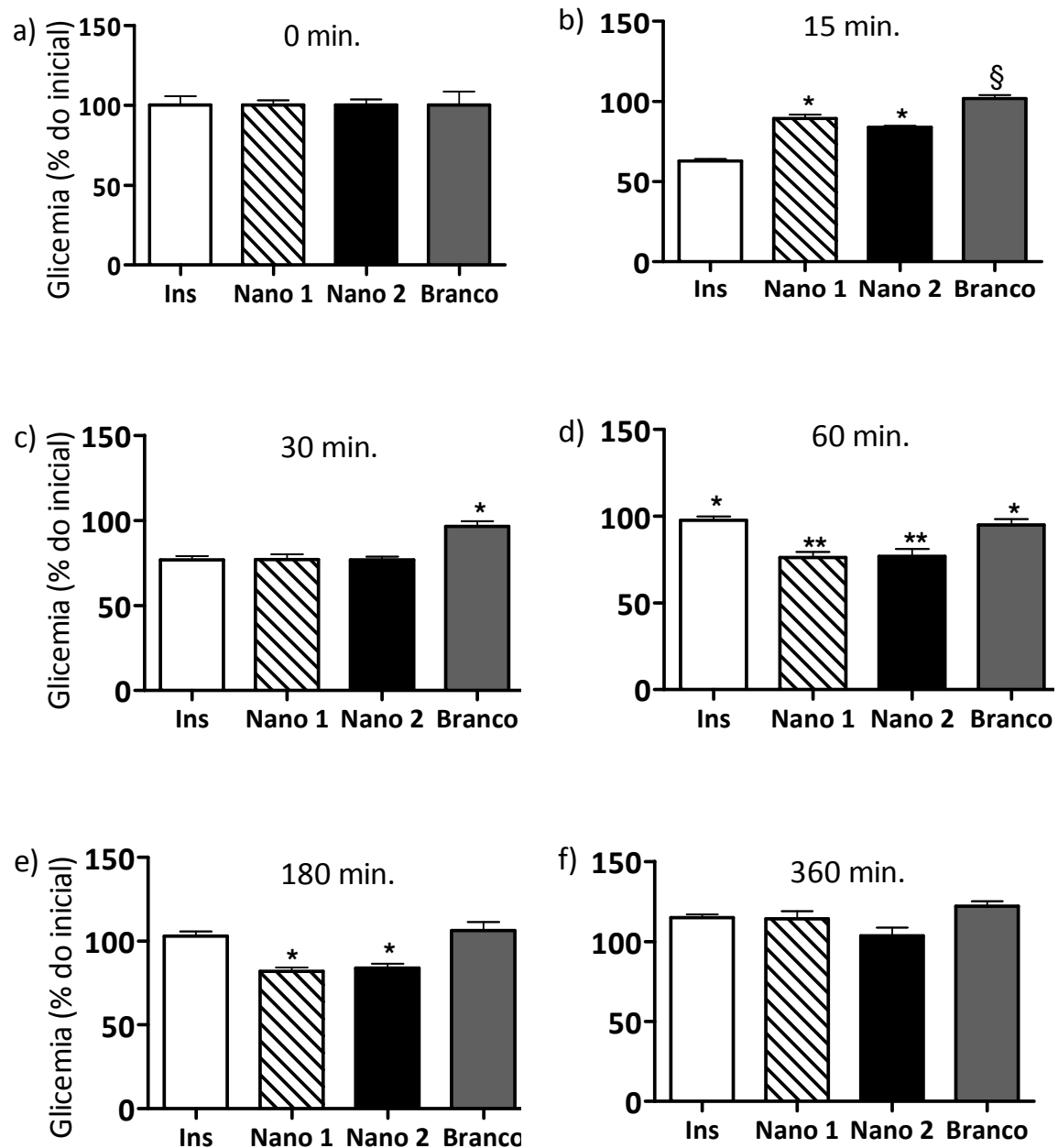


Figura 19- Área sobre a curva das glicemias dos animais nos tratamentos de insulina, nano. 1, nano. 2 e branco de nanopartículas nos diferentes tempos. Os asteriscos representam as comparações que não obtiveram representação estatística. a) (*) nano. 1 vs. nano. 2; b) (*) insulina vs. nano. 1, (**) insulina vs. nano. 2, (***) nano 1 vs. nano 2; c) (*) insulina vs. branco, (**) nano 1 vs. nano 2; d) (*) insulina vs. branco, (**) nano 1 vs. nano 2, e e) em todas as comparações há diferença estatística, menos nano 2 vs. branco. Diferença estatística com $p < 0.05$.

4.3.1- Expressão de enzimas antioxidantes (catalase, peroxidase dismutase e superóxido dismutase)

Os resultados da expressão de caspase 3 clivada demonstram que o tratamento dos animais com nanopartículas de insulina não induz a morte celular por apoptose dos hepatócitos (figura 23), e que, portanto, esse tratamento não desencadeia hepatotoxicidade mediada por apoptose.

Além disso, tanto o tratamento com nanopartículas de insulina quanto o tratamento com insulina livre não afetam a expressão das enzimas anti-oxidantes catalase (figura 20), peroxiredoxina (figura 21) e superóxido dismutase (figura 22) indicando que esses tratamentos não desencadeiam hepatotoxicidade induzida por estresse oxidativo. Esses estudos demonstraram mais uma vez que a utilização de nanopartículas contendo insulina pode ser um tratamento alternativo e seguro para o Diabetes Mellitus.

