



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS PARA LIBERAÇÃO DE
ADRENOMEDULINA-2 NO MIOCÁRDIO INFARTADO**

HELENITA COSTA QUADROS

Salvador - Bahia

2018

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS PARA LIBERAÇÃO DE
ADRENOMEDULINA-2 NO MIOCÁRDIO INFARTADO**

HELENITA COSTA QUADROS

Orientador: Dr. Fabio Rocha Formiga

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2018

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir alcançar mais uma vitória. Sem Ele não seria possível.

Aos meus pais, Alberto e Sidnei, pelo apoio e por acreditarem em mim a todo momento. Essa conquista é nossa.

Aos meus irmãos, Alberto e Larissa, pelos conselhos e palavras doces nos momentos difíceis. Vocês são fontes de força e perseverança. Obrigada.

Aos meus primos, Rafaela e Rodrigo, pelo amor, carinho e suporte durante toda a minha vida, especialmente nesta etapa.

A todos os meus tios, tias e avós por não medirem esforços para me auxiliarem quando precisei. Muita gratidão pelas palavras de incentivo e orações dedicadas à mim.

Aos meus amigos, pelo companheirismo, estímulo e incentivo durante estes dois anos de caminhada acadêmica. Especialmente, aos colegas e amigos que conquistei através da Fiocruz.

Ao meu orientador, Dr. Fabio Rocha Formiga, pela oportunidade de estudar na Fiocruz.

Aos meus amigos e colegas do grupo GT NANO, especialmente Carla e Laís, pelo incentivo, solidariedade e companheirismo. Todos vocês foram essenciais nesta etapa da minha vida.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, pelo apoio acadêmico.

Ao Instituto Gonçalo Moniz, pelas oportunidades e por contribuir de forma valiosa para o meu aprendizado.

A todos os funcionários da coordenação do PgBSMI e da biblioteca, pelo zelo, carinho e excelente serviço prestado à instituição e aos estudantes.

“Se não sabes, aprende; se já sabes, ensina.”

(Confúcio)

QUADROS, Helenita Costa. Desenvolvimento de nanopartículas para a liberação de adrenomedulina-2 no miocárdio infartado. 96 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O infarto do miocárdio (IM) representa a manifestação mais significativa da cardiopatia isquêmica em todo o mundo. Atualmente, os tratamentos utilizados são invasivos, de alto custo e difícil acesso pelo sistema público de saúde, além de não apresentarem a capacidade de reparo do coração. Neste sentido, nanopartículas (NPs) à base do copolímero poli (ácido lático-co-glicólico, PLGA) têm sido investigadas como carreadores potenciais de biomoléculas para a regeneração do miocárdio lesionado, devido ao seu baixo potencial imunogênico, adequado perfil de biodegradação e alta biocompatibilidade com o tecido cardíaco. A adrenomedulina-2 (ADM-2), identificada como um novo fator angiogênico, demonstra alto potencial terapêutico em disfunções endoteliais. **OBJETIVO:** Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi produzir nanopartículas poliméricas para a liberação do fator de crescimento ADM-2 no miocárdio infartado. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Após a produção de pré-formulações e a padronização da formulação à base de nanopartículas com albumina (BSA) pelo método de emulsão múltipla e extração de solvente, nanopartículas contendo ADM-2 foram preparadas e, em seguida, caracterizadas quanto aos parâmetros físico-químicos e atividade biológica *in vitro*. **RESULTADOS:** Em suspensão, as partículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética, respectivamente. NPs-ADM-2 apresentaram diâmetro médio de 312,1 nm \pm 1,3, PDI de 0,34 \pm 0,01 e potencial zeta de -31 mV, sem a presença de agregados. Após 30 dias, houve um leve aumento de tamanho e PDI, mas sem alteração no potencial zeta. NPs-ADM-2 foram avaliadas quanto à morfologia por microscopia eletrônica, apresentando-se dispersas, com forma esférica e superfície lisa. A eficiência de encapsulação foi de 67,28% determinada por ELISA, correspondendo a 134,5 ng de ADM-2 por mg de formulação. NPs-ADM-2 apresentaram compatibilidade *in vitro* com macrófagos da linhagem J774 e cardiomiócitos da linhagem H9c2, conforme ensaios de citotoxicidade por AlamarBlue®. Com relação à bioatividade, ADM-2 encapsulada foi capaz de estimular a proliferação celular das linhagens endoteliais HUVEC e EA.hy926, indicando que a atividade biológica deste fator de crescimento foi preservada após seu processo de formulação em nanopartículas de PLGA. **CONCLUSÃO:** Este trabalho é o primeiro estudo de desenvolvimento de uma nanoformulação de ADM-2, com potencial de inovação no âmbito da terapia com fatores de crescimento direcionada ao infarto do miocárdio.

Palavras-chave: Adrenomedulina-2; Nanopartículas de PLGA; Infarto do miocárdio.

QUADROS, Helenita Costa. Development of nanoparticles for adrenomedullin-2 delivery in infarcted myocardium. 96 f. il. Dissertation (Master em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Myocardial infarction (MI) represents the most significant manifestation of ischemic heart disease worldwide. Currently, the treatments used are invasive, high cost, difficult to access by the public health system, and do not present the ability to repair the heart. In this sense, nanoparticles based on the poly (lactic-co-glycolic acid, PLGA) copolymer have been investigated as potential carriers of biomolecules for the injured myocardial regeneration, due to its low immunogenic potential, suitable biodegradation profile and high biocompatibility with cardiac tissue. Adrenomedullin-2 (ADM-2), identified as a novel angiogenic factor, demonstrates high therapeutic potential in endothelial dysfunction. **AIM:** Thus, the aim of this work was to produce polymeric nanoparticles for the delivery of ADM-2 growth factor in infarcted myocardium. **MATERIALS AND METHODS:** After the production of pre-formulations and the standardization of the formulation based on nanoparticles with albumin (BSA) by the method of double emulsion and solvent extraction, nanoparticles containing ADM-2 were prepared, and then characterized as physicochemical parameters and *in vitro* biological activity. **RESULTS:** In suspension, the particles were characterized by size, polydispersity index (PDI) and zeta potential by dynamic light scattering. Initially, the NPs-ADM-2 formulation was turbid, with a mean diameter of $312.1 \text{ nm} \pm 1.3$, PDI of 0.34 ± 0.01 and zeta potential of -31 mV , without the presence of aggregates. After 30 days, there was a slight increase in size and PDI, but no change in zeta potential. NPs-ADM-2 were evaluated for morphology and size by electron microscopy, presenting spherical shape, smooth surface and dispersed among them. The encapsulation efficiency was 67.28%, corresponding to 134.5 ng per mg of nanoparticle. The formulation also showed *in vitro* compatibility with J774 macrophages cell line and H9c2 cardiomyocytes cell line through AlamarBlue® cytotoxicity assays. Adrenomedullin-2 entrapped into the nanoparticles was able to stimulate the cell proliferation of the endothelial lines HUVEC and EA.hy926, indicating the bioactivity of the loaded ADM-2 was preserved after the encapsulation. **CONCLUSION:** In summary, this is the first report dedicated to develop a nanoformulation containing ADM-2, with innovative potential for MI using recombinant growth factors.