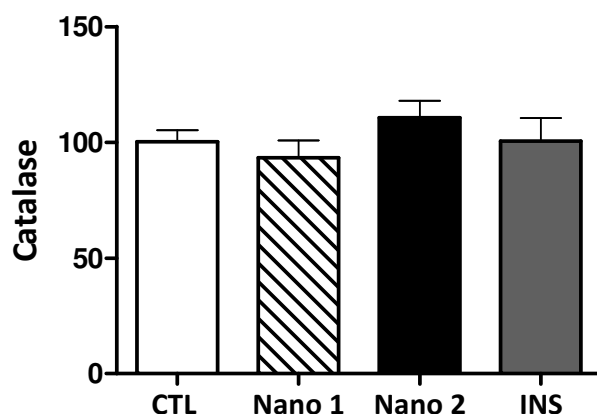


Figura 20- Expressão da enzima catalase em fígado de animais tratados com as diferentes formulações (CTL = animais não induzidos ao Diabetes e sem nenhum tratamento; NANO 1 = animais tratados com a formulação de nanopartículas contendo 100 µl de insulina humana na fase de preparação; NANO 2 = animais tratados com a formulação de nanopartículas contendo 600 µl de insulina humana na fase de preparação e INS = animais tratados com insulina humana), valores normalizados pelo valor total de Beta Actina (Bact). Todos os animais receberam 2 U.I./kg das formulações e sacrificados 2 dias após tratamento para remoção do tecido hepático (n = 4). Diferença estatística com $p < 0.01$.

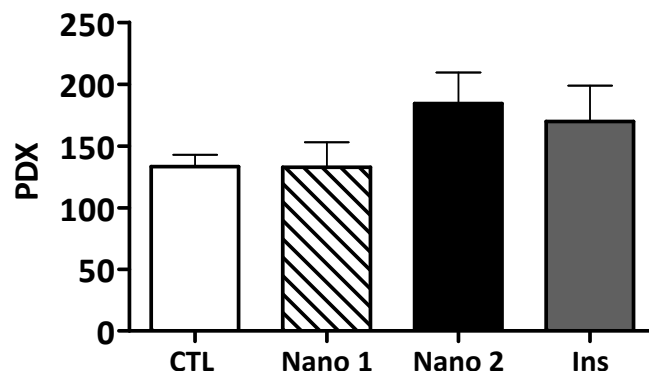


Figura 21- Expressão da enzima peróxido dismutase (PDX) em fígado de animais tratados com as diferentes formulações (CTL = animais não induzidos ao Diabetes e sem nenhum tratamento; NANO 1 = animais tratados com a formulação de nanopartículas contendo 100 µl de insulina humana na fase de preparação; NANO 2 = animais tratados com a formulação de nanopartículas contendo 600 µl de insulina humana na fase de preparação e INS = animais tratados com insulina humana), valores normalizados pelo valor total de Beta Actina (Bact). Todos os animais receberam 2 U.I./kg das formulações e sacrificados 2 dias após tratamento para remoção do tecido hepático (n = 4). Diferença estatística com $p < 0.01$.

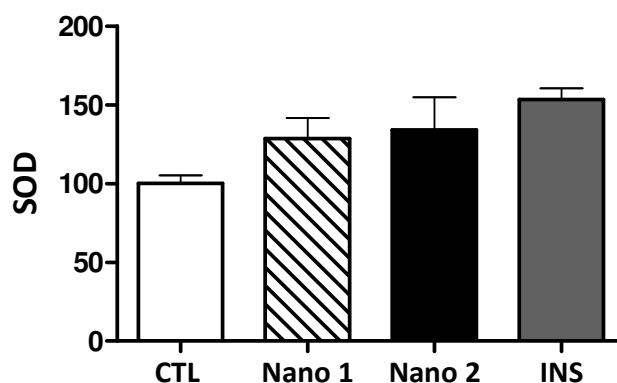


Figura 22- Expressão da enzima superóxido dismutase cobre-zinco (SODCuZn) em fígado de animais tratados com as diferentes formulações (CTL = animais não induzidos ao Diabetes e sem nenhum tratamento; NANO 1 = animais tratados com a formulação de nanopartículas contendo 100 µl de insulina humana na fase de preparação; NANO 2 = animais tratados com a formulação de nanopartículas contendo 600 µl de insulina humana na fase de preparação e INS = animais tratados com insulina humana), valores normalizados pelo valor total de Beta Actina (Bact). Todos os animais receberam 2 U.I./kg das formulações e sacrificados 2 dias após tratamento para remoção do tecido hepático (n = 4). Diferença estatística com $p < 0.01$.

4.3.2- Expressão da caspase 3 em tecido hepático de ratos

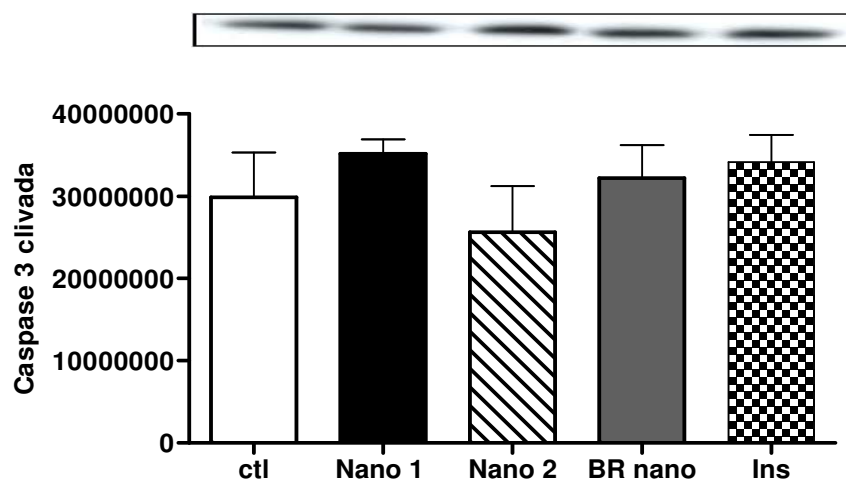


Figura 23- Expressão da caspase 3 em fígado de animais tratados com as diferentes formulações (CTL = animais não induzidos ao Diabetes e sem nenhum tratamento; NANO 1 = animais tratados com a formulação de nanopartículas contendo 100 µl de insulina humana na fase de preparação; NANO 2 = animais tratados com a formulação de nanopartículas contendo 600 µl de insulina humana na fase de preparação; BCO = animais tratados com a formulação da nanopartículas contendo 100 µl de água deionizada na fase de preparação e INS = animais tratados com insulina humana). Todos os animais receberam 2 U.I./kg das formulações e sacrificados 2 dias após tratamento para remoção do tecido hepático. (n = 3)

5- Discussão

O aumento da concentração sanguínea de glicose, a hiperglicemia, é a característica principal do Diabetes Mellitus (DM). Essa patologia é uma das grandes causas de morte no mundo, sendo o quarto principal agente de óbito mundial (Zimmet *et al.*, 2001; Roglic, *et al.*, 2005; Gross, *et al.* 2002; Ead, 2003). Martins e colaboradores (2003) relataram que quadros abruptos de cetoacidose diabética, uma das principais causas de morte desse grupo de pacientes e quadro máximo da deficiência da insulina, podem ocorrer por utilização inadequada da insulina na terapêutica (Martins *et al.*, 2003).