Key-words: Adrenomedullin-2; PLGA nanoparticles; myocardial infarction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Remodelamento adverso no ventrículo esquerdo após afinamento e dilatação da parede do miocárdio infartado. Fonte: adaptado de AWADA; HWANG; WANG, 2016.20
- Figura 2.** Potenciais mecanismos dos efeitos parácrinos na terapia celular após o infarto do miocárdio. Fonte: adaptado de LALIT et al. 2014.26
- Figura 3.** CGRP, adrenomedulina e ADM-2/IMD e suas potências como agonistas aos receptores CL ou CRLR RAMP1, RAMP2 ou RAMP3. Uma proteína componente receptora (RCP) também é acoplada para a ativação ótima do sinal de transdução. Fonte: adaptado de BELL; MCDERMOTT, 2008.29
- Figura 4.** Integração entre os biomateriais, fatores de crescimento e células-tronco através da engenharia de tecidos. Fonte: adaptado de PASCUAL-GIL et al., 2015.33
- Figura 5.** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas. Fonte: SCHAFFAZICK et al., 2003.....34
- Figura 6.** Estrutura química do poli (ácido láctico-co-ácido glicólico).....35
- Figura 7.** Distribuição do tamanho das populações na formulação NP-Branca.46
- Figura 8.** Distribuição do tamanho das populações na formulação NP-BSA.....47
- Figura 9.** Análise de pH da formulação NP-BSA ao longo de 90 dias.48
- Figura 10.** Análise de turbidez da formulação NP-BSA ao longo de 90 dias.48
- Figura 11.** Análise de condutividade elétrica ao longo de 90 dias.49
- Figura 12.** Micrografias de MET (Figs. A e B) e MEV (Figs. C e D) da formulação NP-BSA. As figuras A e B representam as nanopartículas de forma esférica, característico de nanoesferas, e tamanho correspondente às análises no Zetasizer Nano ZS. Nas figuras C e D, observa-se a superfície lisa, com pouca rugosidade, e uma polidispersão moderada das nanopartículas. Também é possível observar

micropartículas, correspondente à população de 5% de micropartículas encontradas. A figura C foi avaliada com 16.000 X de aumento, para observação da superfície das nanopartículas, e a figura D foi obtida com um aumento de 1.600 X, para avaliar a dispersão.....50

Figura 13. Citotoxicidade das formulações NP-BSA e NP-Branca sob a linhagem J774 de macrófagos.....51

Figura 14. Citotoxicidade das formulações NP-BSA e NP-Branca sob a linhagem L929 de fibroblastos.52

Figura 15. SDS-PAGE destacadas das pré-formulações F1, F2 e F3 e suas respectivas diluições 1:2 e 1:4.53

Figura 16. Western blot de adrenomedulina-2 extraída das nanopartículas.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de pré-formulações.	38
Tabela 2. Estabilidade ao longo de 90 dias das suspensões de nanopartículas.	40
Tabela 3. Diâmetro médio, PDI e potencial zeta das pré-formulações.	44
Tabela 4. Composição da formulação NP-BSA.	45
Tabela 5. Diâmetro médio, PDI e potencial zeta das formulações NP-BSA e NP-Branca.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCV	Doenças cardiovasculares
IM	Infarto do miocárdio
ADM-2	Adrenomedulina-2
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid); poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
CM	Cardiomiócitos
ICPP	Intervenção coronariana percutânea primária
ESCs	Células-tronco embrionárias
PDI	Índice de polidispersão
DIC	Doenças isquêmicas cardíacas
FC	Fatores de crescimento
CGRP/CT	Peptídeos relacionados com o gene da calcitonina
CRLR	Receptores do tipo receptores de calcitonina
RAMP	Proteínas modificadoras da atividade de receptores
NPs	Nanopartículas
PLA	Poly(lactic acid); poli (ácido láctico)
PGA	Poly(glycolic acid); poli (ácido glicólico)
FDA	Food and Drug Administration; Órgão de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
PVA	Álcool polivinílico
NP-BSA	Nanoesfera de PLGA contendo BSA
DLS	Dynamic light scattering; Espalhamento de luz dinâmico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

BSA	Albumina sérica bovina
EE	Eficiência de encapsulação
IGF-1	Fator de crescimento do tipo insulina
CE	Condutividade elétrica
DMSO	Dimetilsulfóxido
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto 2 ou básico
NRG-1	Neuroregulina-1
HIF	Fator proteico de indução da hipóxia
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PCL	Pararosaniline chloride
PEG	Polietilenoglicol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	IMPACTO GLOBAL DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	17
2.2	INFARTO DO MIOCÁRDIO	18
2.2.1	Fisiopatologia	18
2.3	REGENERAÇÃO CARDÍACA.....	21
2.4	TRATAMENTOS CONVENCIONAIS.....	22
2.5	TERAPIAS EMERGENTES.....	24
2.5.1	Terapia gênica	24
2.5.2	Terapia celular	25
2.5.3	Terapia com fatores de crescimento	26
2.5.3.1	Fatores de crescimento e a angiogênese	27
2.6	ADRENOMEDULINA-2	29
2.7	LIMITAÇÕES DO USO TERAPÊUTICO DE FATORES DE CRESCIMENTO	31
2.8	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	31
2.8.1	Nanopartículas poliméricas para a aplicação cardíaca	33
2.8.2	Copolímero de poli (ácido lático-co-ácido glicólico)	34
2.8.2.1	Propriedades físico-químicas do PLGA	35
2.9	ENCAPSULAMENTO DE PROTEÍNA MODELO EM NANOPARTÍCULAS	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	PRÉ-FORMULAÇÕES.....	38
4.1.1	Preparação das nanopartículas poliméricas por emulsão múltipla (W/O/W)	38
4.2	CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS	39
4.2.1	Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	39
4.2.2	Estabilidade de 90 dias	39

4.3.2	Análises morfológicas	40
4.3.2.1	Microscopia eletrônica de varredura.....	40
4.3.2.2	Microscopia eletrônica de transmissão	40
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	41
4.5	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	41
4.6	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	42
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
5	RESULTADOS	44
5.1	<i>SCREENING</i> DE PRÉ-FORMULAÇÕES	44
5.2	CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS	45
5.3	ESTABILIDADE DE 90 DIAS	47
5.4	ASPECTO MORFOLÓGICO	49
5.5	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	51
5.6	QUANTIFICAÇÃO DE BSA E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	52
5.7	SDS-PAGE	52
6	ARTIGO	54
7	DISCUSSÃO	79
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS	96

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas as principais causas de morte entre homens e mulheres no mundo, dentre todos os grupos étnicos e raciais (MATHERS; LONCAR, 2006). No Brasil, as DCV também são as principais causas de morte, com uma taxa de mortalidade específica para doenças isquêmicas do coração de 53,8 óbitos a cada 100.000 habitantes (DATASUS, 2011).

O conjunto de desordens do coração e vasos sanguíneos, incluindo doenças coronarianas, cerebrovasculares e circulatórias, define as doenças cardiovasculares. A causa mais comum para estas doenças é o bloqueio da passagem do fluxo sanguíneo devido ao acúmulo de placas de ateroma nas paredes internas dos vasos sanguíneos (OMS, 2017). Quando ocorre a ruptura ou erosão destas placas, há a exposição do núcleo e matrizes altamente trombogênicas, as quais geram a oclusão da principal artéria no sítio da ruptura (ANDERSON; MORROW, 2017). Assim, dentre as cardiopatias isquêmicas, o infarto do miocárdio (IM) representa a manifestação mais significativa devido à perda excessiva de cardiomiócitos e o desequilíbrio entre a taxa de morte e renovação celular (OROGO; GUSTAFSSON, 2013).

Atualmente, os tratamentos para o IM incluem o uso de fármacos, procedimentos de reperfusão e revascularização cirúrgicas e, nos casos mais complexos, o transplante de coração (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016c). Estes tratamentos são capazes de dirimir os sintomas, reduzir a carga de DCV e gerar uma melhora significativa nos pacientes. Entretanto, são considerados paliativos e incapazes de regenerar o tecido cardíaco isquêmico danificado (LAKSHMANAN; MAULIK, 2017).

Neste sentido, com o intuito de restaurar a estrutura e função cardíaca após o IM, novas estratégias terapêuticas surgiram nas últimas décadas. Abordagens emergentes incluindo as terapias gênica (GAFFNEY et al., 2007), celular (SEGERS; LEE, 2008) e com fatores de crescimento têm sido exploradas no âmbito da regeneração do miocárdio lesionado através da restauração do fluxo sanguíneo pela indução da angiogênese, caracterizada como um importante mecanismo de reparo (FORMIGA et al., 2012).

A terapia com fatores de crescimento tem despertado grande interesse na medicina cardiovascular, especialmente devido aos mecanismos regenerativos induzidos por estas biomoléculas. Face à isquemia profunda, fatores de crescimento angiogênicos mostram-se capazes de desenvolver uma vasculatura acessória para o aumento do fluxo sanguíneo local (FOLKMAN, 1995). Além disso, diversos estudos já demonstraram resultados promissores no

âmbito da regeneração cardíaca com a aplicação de fatores de crescimento, tais como VEGF, FGF-2 e NRG-1 (FORMIGA et al., 2010, 2014a; PASCUAL-GIL et al., 2017). Dessa forma, a adrenomedulina-2 (ADM-2), também conhecida como intermedina, surgiu como um novo fator angiogênico com alto potencial terapêutico em disfunções endoteliais (YI; WU; JIA, 2006), além de atuar na regulação da proliferação, diferenciação e migração de uma variedade de linhagens celulares (SHINDO et al., 2001).

Apesar do potencial terapêutico, as proteínas apresentam limitações, tais como curta meia-vida biológica, baixa estabilidade em plasma e pouca especificidade aos órgãos-alvos. Assim, a fim de superar estas limitações, recentes avanços na área de nanotecnologia proporcionaram o surgimento dos sistemas de liberação controlada como uma alternativa para melhorar a administração e eficácia das proteínas, uma vez que estas estratégias visam prolongar a meia-vida, manter a bioatividade e controlar sua liberação nos tecidos-alvo (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014).

Os sistemas de liberação controlada, tais como as nanopartículas poliméricas, são definidos como abordagens terapêuticas atuais que têm dado um novo direcionamento às ciências biomédicas. O tamanho pequeno de partícula, a capacidade de encapsular biomoléculas, além de controlar e melhorar a biodistribuição do agente terapêutico, são características que demonstram versatilidade e elevado potencial destes sistemas (AGRAHARI, 2017). Dentre eles, as nanopartículas têm sido descritas como sistemas de liberação controlada de sucesso para muitas aplicações, destacando-se como estratégia promissora para a entrega de proteínas no âmbito da regeneração cardíaca (FORMIGA et al., 2012; TIWARI et al., 2012).

Neste sentido, nanopartículas de poli (ácido lático-co-ácido glicólico, PLGA), caracterizadas com baixo poder imunogênico e adequado perfil de liberação (FORMIGA et al., 2010; JAIN, 2000; SELCAN GUNGOR-OZKERIM et al., 2014), têm sido amplamente utilizadas como sistema de liberação de biomoléculas (VILOS; VELASQUEZ, 2012). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi caracterizar e investigar o potencial *in vitro* de nanopartículas poliméricas contendo adrenomedulina-2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPACTO GLOBAL DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte e invalidez em todo o mundo (ROTH et al., 2015), acarretando em 17,3 milhões de mortes por ano, um número que deverá crescer para mais de 23,6 milhões até 2030 (SMITH et al., 2012). Na última década, a taxa de mortalidade aumentou em 12,5%, e atualmente as DCV compreendem aproximadamente um terço (31%) de todas as mortes (HILL et al., 2017).

A transição epidemiológica no século XX destacou-se por uma queda nas taxas de mortalidade e desabilidade causadas por doenças comunicantes, e pelo crescente número de doenças não-comunicantes (HILL et al., 2017). Devido ao aumento dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças não-comunicantes, as DCV têm sobressaído no cenário mundial (YUSUF et al., 2001).

Um conjunto de doenças cardíacas e distúrbios dos vasos sanguíneos, incluindo principalmente doenças cardíacas coronarianas, cerebrovasculares e desordens circulatórias define as doenças cardiovasculares (OMS, 2017). Nos Estados Unidos (EUA), as DCV apresentam cerca de 801 mil mortes por ano, o que implica em 2.200 óbitos por dia e uma média de 1 morte a cada 40 segundos. Além disso, estima-se que 92,1 milhões de adultos dos EUA têm pelo menos um tipo de DCV, e, até 2030, 43,9% da população adulta desenvolverá alguma doença desse grupo (BENJAMIN et al., 2017). Este elevado impacto das DCV nos EUA tem acarretado em grandes custos hospitalares com a cirurgia cardiovascular, revascularização e intervenções percutâneas, culminando em até US \$ 316,6 bilhões em investimento (MOZAFFARIAN et al., 2016).

Na Europa e União Europeia (UE), as DCV causam mais de 3,9 milhões e 1,8 milhões de óbitos por ano, respectivamente, representando quase metade (45%) de todas as mortes na Europa e mais de um terço (37%) nos países que compõem a UE (OMS, 2008; WILKINS et al., 2017). Para estes países, os custos relacionados às DCV foram estimados em € 169 bilhões em 2006 (LEAL et al., 2006), e, atualmente, alcançam € 210 bilhões por ano (WILKINS et al., 2017).

No Brasil, as doenças cardiovasculares também são uma das principais causas de morte entre homens e mulheres nas cinco regiões do País. De acordo com o DATASUS (2014), a

doença isquêmica cardíaca é a primeira causa de morte, com uma taxa de mortalidade específica de 53,8 óbitos a cada 100 mil habitantes. Na Bahia, esta taxa é de 33 óbitos a cada 100 mil habitantes (DATASUS, 2011).

Estes dados indicam que, assim como nos países desenvolvidos, os países em desenvolvimento também apresentam alto impacto relacionado às doenças cardiovasculares. Somente no Brasil, os investimentos correspondem a 1,74% do produto interno bruto (NETO; SILVA, 2008). Dessa forma, diante do impacto das doenças cardiovasculares no mundo, novas estratégias têm sido investigadas visando a regeneração do miocárdio após eventos patológicos, com o intuito de diminuir consideravelmente o número de indivíduos com insuficiência cardíaca ou que pudesse ir ao óbito.

2.2 INFARTO DO MIOCÁRDIO

As doenças isquêmicas do coração são as principais causas de morte em todo o mundo, gerando grandes encargos econômicos, principalmente para os sistemas de saúde pública. Dentre as cardiopatias isquêmicas, o infarto agudo do miocárdio (IM) configura-se como a principal manifestação, e sua etiologia está associada à diminuição do fluxo sanguíneo coronariano, o qual acarreta em 70% de eventos fatais (MECHANIC; GROSSMAN, 2017).

Os fatores de risco associados ao IM podem ser divididos em fatores de risco não-modificáveis e modificáveis. Os fatores de risco não-modificáveis estão associados com características inerentes ao indivíduo, tais como idade, sexo e histórico familiar. Já os fatores de risco modificáveis incluem o hábito de fumar, exercício, hipertensão, obesidade, colesterol, LDL e níveis de triglicerídeos. Assim, como os fatores modificáveis são passíveis de alteração, o IM pode ser prevenido. Entretanto, a negligência nos cuidados com a saúde, bem como a baixa taxa de abandono dos hábitos prejudiciais, tem levado ao aumento da prevalência desta doença em muitos países (SANCHIS-GOMAR et al., 2016; MECHANIC; GROSSMAN, 2017).

2.2.1 Fisiopatologia

O IM é o resultado de uma isquemia gerada pela interrupção prolongada do fluxo sanguíneo oxigenado para o músculo cardíaco (RUFAlHAH et al., 2016). Esse bloqueio comumente ocorre devido à deposição de placas ateroscleróticas nas paredes internas dos vasos

sanguíneos, gerando o acúmulo de lipídeos e debris celulares necróticos, macrófagos, fatores de crescimento, citocinas, colesterol, cálcio e células inflamatórias. A ruptura destas placas promove aterotrombose, oclusão do vaso e conseqüentemente danos isquêmicos ao órgão (CARBONE et al., 2013).

Ao extrapolar um limiar crítico de isquemia, ou seja, quando a isquemia miocárdica ocorre por um período prolongado, há um agravamento dos mecanismos de reparo celular destinados a manter a função operacional normal e a homeostase do músculo cardíaco. Assim, o limiar crítico excedido acarreta na diminuição do fluxo sanguíneo ao tecido, bem como em danos irreversíveis a nível celular, podendo levar à morte (BOLOOKI; ASKARI, 2010).

O IM apresenta-se de um modo típico, iniciando nas camadas subendocárdicas no centro da área de risco, progredindo para as camadas subepicárdicas e para as zonas marginais. Durante a progressiva oclusão da artéria coronariana, o endotélio cardiovascular é submetido a hipóxia e perda de tensão de cisalhamento. Conseqüentemente, o endotélio microvascular se torna vulnerável, fraco, e eventualmente necrótico. Além disso, esta injúria é acompanhada por diminuições na densidade celular, integridade estrutural, capacidade de perfusão e também perda de vasodilatação (BETGEM et al., 2015).