A síntese insulínica é controlada principalmente pela concentração de glicose circulante no organismo, e o efeito geral da glicose é o fornecimento de substratos corpóreos. O efeito imediato da insulina evidentemente é a redução da glicemia sanguínea, facilitando a captação, utilização, armazenamento da glicose, aminoácidos e gorduras no período pós-pandrial (Gilman *et al.*, 1996; Berg *et al.*, 2002); portanto o mecanismo de ação da insulina está ligado à sua fixação a um receptor específico sobre a superfície das células alvo (Contran *et al.*, 1994; Gilman *et al.*, 1996).

A utilização do encapsulamento de algumas formulações tem o intuito de melhorar a eficácia terapêutica, através da liberação progressiva pela degradação da matriz, neste caso polimérica; aumentar o tempo de circulação do fármaco no organismo; direcionar a alvos específicos; além da administração totalmente segura, sem reflexos inflamatórios locais. Consequentemente, substâncias hidrofílicas e lipofílicas podem ser incorporadas aos sistemas, dependendo da metodologia aplicada para o encapsulamento (Schaffazick *et al.*, 2006; Vauthier *et al.*, 2008).

Mesiha e colaboradores prepararam nanopartículas com a metodologia de polimerização *in situ*. Neste trabalho, utilizou-se polímeros de alquilacinoacrilato, insulina humana e diferentes concentrações de Pluronic F68®. Foram obtidas nanopartículas em torno de 100 nm empregando-se concentração de Pluronic de 0,5 a 2,5%, e a efetividade de encapsulamento entre 53 a 59% (Mesiha *et al.*, 2005).

Nanopartículas poliméricas preparadas com PLGA foram o foco do trabalho do pesquisador Santander-Ortega e seus colaboradores. Foi elaborado um sistema polimérico com a técnica de difusão do solvente modificada, utilizando PLGA com Pluronic F68[®] e Tetronic T904[®]. Nesse estudo os autores simularam efeitos da mucosa gástrica e de fluídos intestinais. Os resultados sugerem uma evolução da terapêutica da insulina, especialmente no que diz respeito aos efeitos da barreira gástrica (Santander-Ortega *et al.*, 2008).

Nanopartículas de insulina foram preparadas utilizando PCL, Eudragit RS[®] um polímero não biodegradável, insulina e polivinil álcool (PVA). O método de emulsão múltipla foi a técnica utilizada para preparação desse modelo experimental. A eficiência de encapsulamento foi de 26%, determinada por radioimunoensaio, e o tamanho das partículas foi de 322 nm (P.D.I. = 0,22) (Attivi *et al.*, 2005).

Em nosso estudo preparamos nanopartículas poliméricas utilizando a poli-ε-caprolactona (PCL) (0,05 g) pela técnica de emulsão múltipla/evaporação do solvente. Utilizamos como substâncias emulsificantes o Span 60 (0,012 g) e o Pluronic F68 (0,12g). Os processos de homogenização foram de 11.000 r.p.m. por 20 segundos e 3.000 r.p.m. por 40 segundos, quando vertido a fase aquosa 1 na fase oleosa e a fase aquosa 2, respectivamente.

A quantificação de insulina encapsulada foi determinada por CLAE, com cerca de 90% de insulina encapsulada, demonstrando que o sistema polimérico desenvolvido é de alta efetividade de encapsulamento, e um promissor agente no tratamento de pacientes insulino-dependentes. Em nosso estudo, as formulações de nanopartículas (nano 1 e nano 2), apesar de quantidades diferentes de ativo utilizado na fase de preparação, não obtiveram diferenças significativas na efetividade de encapsulamento, mostrando que a técnica, quantidade de polímero, e substâncias emulsificantes estão ligadas diretamente à eficiência de encapsulamento. As nanopartículas obtidas apresentaram forma esférica, observadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V). As alterações

realizadas no método de preparação de nanopartículas de insulina demonstraram resultados bastante significativos quando comparados aos descritos na literatura.

Naha e colaboradores prepararam nanopartículas de PLGA e PLA (200 mg) por dupla-emulsão tipo água/óleo/água (A1/O/A2) onde a primeira fase aquosa continha a insulina (50 mg/mL) diluída em água, na fase oleosa (orgânica), o polímero diluído em diclorometano (4 mL) e na segunda fase aquosa PVA (1%) e sacarose em diferentes concentrações (5 e 10%). Para a emulsão primária foi utilizada 1.000 r.p.m. por 1 min, já na secundária, 5.000 r.p.m. por 10 min. No total, oito formulações distintas foram preparadas nesse estudo, com a finalidade de avaliar parâmetros e quantidade de bioativo, eficiência de encapsulamento com um tipo específico de eletroforese de proteínas (“BCA assay”), potencial zeta e tamanho das partículas. A efetividade de encapsulamento variou de 42% a 71%, todos os potenciais zeta foram negativos ($-10,58 \pm 3,55$ a $-18,58 \pm 3,54$ mV) e o tamanho das partículas não variou significativamente (36,24 a 37,25 μm), provando que a técnica modifica principalmente o carregamento do fármaco e o polímero utilizado (PLGA) e obtêm as maiores concentrações internalizadas nas partículas (Naha *et al.*, 2009).

Nos nossos experimentos *in vivo*, os animais foram induzidos ao Diabetes com injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) de 65 mg/kg em ratos Wistar com cerca de 200 g. Os animais, quando obtiveram glicemia acima de 250 mg/dL, receberam tratamento subcutâneo de 2 U.I./kg de nano 1 (nanopartículas preparadas com 100 μl de insulina humana), nano 2 (nanopartículas preparadas com 600 μl de insulina humana), insulina humana comercial e branco de nanopartículas (água deionizada como fármaco). Para todos os grupos, utilizamos n=5 ou n=4, e as glicemias foram aferidas em 15, 30, 60, 180 e 360 minutos pós-injeção subcutânea das formulações distintas.