Nas primeiras horas após o infarto, as condições de hipóxia na microvasculatura conduzem ao aumento do número de espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo, os quais juntos levam à destruição dos cardiomiócitos (CM) saudáveis, células musculares lisas e células endoteliais, seguido pela degradação da matriz extracelular. Esta degradação da matriz extracelular resulta em progressivos danos estruturais e funcionais ao tecido cardiovascular, acarretando no afinamento da parede ventricular e dilatação (RODRIGO et al., 2013). Ainda, há o aumento da produção de citocinas (fator de necrose tumoral, bradicinina, histamina, entre outros) e de moléculas de peroxidação lipídicas, assim como diminuição dos níveis de vitamina no sítio do infarto (BETGEM et al., 2015).

Outros fatores também interferem diretamente na gravidade e tamanho do infarto, incluindo o tamanho da área isquêmica, a duração e intermitência da oclusão coronariana (Figura 1), e a magnitude do fluxo sanguíneo colateral, ou seja, o quão rápido o organismo é capaz de formar novos vasos para perfundir a área ocluída (HEUSCH; GERSH, 2016; SKYSCHALLY; SCHULZ; HEUSCH, 2008).

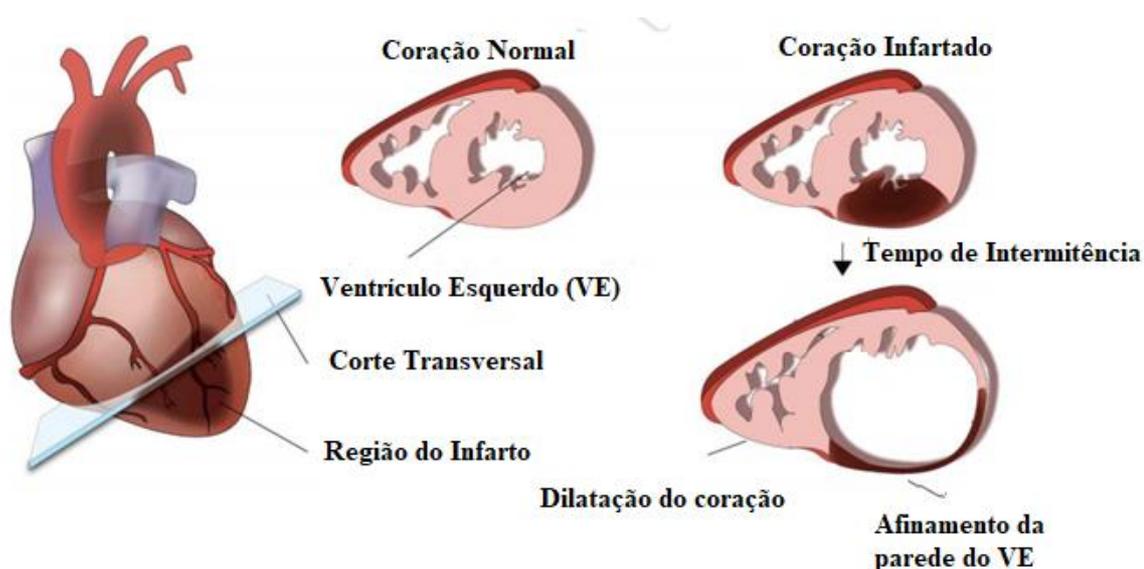


Figura 1. Remodelamento adverso no ventrículo esquerdo após afinamento e dilatação da parede do miocárdio infartado. Fonte: adaptado de AWADA; HWANG; WANG, 2016.

O ventrículo esquerdo humano contém até 4 bilhões de CM, e, em poucas horas, o IM pode levar à apoptose e necrose de 25% deles (MURRY; REINECKE; PABON, 2006). Esta natureza progressiva do IM pode ser ditada parcialmente pela perda expressiva de CM e a incapacidade do miocárdio de se autorregenerar. Assim, para conter esta perda, faz-se necessária a cicatrização do miocárdio infartado. Para isto, uma sequência programada de eventos celulares conduz à formação de uma cicatriz baseada em colágeno. Basicamente, o reparo do miocárdio infartado pode ser descrito em três etapas: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de maturação (FRANGOIANNIS, 2015).

O reparo cardíaco é resultado de uma série complexa e organizada de eventos, iniciados por inflamação intensa e infiltração de células do sistema imunológico que desencadeiam uma intensa, mas transitória resposta inflamatória. Esta resposta digere e limpa a área infartada de células mortas e fragmentos da matriz extracelular e, em seguida, é reprimida para que inicie a fase proliferativa de cicatrização. Durante a fase proliferativa, subpopulações de células mononucleares e macrófagos secretam fatores de crescimento que recrutam e ativam células mesenquimais reparadoras – predominantemente miofibroblastos e células vasculares. Os miofibroblastos secretam grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular a fim de preservar a integridade estrutural do ventrículo esquerdo. Por fim, a apoptose da maioria das células reparadoras marca o fim da fase proliferativa à medida que a formação de uma cicatriz composta de colágeno reticulado amadurece e a neovascularização é ativada (FRANGOIANNIS, 2015; PRABHU; FRANGOIANNIS, 2016).

A perda aguda de células do músculo cardíaco resulta no aumento dos fatores que induzem o padrão único de remodelamento envolvendo a área infartada. A necrose contínua dos CM desencadeia uma cascata de sinais bioquímicos intracelulares que inicia e modula este remodelamento, que inclui dilatação, hipertrofia, além da formação de cicatriz de colágeno (PFEFFER; BRAUNWALD, 1990).

O remodelamento ventricular é dividido em duas fases e pode prosseguir por semanas ou meses. A fase precoce ocorre dentro de 72 horas e envolve a expansão da área infartada, a qual pode resultar na ruptura ventricular precoce ou na formação de aneurisma. Já a fase tardia, que ocorre após 72 horas, envolve todo o ventrículo esquerdo e está associado com o tempo de dilatação, afinamento da parede e distorção da forma ventricular, além da hipertrofia mural. A falha para normalizar o estresse aumentado na parede do músculo resulta na dilatação crescente, recrutamento de deposição de colágeno para cicatrização e deterioração na função contrátil, podendo acarretar em insuficiência cardíaca (SATTLER; ROSENTHAL, 2016; SHARPE, 2000).

Nesse contexto, devido ao processo danoso do remodelamento e a incapacidade do coração de se autorregenerar, a regeneração cardíaca tornou-se um desafio a ser superado por novas terapias.

2.3 REGENERAÇÃO CARDÍACA

A regeneração é um processo conduzido em paralelo à formação dos órgãos durante o desenvolvimento embrionário, o qual requer o controle da divisão celular, diferenciação, migração, integração e maturação. Comparado com o desenvolvimento, a regeneração a partir da injúria é complicada, uma vez que necessita reconstituir o órgão após os danos causados pelo remodelamento. E para isto, é imprescindível limpar o tecido danificado ou com morte celular, regular a inflamação, suprimir a fibrose, reconstituir os CM, matriz extracelular, vasos sanguíneos e sistema linfático (CAHILL; CHOUDHURY; RILEY, 2017).

As terapias farmacológica e de revascularização têm melhorado o remodelamento cardíaco adverso e diminuído a mortalidade causada pela insuficiência cardíaca. No entanto, nenhuma destas abordagens é capaz de regenerar o tecido danificado (LE et al., 2017). Nos mamíferos, um grande obstáculo para autorregeneração após o infarto é a capacidade proliferativa limitada dos CM adultos. Durante o desenvolvimento embrionário tardio esta

capacidade torna-se diminuída e é perdida quase completamente poucos dias após o nascimento (GALDOS et al., 2017; KOCHEGAROV; LEMANSKI, 2016).

Embora ainda não se saiba ao certo a medida com que o coração adulto de mamífero pode se regenerar, o coração de ratos neonatos se regenera facilmente, demonstrando recuperação completa após uma injúria grave. Os vertebrados inferiores também têm a capacidade de regenerar quase completamente o órgão. Por exemplo, o peixe-zebra apresenta plasticidade miocárdica, ou seja, é capaz de realizar a de-diferenciação a fim de promover a proliferação dos CM e a subsequente regeneração após a lesão. Dessa forma, essas descobertas nestes organismos menores sugerem que a geração de novos CM a partir de CM existentes pode ser possível no coração humano adulto (BLOOMEKATZ; GALVEZ-SANTISTEBAN; CHI, 2016; VAN BERLO; MOLKENTIN, 2014).