Já experimentos *in vivo* de Damgé *et al.* (2007) utilizaram 10 U.I./kg das formulações nos diferentes grupos de ratos Wistar (250 ± 30 g), tratados com insulina livre, insulina encapsulada e salina (n=8 por grupo). A indução do Diabetes foi também realizada por única injeção intraperitoneal de 65mg/Kg da

estreptozotocina em veículo citrato. Os animais foram diagnosticados diabéticos quando a glicemia obteve valores acima de 300 mg/dL. As glicemias foram aferidas com 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12 e 24 horas pós-injeção subcutânea das formulações estudadas. Animais tratados com insulina livre obtiveram resposta hipoglicêmica de 22% após 30 min de tratamento. O tratamento chegou a seu limiar máximo de ação em 3 horas, com 70% de declínio, e em 4 horas os valores iniciaram a tendência de elevação chegando à normalização em 10 horas pós-injeção. Já as formulações de insulina encapsulada obtiveram, inicialmente, a mesma tendência de queda da glicemia, mas com máxima ação hipoglicêmica de 80% em 8 horas, mantendo-se até 12 horas pós-tratamento (Damgé *et al.*, 2007).

Em nosso estudo a insulina comercial administrada nos animais obteve uma diminuição abrupta na glicemia (em 15 minutos pós-administração), quando comparada às nanopartículas contendo insulina. A insulina humana livre retornou ao basal com 30 minutos pós-tratamento, o que confirma uma ação extremamente rápida da insulina livre. Apesar das nanopartículas de insulina não diminuírem consideravelmente a glicemia dos animais tratados em 15 minutos. Nos posteriores tempos a glicemia é reduzida em 35% (tempos de 30, 60 e 180 minutos), sendo seu pico de ação em 30 minutos pós-tratamento. As nanopartículas preparadas com 600 µl de insulina humana, ainda conseguiram ter ação em 360 minutos pós-injeção subcutânea, enquanto que os animais tratados com a nano 1 (nanopartículas preparadas com 100 µL de insulina humana) retornaram à sua glicemia inicial.

De acordo com Mesiha *et al.* (2005) e seus experimentos *in vivo* pós-injeção de STZ intraperitoneal, os animais tratados com 5 U.I./kg da formulação de nanopartículas obtiveram melhor resposta frente aos animais tratados com 2,5 U.I./kg. Porém os animais tratados com insulina livre não foram citados em seus resultados. Já em função do tratamento com 100 U.I./Kg, via oral, os animais tratados com insulina encapsulada em nanopartículas obtiveram redução glicêmica, mas um abrupto pico hiperglicêmico no final da ação do fármaco, demonstrando uma instabilidade farmacológica (Mesiha *et al.*, 2005).

Nanopartículas de naringenina (NAR), um flavonóide natural encontrado em frutas cítricas, tomate, cereja e cacau, com ação antioxidante. As nanopartículas foram preparadas por nanoprecipitação, com 50 mg do ativo e 500 mg de Eudragit® e dissolvidos em 25 ml de etanol (fase orgânica), e 75 mL de solução contendo 500 mg de PVA. Essa solução foi homogeneizada a 22.000 r.p.m. por 25 min, o solvente orgânico foi removido e posteriormente a preparação foi liofilizada. Obtiveram nanopartículas com tamanho médio de $66,2 \pm 0,38$ nm e polidispersidade de $0,29 \pm 0,04$. O grande achado desse estudo foi a análise de marcadores de injúria hepática como ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase). Quando utilizada a formulação via oral, observaram que tanto o composto livre, como o encapsulado, aumentam os níveis das aminotransferases, porém as nanopartículas de NAR têm menor toxicidade hepática. Mas também as nanopartículas de NAR aumentam as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx (utilizando kit comercial para a análise do homogeneizado de fígado), sendo uma elevação de cerca de 10% comparado ao fármaco livre. A atividade das caspases 3, 8 e 9 foram também aferidas para esse estudo e não houve aumento estatisticamente detectável. Houve a sugestão que as nanopartículas de NAR têm méritos na aplicação clínica de desordens hepáticas crônicas (Yen *et al.*, 2008). No entanto, sabe-se que o aumento da expressão das enzimas antioxidantes está ligado diretamente à exacerbação de radicais livres, que podem estar ligados a injúrias orgânicas; isso está bem esclarecido na literatura (Kubota *et al.*, 2001).

A expressão das enzimas antioxidantes não variou frente aos demais tratamentos. Nossos achados detalham e validam a utilização dessas formulações encapsuladas com PCL. Contudo, nenhum estudo avaliou a ação em cultura de células dessas formulações e ainda há pouca preocupação em avaliar a toxicidade hepática desse tipo de formulação.

6- Conclusões

- ❖ Obtivemos nanopartículas poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis no tamanho ideal quanto aos padrões da escala nanométrica; e a característica do poliéster utilizado para a sua preparação permitiu um potencial zeta adequado.
- ❖ A utilização da técnica de emulsão múltipla conduziu a uma boa efetividade de encapsulamento, e na Microscopia Eletrônica de Varredura obtivemos partículas esféricas e uniformes, caracterizando o sistema polimérico como um promissor fármaco de liberação sustentada.
- ❖ A liberação controlada das nanopartículas de insulina após indução do diabetes foi comprovada quando comparamos com os animais tratados com insulina comercial. Nos experimentos com insulina comercial, observamos que há um pico hipoglicêmico no início do tratamento, e as formulações de insulina encapsulada demonstraram seu efeito sustentável no decorrer do experimento.
- ❖ Nos experimentos com cultura celular, obtivemos uma redução da viabilidade celular tardiamente e um aumento da morte celular no início do tratamento. Já no último tempo de tratamento, a expressão da caspase 3 retomou aos valores do basal quando comparamos ao controle.
- ❖ Os achados da expressão da catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, demonstraram que não há produção de radicais livres no fígado, portanto possivelmente não há possível morte celular. Mas também a caspase 3 hepática com valores normais entre os grupos, contribui para validar a utilização das nanopartículas poliméricas contendo insulina.