No campo de investigação do reparo cardíaco, a regeneração do miocárdio após injúria tornou-se uma nova abordagem para o tratamento da insuficiência cardíaca. Embora a intervenção coronariana percutânea primária (ICPP) seja eficaz na restauração do fluxo sanguíneo nos principais vasos do epicárdio após o infarto do miocárdio, a falha para perfundir a microcirculação é comum e está associado com o processo de remodelamento. Neste sentido, a restauração da perfusão miocárdica efetiva através da regeneração da microcirculação na coronária, a qual compreende o endotélio vascular, músculo liso, fibroblastos e pericitos, torna-se essencial para recuperação do coração (CAHILL; CHOUDHURY; RILEY, 2017).

Atualmente, a terapia celular, terapia gênica, engenharia de tecidos, reprogramação e modulação de reparo endógeno, e o uso de biomateriais, têm surgido como estratégias com um amplo espectro de abordagens, na tentativa de “criar” um novo miocárdio ou promover sua regeneração (CAHILL; CHOUDHURY; RILEY, 2017; LAFLAMME; MURRY, 2011).

2.4 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS

Os tratamentos para o IM incluem os agentes farmacológicos, os quais atuam no alívio dos sintomas e na tentativa de impedir a progressão da doença. Dentre estes agentes existem os inibidores da enzima conversora de angiotensina e β -bloqueadores, antiplaquetários orais, nitrato, opioides, entre outros, bem como estratégias de reperfusão e revascularização coronariana, as quais compõem os tratamentos de segunda linha (PESARO; SERRANO JR.; NICOLAU, 2004; REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016a).

Todas as modalidades de revascularização do miocárdio têm como principal objetivo o reestabelecimento do fornecimento sanguíneo adequado ao miocárdio. Dessa forma, em 1945, Vineberg propôs a revascularização de maneira indireta, ou seja, a implantação da artéria torácica no sítio de infarto do miocárdio. Entretanto, o seu método foi questionado. Mais tarde, em 1959, através dos estudos com cateterismo cardíaco na prática clínica, Sones comprovou o procedimento proposto por Vineberg, e então a revascularização do miocárdio tornou-se grande interesse na medicina (PAULO M. PÊGO-FERNANDES, FABIO A. GAIOTTO, 2008).

No âmbito da ICPP, a reperfusão é o tratamento de escolha para reduzir o tamanho do IM, preservar a função sistólica do ventrículo esquerdo e prevenir os pacientes contra o aparecimento da insuficiência cardíaca. Contudo, embora as terapias de reperfusão e revascularização tenham sido aprimoradas, e por consequência a taxa de mortalidade decrescido nos últimos 10 a 15 anos, o número de pacientes com insuficiência cardíaca tem aumentado. Mesmo após estas terapias, 7% dos pacientes com infarto do miocárdio vão a óbito e 22% apresentam insuficiência cardíaca após um ano (HAUSENLOY; YELLON, 2016).

Outro tratamento de segunda linha para o IM e insuficiência cardíaca, também caracterizado pela intervenção cirúrgica, é a cirurgia de revascularização do miocárdio ou simplesmente revascularização do miocárdio. Esta estratégia é uma abordagem invasiva que restaura o fornecimento de sangue ao músculo cardíaco através da desobstrução do vaso sanguíneo, a partir de enxertos nativos ou sintéticos, que são escolhidos de acordo com o grau de dano ao tecido cardíaco (LAKSHMANAN; MAULIK, 2017). De maneira geral, a revascularização cirúrgica é indicada para pacientes com anatomia da coronária favorável, que atendam critérios clássicos e que apresentem complicações ou reincidência da angina e do quadro isquêmico. Ou seja, nem todos os pacientes são candidatos para este procedimento (PIEGAS et al, 2015).

Os enxertos nativos autólogos são considerados padrão ouro na revascularização do miocárdio, uma vez que são coletados dos próprios vasos sanguíneos dos pacientes (artérias ou veias) presentes nas pernas, abdômen, tórax ou braços, diminuindo os problemas de incompatibilidade ou rejeição imunológica. Outras alternativas para revascularização cardíaca incluem a angioplastia e a introdução de stents (LAKSHMANAN; MAULIK, 2017).

Para os pacientes com o quadro clínico mais grave, o transplante de coração faz-se necessário. Em 1967, Barnard foi o primeiro a realizar a cirurgia de transplante cardíaco em humanos, e, a partir deste fato, o interesse pelos transplantes de coração se estendeu por todo o mundo aumentando a sobrevida dos pacientes através da restauração da função cardíaca.

Contudo, nem todos que necessitam são aptos para receber o órgão, seja devido à idade avançada, neoplasia associada, ou outra intercorrência. Já os pacientes que são considerados aptos para esta intervenção enfrentam a escassez de doadores e a fila de espera, que, em última instância, acarretam no óbito de 25% a 40% dos indivíduos antes de serem submetidos ao procedimento (FIORELLI et al., 2008; PIEGAS LS, 2015).

Apesar dos tratamentos convencionais reduzirem, até certo ponto, a carga patológica global das DCV, eles não possibilitam o reparo ou regeneração do tecido isquêmico com injúria (LAKSHMANAN; MAULIK, 2017). Portanto, novas abordagens são necessárias para restaurar a estrutura do tecido cardíaco e seu funcionamento após o infarto.

2.5 TERAPIAS EMERGENTES

Novas terapias vêm surgindo nas últimas décadas a fim de promover o reparo e a regeneração do tecido cardíaco através da compensação dos cardiomiócitos perdidos durante as DCV, isto é, aumentar o número de células funcionais para o melhoramento do desempenho do coração, bem como diminuir a fibrose, restabelecer os parâmetros mecânicos cardíacos e tornar o microambiente menos hostil. Estas novas estratégias terapêuticas incluem as terapias gênica, celular e a utilização dos fatores de crescimento (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016).

2.5.1 Terapia gênica

Segundo a Sociedade Americana de Terapia Gênica e Celular, a terapia gênica é definida como um conjunto de estratégias que modificam a expressão de genes de um indivíduo ou reparam genes anormais. Na cardiologia, esta terapia envolve a entrega de genes para o miocárdio, a qual resulta na produção de fatores de crescimento que estimulam o crescimento de vasos sanguíneos (ROBICH et al., 2011). Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, descoberto por volta de 1970, novas ferramentas foram fornecidas para o desenvolvimento desta abordagem.

A terapia gênica cardiovascular é a terceira aplicação mais popular da terapia gênica, considerada uma abordagem emergente e de amplo espectro para diversas aplicações, sobretudo na angiogênese terapêutica. Em 2012, foram estimados 8,4% de todos os ensaios com esta terapia. Nos últimos anos, no âmbito das doenças cardiovasculares, sua utilização tem

possibilitado avanços na pesquisa, principalmente para os tratamentos de hiperlipidemias, restenose pós-angioplastia, hipertensão e insuficiência cardíaca (RISSANEN; YLÄHERTTUALA, 2007; SCIMIA; GUMPERT; KOCH, 2014).

Para a transferência de genes, dois tipos de vetores podem ser usados: vetores de origem não-viral ou viral. De um modo geral, os vetores usados para transferência de genes para o coração apresentam uma baixa eficiência de transdução, baixa eficácia e são difíceis de serem produzidos em larga escala. Predominantemente, o DNA plasmidial é o vetor mais utilizado, devido à fácil produção e segurança. Entretanto, o seu uso nos ensaios clínicos resultou em baixa eficácia na transferência gênica, além de causar febre transitória, inflamação e até infarto. Neste sentido, torna-se necessário investigar mais a fundo a otimização dos vetores para a entrega de genes, bem como avaliar as abordagens da terapia gênica para as doenças cardiovasculares, uma vez que as mesmas terão de demonstrar vantagens em relação às terapias convencionais, para que se tornem atrativas (GAFFNEY et al., 2007).

2.5.2 Terapia celular

De acordo com as propriedades das células-tronco, sob condições adequadas estas células podem se diferenciar em cardiomiócitos e fornecer o número de células desejadas para o transplante e recuperação do órgão após a disfunção cardíaca. As células-tronco embrionárias (CTE), mesenquimais, pluripotentes induzidas, entre outras, já demonstraram muitos benefícios no quadro de infarto do miocárdio. Estudos mostram que as CTE exibem atividade espontânea de batimento cardíaco, além de melhorar a função ventricular. No entanto, para o uso clínico, estas células ainda necessitam superar grandes obstáculos, como a rejeição do aloenxerto, o potencial oncogênico e as divergências ética e política, que impedem seu uso (GORADEL et al., 2018).

As células-tronco cardíacas isoladas do coração adulto do próprio paciente surgiu como uma alternativa promissora. Experimentos em modelos animais e mais recentemente ensaios clínicos em estágios iniciais têm mostrado resultados animadores. Contudo, a senescência, baixa taxa proliferativa, bem como a disfunção secundária associadas ao IM são grandes limitações destas células no contexto da terapia celular (LALIT et al., 2014). Por outro lado, o uso das células tronco-mesenquimais surge como uma opção para a regeneração dos tecidos com injúria.

As células-tronco mesenquimais emergiram como possíveis contribuintes para a recuperação do músculo cardíaco após o evento de IM, devido a sinalização parácrina e não pelo efeito direto destas células. De um modo geral, o efeito parácrino sugere que o baixo número de células retidas ou que possam ser introduzidas pode promover efeitos restauradores, tais como a formação de novos vasos para evitar que os CM residentes sofram apoptose, além de mobilizar células-tronco cardíacas residentes para potencializar a vascularização e cardiomiogênese (Figura 2) (LALIT et al., 2014; ROURA et al., 2017).

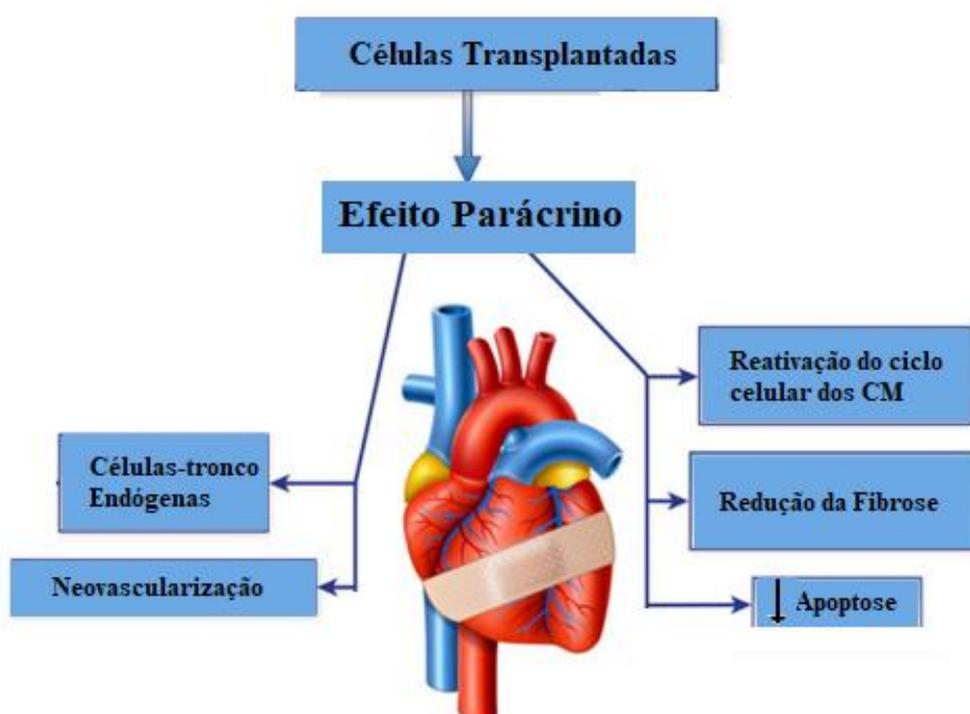


Figura 2. Potenciais mecanismos dos efeitos parácrinos na terapia celular após o infarto do miocárdio. Fonte: adaptado de LALIT et al. 2014.

O efeito parácrino de citocinas e fatores de crescimento a partir das células-tronco transplantadas via terapia celular é fundamental para a melhora funcional do coração. Os fatores parácrinos constituem os contribuintes chave com efeitos pleiotrópicos, incluindo atividades anti-inflamatória, anti-fibrótica e pró-angiogênica (TACHIBANA et al., 2017).

2.5.3 Terapia com fatores de crescimento

As proteínas, incluindo os fatores de crescimento (FC), hormônios, citocinas, quimiocinas, anticorpos, fatores de transcrição e enzimas, são essenciais na sinalização e função celular. As proteínas transmitem sinais que desencadeiam vários processos celulares entre as

células de mesmo tipo ou diferentes, matriz extracelular e diferentes órgãos e tecidos, tornando estas biomoléculas de grande interesse na regeneração cardiovascular (AWADA, H. K., HWANGA, M. P.; WANG, 2016).

Dentre os diferentes agentes terapêuticos que objetivam a regeneração cardíaca após um processo isquêmico, os peptídeos e proteínas representam uma fonte consolidada. Estas biomoléculas são capazes de promover o reparo cardíaco através da ativação de células progenitoras cardíacas endógenas no sítio da injúria, indução da proliferação de cardiomiócitos e neovascularização. Além disso, a maior acessibilidade destes biofármacos e avanços na área minimizaram a imunogenicidade e aprimoraram a meia-vida *in vivo* destas proteínas, possibilitando uma ampla variedade de modalidades terapêuticas (HASTINGS et al., 2015).

A atividade de sinalização parácrina dos fatores solúveis, incluindo citocinas e FC secretados pelas células ou administrados de forma exógena, estimula o reparo cardíaco. Os principais mecanismos potenciais são o aumento da angiogênese, a proteção das células endógenas, atenuação do processo inflamatório e o estímulo das células a entrarem novamente no ciclo celular (HASTINGS et al., 2015; TURAN et al., 2016).

2.5.3.1 Fatores de crescimento e a angiogênese

O uso de FC proteicos na terapia angiogênica foi uma das primeiras modalidades a ser exploradas, uma vez que a angiogênese revela-se uma estratégia promissora para o aumento do fluxo sanguíneo em pacientes com doença isquêmica cardíaca, especialmente aos que não são candidatos às técnicas de revascularização convencionais (THIAGARAJAN et al., 2017).

Durante a isquemia profunda, a resposta natural do organismo inclui a alta regulação de FC angiogênicos e a mobilização de elementos celulares circulantes que, em conjunto, são capazes de desenvolver uma circulação acessória. Esta circulação acessória é conhecida como angiogênese, definida como o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes através do brotamento ou pelo processo de divisão longitudinal (FORMIGA et al., 2012; THIAGARAJAN et al., 2017).

A entrega de proteínas é a estratégia mais direta para a angiogênese terapêutica, sendo considerada uma terapia simples quando comparada as terapias celular e gênica. Muitos FC pró-angiogênicos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e neuroregulina-1 (NRG-1) (FORMIGA et al., 2014a), o fator de crescimento de fibroblastos 2

ou básico (FGF-2) (HOUSE et al., 2015), entre outros, demonstraram-se eficazes não apenas ao estimularem a angiogênese, mas também ao promoverem cardioproteção e reparo de um modo geral (CHU; WANG, 2012).

No processo isquêmico, os fatores de indução da hipóxia (HIF) são imediatamente ativados e induzem a liberação de VEGF-A, um fator angiogênico essencial. Entretanto, nas primeiras horas após o processo de reperfusão do coração, a resposta angiogênica é suprimida pelos inibidores da angiogênese para que haja a limpeza do tecido necrótico local. Assim, após 24 horas de reperfusão, os fatores antiangiogênicos encontram-se não expressos, permitindo que ocorra os processos de proliferação e migração celular, ambos estimulados pelo fator de crescimento (VAN DER LAAN; PIEK; VAN ROYEN, 2009).