7- Referências

- Aguiar, M. M. G., Rodrigues Jr., J. M., Cunha, A. S. Encapsulation of insulin-cyclodextrin complex in PLGA microspheres: a new approach for prolonged pulmonary insulin delivery. *Journal of Microencapsulation* 21, nº 5, 553-564 (2004).
- Attivi, D., Wehrle, P., Ubrich, N., Damge, C., Hoffman, M., Maincent, P. Formulation of insulin-loaded polymeric nanoparticles using response surface methodology. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 31, 179-189 (2005).
- Bailey, C. J. Potencial new treatments for type 2 diabetes. *Trends in pharmacological sciences* 21, 259 – 265 (2000).
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; - Bioquímica. 5ª ed. Cap. 10 e 21 pp. 292, 615 – 627 (2002).
- Bilati, U., Alléman, E., Doelker, E. Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process – related stability issues. *AAPS PharmSciTech* 6, E594 – E604 (2005).
- Boatright, K. M.; Renatus, M.; Scott, F. L.; Sperandio, S.; Shin, H.; Pedersen, I. M.; Ricci, J.; Edris, W. A.; Sutherlin, D. P.; Green, D. R.; Salvesen, G. S. A unified model for apical caspase activation. *Molecular Cell* 11, 529 – 541 (2003).
- Boehm, A. L., Martinon, I., Zerrouk, R., Rump, E., Fessi, H. Nanoprecipitation techniques for the encapsulation of agrochemical active ingredients. *Journal Microencapsulation* 4, 433 – 441 (2003).

- Catharino, R. R., Godoy, H. T., Lima-Pallone, J. A. – Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. *Química Nova* 29, 972 – 976 (2006).
- Chalasani, K. B., Russell-Jones, G. J., Jain, A. K., Diwan, P. V., Jain, S. K. – Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 122, 141 – 150 (2007).
- Chenlikane, P.; Fita, I.; Loewen, P. C. Diversity of structures and properties among catalase. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 192 – 208 (2004).
- Chen, J., Bai, G., Cao, Y., Gao, Z., Zhang, Q., Zhu, Y., Yang, W. One-step purification of a fusion protein of glucagon-like peptide-1 and human serum albumin expressed in *Pichia pastoris* by an immunomagnetic separation technique. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 2655 – 2662 (2007).
- Chorny, M., Fisjbein, I., Danenberg, H. D., Golomb, G. - Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of Controlled Release* 83, 389 – 400 (2002).
- Contran, R. S., Robbins S. L., Kumar V. – Robbins, Pathology Basis of Disease – 5^a ed. (1994).
- Cui, F., Shi, K., Zhang L., Tao, A., Kawashima, Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release* 114, 242-250 (2006).

- Cutler, R. G. Oxidative stress and aging: catalase is a longevity determination enzyme. *Rejuvenation Research* 8, 138 – 140 (2005).
- Damgé, C.; Maincent, P.; Ubrich, N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *Journal of Controlled Release* 117, 163 – 170 (2007).
- Deutel, B., Greindl, M., Thaurer, M., Bernkop-Schnürch, A. Novel insulin thiomers nanoparticles: in vivo evaluation of an oral drug delivery system. *Biomacromolecules* 9, 278 – 285 (2008).
- Delfino, V. D. A., Figueiredo, J. F., Matsuo, T., Fávero, M. E., Matni, A. M., Macelin, A. J. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 1, 31 – 36 (2002).
- Deng, X., Luyendyk, J. P., Ganey, P. E., Roth, R. A. Inflammatory stress and idiosyncratic hepatotoxicity: hints from animal models. *Pharmacological Reviews* 61, 262 – 282 (2009).
- Durán, N.; Mattoso, L. H. C.; Morais, P. C. Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação (2006).
- Ead, H. Glymeric control and surgery – Optimizing outcomes for the patients with diabetes. *Journal of PeriAnesthesia Nursing* 6, 384 – 395 (2009).
- Eley, J. G.; Mathew, P. Preparation and release characteristics of insulin and insulin-like growth factor-one from polymer nanoparticles. *Journal of Microencapsulation* 24, 225 – 234 (2007).

- Elsner, M., Tiedge, M., Guldbackke, B., Munday, R., Lenzen, S. Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia* 45, 1542 - 1549 (2002).
- Emilien, G., Malteaux, J., Ponchon, M. Pharmacological management of diabetes: recent progress and future perspective in daily drug treatment. *Pharmacology & Therapeutics* 81, 37 – 51 (1999).
- Fan, Y. F., Wang, Y. N., Fan, Y. G., Ma, J. B. Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer absorption. *International Journal of Pharmaceutics* 324, 158 - 167(2006).
- Freytag T., Dashevsky A., Tillman L., Hardee G.E., Bodmeier R. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *Journal of Controlled Release* 69, 197-207 (2000).
- Gilman A.G., Hardman J. G., Limbird L.E. - Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica. 9ª ed. Cap. 8. pp: 118-130. 1996.
- Giunchedi, P., Conti, B., Scalia, S., Conte, U. In vitro degradation study of polyester microspheres by a new HPLC method for monomer release determination. *Journal of Controlled Release* 56, 53 – 62 (1998).
- Graf, A., Ablinger, E., Peters, S., Zimmer, A., Hook, S., Rades, T. Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants: nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides. *International Journal of Pharmaceutics* 350, 351 – 360 (2008).