Durante a hipóxia, os fatores de crescimento angiogênicos ativados também acarretam na separação dos pericitos que compõem os vasos sanguíneos, permitindo o afrouxamento das junções célula-célula, diferenciação das células endoteliais, entre outras funções. Assim, este processo estimula a formação de novos vasos sanguíneos e perfusão local. Para maturação e estabilização, os pericitos são recrutados para envolver os novos vasos formados (AWADA, H. K., HWANGA, M. P.; WANG, 2016).

Os dois FC mais bem estudados até o momento são o VEGF e o FGF. O VEGF-A é um mitógeno que estimula o crescimento das células endoteliais, e é um potente vasodilatador secundário à produção de óxido nítrico, promovendo a permeabilidade vascular. Além disso, estimula a liberação das células progenitoras endoteliais a partir da medula óssea durante a hipóxia. Já o FGF-2 ou FGF básico induz a proliferação e migração de células endoteliais e células musculares lisas, bem como a organização física das células em estruturas do tipo tubular e angiogênese. Este fator também tem atividade sobre outras moléculas pró-angiogênicas, tais como o fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento derivado de plaquetas, entre outros (AWADA, H. K., HWANGA, M. P.; WANG, 2016; ROBICH et al., 2011). Apesar dos avanços com estes FC, a busca por novos peptídeos e proteínas com atividade angiogênica, como a adrenomedulina-2, é necessária.

Na terapia proteica baseada na angiogênese, uma ou várias proteínas exógenas são administradas para intervir no processo endógeno em vários níveis reduzindo a resposta inflamatória, controlando a renovação da matriz extracelular e promovendo a sobrevivência e proliferação celular no local da lesão através da formação de novas artérias e/ou vasos. Neste sentido, a homeostase metabólica e a função contrátil podem ser restauradas, e, conseqüentemente, a recuperação da função cardíaca pode ser alcançada (FORMIGA et al.,

2012). Contudo, existe um grande desafio em manter a atividade dos FC no sítio específico de interesse.

2.6 ADRENOMEDULINA-2

Descoberta em 2004 por dois grupos de pesquisa, a adrenomedulina-2 (ADM-2), também conhecida como intermedina (IMD), é um novo membro da família de peptídeos relacionados ao gene da calcitonina/calcitonina (CGRP/CT), a qual inclui também a amilina, adrenomedulina (AM), CGRP e calcitonina. A ADM-2 é expressa em órgãos periféricos, sistema nervoso central e também no coração, através dos cardiomiócitos, fibroblastos localizados no ventrículo humano, e pelas células endoteliais da aorta e cardíacas microvasculares (BELL et al., 2016a; HONG et al., 2012; ROH et al., 2004).

O complexo de receptor do tipo receptor calcitonina (CRLR ou CL) e uma das três proteínas modificadoras da atividade dos receptores (RAMP) formam os receptores para AM e CGRP. O complexo de CRLR e RAMP1 formam receptores para CGRP, enquanto que o complexo CRLR e RAMP2 ou RAMP3 formam receptores para AM. Já a ADM-2 pode se ligar não-seletivamente ao complexo de CRLR e em qualquer um dos três RAMP (Figura 3) (BELL; MCDERMOTT, 2008; TAKAHASHI et al., 2006).

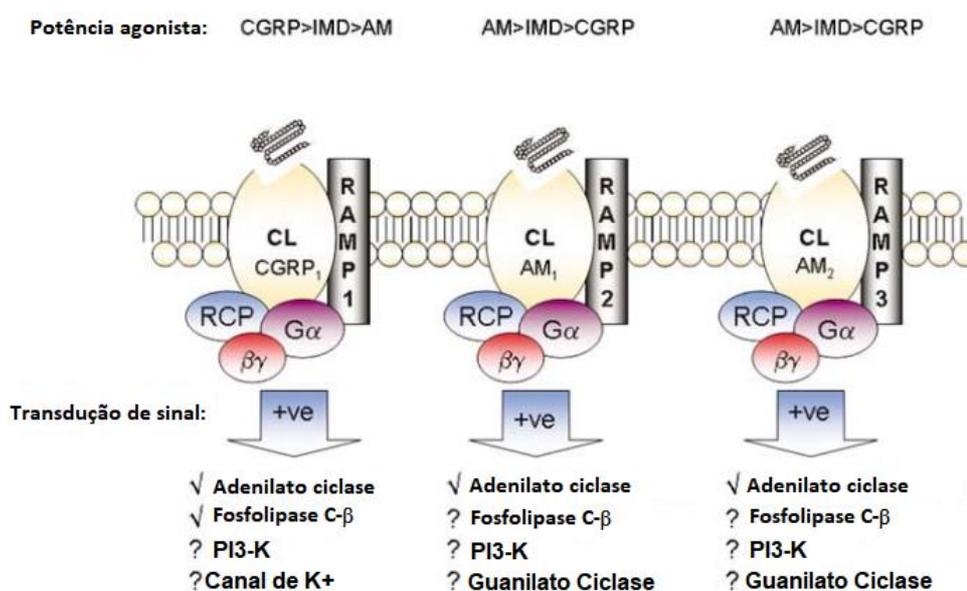


Figura 3. CGRP, adrenomedulina e ADM-2/IMD e suas potências como agonistas aos receptores CL RAMP1, RAMP2 ou RAMP3. Uma proteína componente receptora (RCP) também é acoplada para a ativação ótima do sinal de transdução. Fonte: adaptado de BELL; MCDERMOTT, 2008.

Quando os peptídeos desta família se ligam ao receptor CRLR, este sofre alterações conformacionais as quais resultam no acoplamento às proteínas Gs, ativação da adenilato ciclase e ao acúmulo intracelular de AMP cíclico quando ativado por um agonista. Assim, se a ADM-2 atua através do CRLR, este peptídeo também pode ativar estas vias de sinalização. Para os efeitos farmacológicos nos tecidos vascular e endotelial, a ADM-2 ativa, principalmente, a via de sinalização adenilato ciclase (AC), cAMP/proteína quinase A (PKA), mas outras vias também podem ser ativadas (HONG et al., 2012).

Os peptídeos desta família induzem a múltiplos efeitos biológicos, incluindo potente vasodilatação causada pela AM e CGRP, redução na ingestão de nutrientes pela amilina e diminuição da reabsorção óssea pela calcitonina. Assim como a AM e o CGRP, a ADM-2 estimula a produção de adenosina monofosfato cíclico e desempenha uma potente ação vasodilatatória (HIROSE et al., 2008). Além disso, a ADM-2 tem atividade anti-apoptótica, inotrópica, angiogênica e também atua na diminuição do estresse oxidativo e do remodelamento cardíaco (BELL et al., 2016b; BELL; MCDERMOTT, 2008; HOLLANDER et al., 2014).

O processo de formação do lúmen é um ponto chave na angiogênese, uma vez que ele é crucial para a formação de uma vasculatura bem perfundida. Neste sentido, devido a capacidade de induzir a fosforilação da proteína ERK 1/2 nas células endoteliais através de um mecanismo ainda não identificado, a ADM-2 aumenta efetivamente a perfusão de sangue via o alargamento do lúmen vascular, e este efeito ocorre devido ao aumento do número de células endoteliais e não à alteração da forma destas células (WANG et al., 2017). Este mecanismo indica um potencial uso da ADM-2 como uma nova estratégia terapêutica para doenças isquêmicas, haja vista a capacidade de estimular uma maior perfusão sanguínea.

Ainda no sistema cardiovascular de mamíferos, a ADM-2 tem atividade protetora no coração contra a injúria causada pela isquemia e desempenha uma importante resposta regulatória na insuficiência cardíaca. Em roedores, estudos demonstram que a administração de ADM-2 atenua a lesão da isquemia-reperfusão aguda em corações isolados perfundidos (BELL et al., 2016b).

Nos últimos anos, a ADM-2 tem sido descrita como um peptídeo vital das funções cardíacas e da manutenção da homeostase vascular. Nas doenças vasculares, a ADM-2 desempenha um papel protetor efetivo na função da barreira endotelial, com grande efeito anti-inflamatório. Na aterosclerose, esse peptídeo tem um efeito inibitório na progressão da placa aterosclerótica, atenuando o processo isquêmico (NI et al., 2014).