- Graw, A.; Cawan, R. A.; O'Keilly, D. S.; Stewart, M. J.; Shepherd, J. *Clinical Biochemistry*. 2^a ed. Cap. 2. pp. 56 – 63 (1999).
- Grenha, A., Grainger, C. I., Dailey, L. A., Seijo, B., Martin, G. P., Remunán-López, C., Forbes, B. Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Science* 31, 73-84 (2007).
- Grenha, A., Seijo, B., Remunán-López, C. Microencapsulation chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmacology Sciences* 25, 427-437 (2005).
- Gross, J. L., Silveiro, s. p., Camargo, J. L., Reichelt, A. J., Azevedo, M. J. Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação de controle glicêmico. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo* 46, 16 – 26 (2002).
- Jaeschke, H., Gores, G. J., Ceberbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., Lemasters, J. J. FORUM Mechanisms of Hepatotoxicity 65, 166 – 176 (2002).
- Jintapattanakit, ^a, Junyaprasert, V. B., Mao, S., Sitterberg, J., Bakowsky, U., Kissel, T. Peroal delivery of insulin using chitosan derivatives: A comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 342, 240-249 (2007).
- Johnsen, H.; Schmid R. B. Preparation of polyurethane nanocapsules by miniemulsion polyaddition. *Journal of Microencapsulation*, 1 – 12 (2007).

- Klingler, C.; Müller, B. W.; Steckel, H. Insulin micro- and nanoparticles for pulmonary delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 377, 173-179 (2009).
- Kolb, H.; Mandrup-Poulsen, T. The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia* 53, 10 – 20 (2010).
- Kubota, L. T.; Júnior, L. R.; Höehr, N. F.; Vellasco, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova* 1, 112 – 119 (2001).
- Lamkanfi, M.; Kanneganti, T. Caspase 7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 21 – 24 (2010).
- Lecker, S.H.; Jagoe, R. T.; Gilbert, A.; Gomes, M.; Baracos, V.; Bailey, J.; Price, S. R.; Mitch, W. E.; Golberg, A. L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB Journal* 18, 39 – 51 (2004).
- Liu, J.; Zhang, S. M.; Chen, P. P.; Zhou, W.; Tang, W. X.; Chen, Z. W.; Ke, C. M. Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within PVA hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 2205 – 2210 (2007).

- Lin, Y. H.; Mi, F. L.; Chen, C. T.; Chang W. C.; Peng S. F.; Liang H. F.; Sung H. W. Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules* 8, 146-152 (2007).
- Lin, Y.; Chen, C.; Liang, H.; Kulkarni, A. R.; Lee, P.; Chen, C.; Sung, H. S. Novel nanoparticles for oral insulin delivery via the paracellular pathway. *Nanotechnology* 18, 1 – 11 (2007).
- Lunn, G.; Schmuff, N. – HPLC Methods for pharmaceutical analysis. Vol. 1 778 – 786 (1997).
- Mainardes, R. M.; Gremião, M. P. D.; Evangelista R. C. – Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* vol. 42, nº 4 (2006).
- Ma, X. Y.; Pan, G. M.; Lu, Z.; Hu, J. S.; Bei, J. Z.; Lia, J. H.; Wang, S. G. Preliminary study of oral polylactide microcapsulated insulin *in vitro* and *in vivo*. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2, 243 – 250 (2000).
- Ma, Z.; Lim, T. M.; Lim, L. Pharmacological activity of peroal chitosan-insulin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 293, 271-280 (2005).
- Maddrey, W. C. Drug-induced hepatotoxicity. *Journal of Clinical Gastroenterology* 39, S83-S89 (2005).
- Martins, N.; Oliveira, J. E. P.; Aguiar, M. H.; Paniago, E., Cantimiroi, H.; Gouvêa, C.; Dias, L.; Negri, H. M.; Pereira, J. L. G. P. *Consenso brasileiro sobre diabetes 2002*. Diagnóstico e classificação do diabetes mellito e tratamento diabetes mellito tipo 2 (2003).

- Mesiha, M. S.; Sidhom, M. B.; Fasipe, B. Oral and subcutaneous adsorption of insulin poly(isobutyrylcyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 288, 289 – 293 (2005).
- Merisko-Li, E.; McGurk, S. L.; Liversidge, G. G. Insulin nanoparticles: a novel formulation approach for poorly water soluble Zn-insulin. *Pharmaceutical Research* 21, 1545 – 1553 (2004).
- Mi, F.; Wu, Y. L. Y.; Sonaje, K.; Ho, Y.; Chen, C. Oral delivery of peptide drugs using nanoparticles self-assembled by poly(α -glutamic acid) and a chitosan derivative functionalized by trimethylation. *Bioconjugate Chemistry* 19, 1248 – 1255 (2008).
- Naha, P. C.; Kanchan, V.; Panda, A. K. Evaluation of parenteral depot insulin formulation using PLGA and PLA microparticles. *Journal of Biomaterials Applications* 24, 309 – 325 (2009).
- Noris, W., Paredes, A. H., Lewis, J. H. Drug-induced liver injury in 2007. *Current Opinion in Gastroenterology* 24, 287 – 297 (2008).
- Oliveira, C. L.; Mello, M. T.; Cintra, I. P.; Fisberg, M. Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. *Revista de Nutrição* 17, 237 – 245 (2004).
- Packhaeuser, C. B.; Kissel, T. On the design of in situ forming biodegradable depot systems based on insulin loaded dialkylaminoalkylamine-poly(vinyl alcohol)-g-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 123, 131 – 140 (2007).

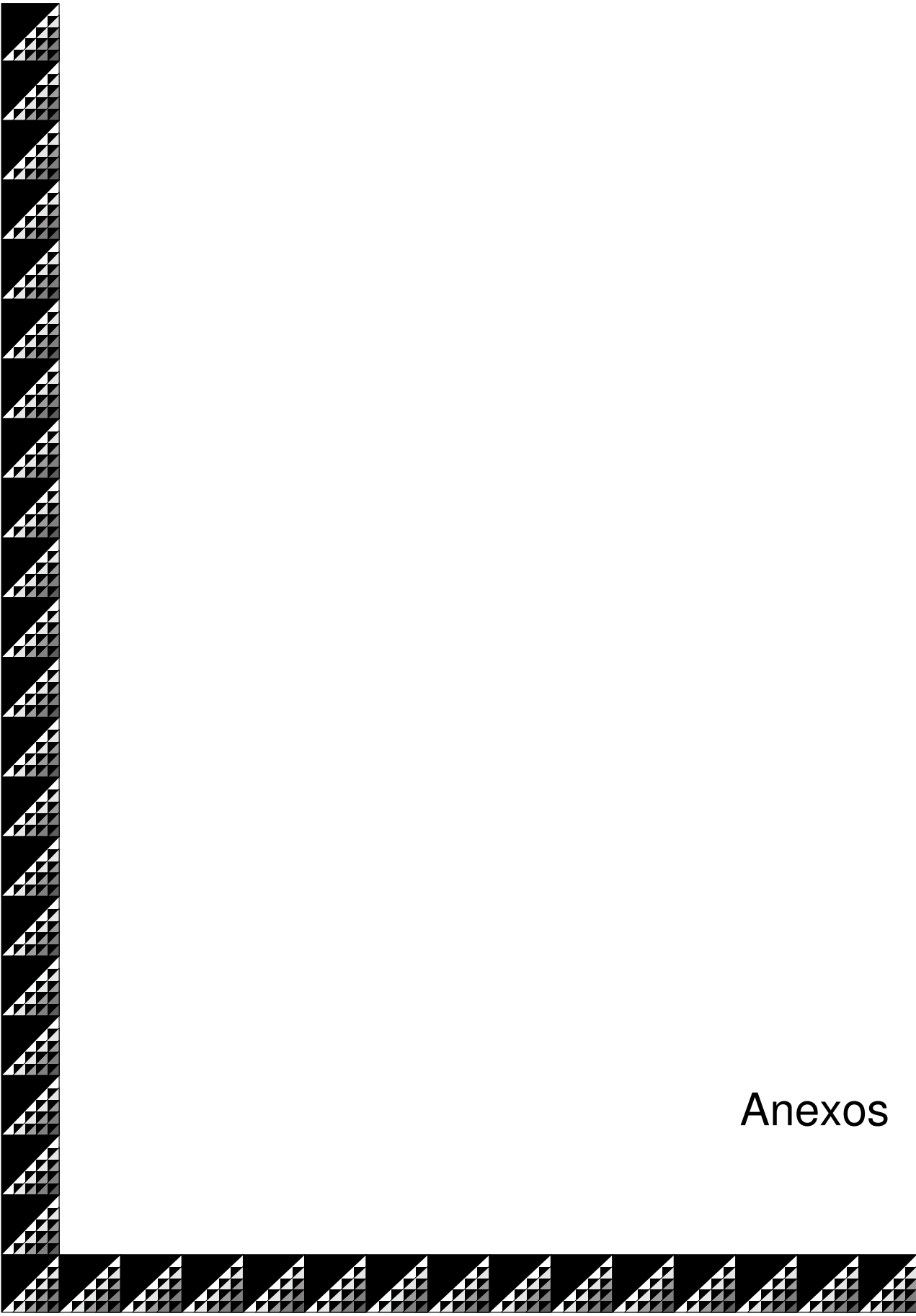
- Peskin, A. V.; Winterbourn, C. C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clínica Química Acta* 293, 157 – 166 (2000).
- Pina, K. V.; Pinto, L. R.; Moratori, R. B.; Souza, C. B.; Barbastefano, R. G. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: estado da arte, perspectiva de inovação e investimentos. *Revista gestão industrial* 2, vol. 2, 65 – 75 (2006).
- Rabinow, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. *Nature Reviews (Drug Delivery)* 3, 785 – 796 (2004).
- Rakel, R. E. Improving patient acceptance and adherence in diabetes management: a focus on insulin therapy. *Advances in Therapy* 26, 838 – 846 (2009).
- Rang H. P.; Dale M. M.; Ritter J. M. Farmacologia – 3ª ed. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan, 1997. Cap 20 (p. 321-328).
- Reis, C. P.; Neufeld, R.J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F. Nanoencapsulation 1. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2, 8 – 21 (2006).
- Reis, C. P.; Ribeiro, A. J.; Houn S.; Veiga F.; Neufeld R. J. Nanoparticulate delivery system for insulin: design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30, 392-397 (2007).
- Rekha, M. R.; Chandra, P. S. Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption. *Journal of Controlled Release* 135, 144-151 (2009).

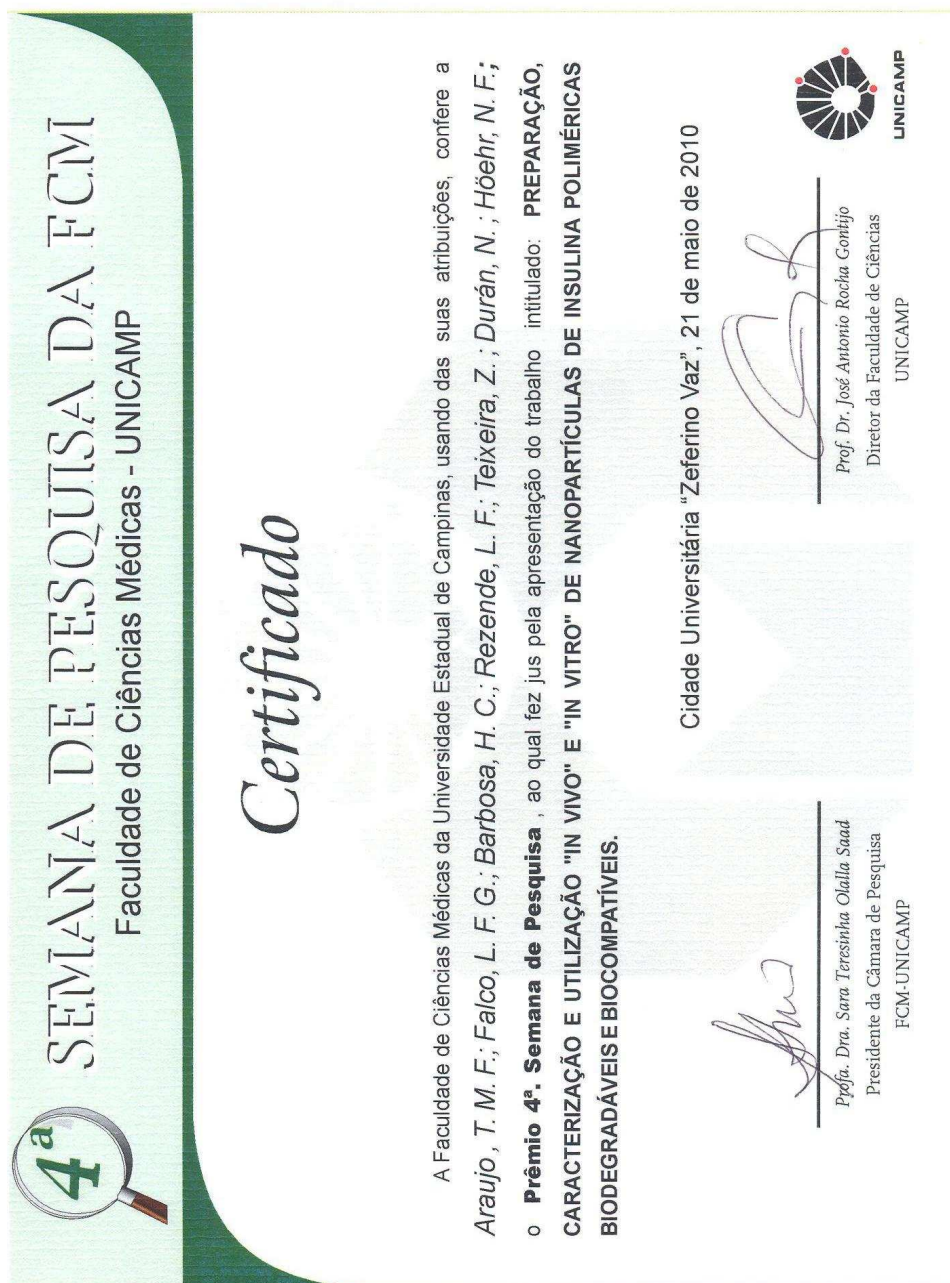
- Rieux, A.; Fievez, V.; Gariot, M.; Schneider, Y.; Préat, V. Nanoparticles as potencial oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of Controlled Release* 116, 1 – 27 (2006).
- Roglic, G.; Unwin, N.; Bennet, P. H.; Mathers, C.; Tuomilehto, J.; Nag, S.; Connolly, V.; King, H. The burden of mortality attributable to Diabetes. *Diabetes Care* 28, 2130 – 2135 (2005).
- Rojkind, M.; Domínguez-Rosales, J. A.; Nieto, N.; Greenwel, P. Role of hydrogen peroxide and oxidante stress in healing responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 1872 – 1891 (2002).
- Santander-Ortega, M.J., Bastos-González, D., Ortega-Vinuesa, J.L., Alonso, M. J. Insulin-loaded PLGA nanoparticles for oral administration: an in vitro physico-chemical characterization. *J. of Biomedical Nanotechnology*, 4, 1-9 (2008).
- Sarmiento, B.; Martins, S.; Ribeiro, A.; Veiga, F.; Neufeld, R.; Ferreira, D. Development and comparison of different nanoparticulate polyelectrolyte complexes as insulin carries. *International Journal of Peptide and Therapeutics* 12, nº 2, 131-138 (2006).
- Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Freitas, L. C. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* 26, 726 – 737 (2003).

- Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* 70, 1 – 20 (2001).
- Vauthier, C.; Bouchemal, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 26, 1025 – 1058 (2008)
- Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M., Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782 – 787 (2001).
- Zha, L., Xu, Z., Wang, M., Gu, L. Effects of chromium nanoparticle dosage on growth, body composition, serum hormones and tissue chromium in Sprague-Dawley rats. *Journal of Zhejiang University* 8, 323 – 330 (2007).
- Zhu, Y., Zhang, G., Hong, X., Dong, J., Xia, B. Influence of emulsifiers on the synthesis of insulin-loaded nanocapsules in double-emulsion. *Chinese Journal of Chemistry* 24, 109 – 113 (2006).
- Yen, F.; Wu, T.; Lin, L.; Cham, T.; Lin, C. Naringenin-loaded nanoparticles improve the physicochemical properties and the hepatoprotective effects of naringenin in orally-administered rats with CCl₄-induced acute liver failure. *Pharmaceutical Research* 26, 893 – 902 (2008).
- Yoo, H. S., Park, T. G. Biodegradable nanoparticles containing protein-fatty acid complexes for oral delivery of salmon calcitonin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93, 488-495 (2004).
- Walsh, J. G.; Cullen, S. P.; Sheridan, C.; Lüthi, A. U.; Gerner, C.; Martin, S. J. Executioner caspase-3 and caspase 7 are functionally distinct proteases.

PNAS (Proceedings of the National Academy of Science) 35, 12815 – 12819 (2008).

- Watnasirichaikul, S., Davies, N. M., Rades, T., Tucker, I. G. Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions. *Pharmaceutical Research* 17, nº6 684 – 689 (2000).
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. Global prevalence of Diabetes. *Diabetes Care* 27, 1047 – 1053 (2004).





11th International Conference
on Advanced Materials ICAM 2009
VIII Encontro da SBPMat



ICAM2009

We hereby certify that the work

"Insulin-loaded polymeric nanoparticles: Cell viability and cytotoxicity studies"
(G535)

by the authors Thiago Matos Ferreira de Araujo, Luis Fernando Godoy Falco, Zaine
Teixeira, Helena Cristina de Lima Barbosa, Nelson Durán, Antonio Carlos Boschero and
Nelci Fenalti Höehr

was presented on Poster form by

THIAGO MATOS FERREIRA DE ARAUJO

at the 11th International Conference on Advanced Materials - ICAM 2009,
in Rio de Janeiro, September 20th to 25th, 2009.

Rio de Janeiro-RJ, September 25th, 2009.


 Guillermo Solorzano
Chairman ICAM 2009


 Elisa Saitovitch
Program Chair



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

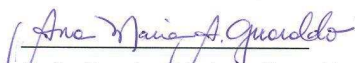
CERTIFICADO

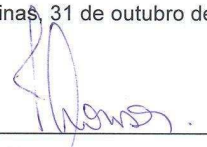
Certificamos que o Protocolo nº 1386-1, sobre "Caracterização de nanopartículas contendo insulina em modelos de animais induzidos ao diabetes", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr / Thiago Matos Ferreira de Araujo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 31 de outubro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1386-1, entitled "Characterization of nanoparticles containing insulin in animals induced by diabetes", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 31, 2007.

Campinas, 31 de outubro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>