De maneira autócrina ou parácrina, a ADM-2 atua na regulação das funções cardíacas normais e em processos patológicos, diminuindo a fibrose após injúria, a inflamação e o

tamanho da área do infarto (YANG et al., 2013; ZHANG et al., 2009). Além disso, como descrito pela primeira vez como um novo fator angiogênico, este peptídeo também pode promover a migração celular e a neovascularização (SMITH et al., 2009).

2.7 LIMITAÇÕES DO USO TERAPÊUTICO DE FATORES DE CRESCIMENTO

Apesar do potencial dos FC na angiogênese, a rápida eliminação pelo sistema mononuclear fagocitário e a curta meia-vida biológica, assim como a baixa retenção e atividade funcional são problemas críticos na sua administração sistêmica. Esta administração acarreta em pouco efeito no local desejado, altas doses e repetidas injeções, além de dificultar a adesão à terapia. Sob certas circunstâncias, quando o nível destas doses se encontra minimamente elevado, estas biomoléculas podem apresentar toxicidade e gerar efeitos adversos aos pacientes. Portanto, sua aplicação de modo convencional é limitada, necessitando do desenvolvimento de novos carreadores de drogas (LIU et al., 2014).

As diversas funções cardioprotetoras e reparadoras destacam a ADM-2 como um fator de crescimento potencial a ser explorado na regeneração cardíaca. Entretanto, assim como os demais FC, este peptídeo também apresenta limitações. Neste contexto, a incorporação da ADM-2 em um sistema de liberação controlada torna-se fundamental para uma resposta efetiva na regeneração cardíaca.

Entretanto, para garantir a efetividade de resposta no sítio desejado, os carreadores de droga devem escapar do reconhecimento e captura do sistema mononuclear fagocitário após administração *in vivo*. Dessa forma, os elementos furtivos adicionados à estas nanoestruturas tornam-se uma alternativa. Dentre estes elementos, o polietilenoglicol (PEG) tem sido bastante explorado, tornando as nanoestruturas “invisíveis” e com maior capacidade de permanecerem por mais tempo na circulação sistêmica (MOGHIMI; HUNTER, 2001).

2.8 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

A entrega de drogas é o método ou processo de administração de uma droga ou biomolécula, com finalidade de alcançar um efeito terapêutico. Descrito como um avanço na ciência, os sistemas de liberação controlada surgiram para aprimorar esse processo, oferecendo inúmeras vantagens sob as formas de entrega convencionais, incluindo o aumento da eficácia,

liberação controlada e direcionamento ao sítio-alvo, redução da toxicidade, bem como maior conveniência aos pacientes (TIWARI et al., 2012; UHRICH et al., 1999).

Todos os sistemas de liberação controlada objetivam melhorar a efetividade da terapia com drogas ou proteínas. A melhoria é refletida através do aumento da atividade terapêutica comparada à intensidade dos efeitos colaterais, reduzindo o número de administrações do fármaco durante o tratamento, eliminando a necessidade de inúmeras injeções, e promovendo a atividade dentro da janela terapêutica (UHRICH et al., 1999).

Estas novas abordagens nanotecnológicas têm conduzido a um novo direcionamento no âmbito terapêutico. O tamanho pequeno de partícula e a capacidade de encapsular moléculas pequenas e biológicas apresentam inúmeros benefícios aos agentes encapsulados, protegendo-os do ambiente biológico e melhorando sua biodistribuição. Além disso, a liberação controlada ou em resposta ao estímulo, aprimoram a entrega do terapêutico, tornando estas formulações sistemas versáteis para várias aplicações (AGRAHARI, 2017).

A escolha do sistema de liberação controlada depende das propriedades inerentes às drogas ou biomoléculas, incluindo a solubilidade, peso molecular, bem como a finalidade terapêutica. Com relação às moléculas orgânicas pequenas, como os peptídeos e proteínas, a encapsulação em nanoformulações é a estratégia mais comum. Os tipos de formulações mais comumente empregados são os lipossomas, nanopartículas, nanotubos, conjugados poliméricos e micelas (GELDENHUYS et al., 2017).

Dentre estas formulações, as nanopartículas poliméricas têm sido usadas preferencialmente como um veículo de entrega de drogas, devido à sua excelente eficiência de encapsulação e entrega de um amplo número de agentes terapêuticos. Além disso, o tamanho inferior das NPs poliméricas em relação às micropartículas favorece sua administração pela via parenteral, uma vez que há maior facilidade no translocamento através da superfície epitelial. Ademais, as NPs poliméricas também exibem alta estabilidade em fluidos biológicos comparado aos lipossomas e NPs lipídicas sólidas, tornando-as mais adequadas. Estas versatilidades atreladas à liberação controlada, à proteção do agente terapêutico encapsulado, especialmente proteínas e peptídeos, e à alta biocompatibilidade ao tecido, tornam as NPs poliméricas um sistema de drogas de maior interesse (HE et al., 2010; PATEL et al., 2014; ZHAO et al., 2016).

De um modo geral, os sistemas de liberação controlada baseados em biomateriais têm demonstrado grande potencial na terapia proteica, especialmente na regeneração cardíaca. A anatomia e fisiologia cardíaca têm sido restauradas ao seu estado biológico normal através do uso destes sistemas, os quais oferecem maior proteção para os fatores de crescimento contra a

degradação *in vivo*. Além disso, na terapia celular, as células-tronco dependem da atividade de sinalização celular desempenhada pelos fatores de crescimento para manter sua sobrevivência, crescimento e diferenciação. Dessa forma, os sistemas de liberação de proteínas a base de biomateriais, as células tronco e os fatores de crescimento têm funcionado como uma abordagem integrada que compõe a engenharia de tecidos (Figura 4) (CHERAGHI et al., 2017).

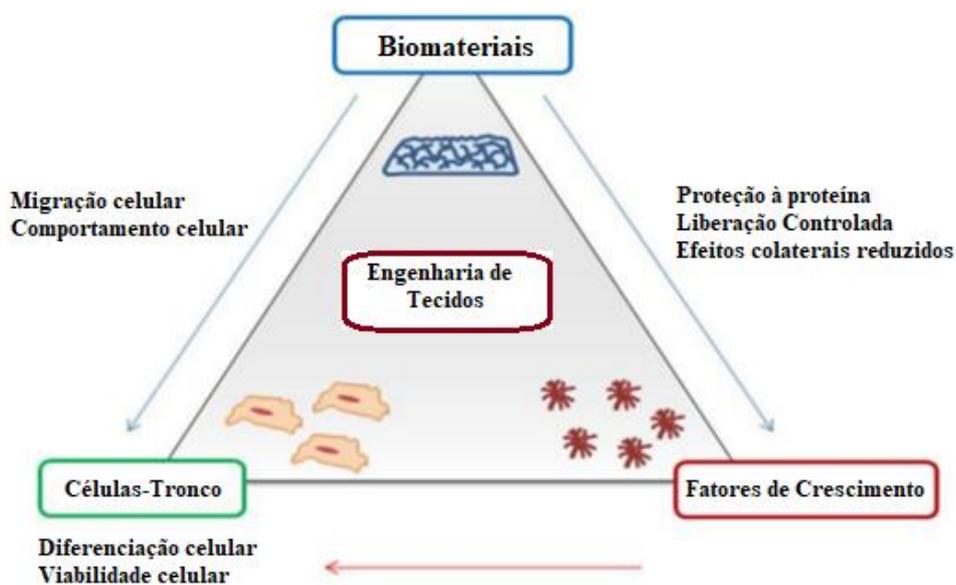


Figura 4. Integração entre os biomateriais, fatores de crescimento e células-tronco através da engenharia de tecidos. Fonte: adaptado de PASCUAL-GIL et al., 2015.

2.8.1 Nanopartículas poliméricas para a aplicação cardíaca

Com o desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados de liberação controlada, um considerável interesse tem surgido acerca das nanopartículas (NPs) biodegradáveis. Mais especificamente, as NPs poliméricas biodegradáveis tem atraído atenção como uma potencial plataforma de entrega de proteínas e peptídeos (SOPPIMATH et al., 2001).

No geral, as NPs poliméricas são caracterizadas como nanocarreadores com tamanho variando de 10 a 1.000 nanômetros, dependendo do método de formulação. Além disso, as NPs podem ser divididas em nanocápsulas e as nanoesferas, 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 bioativo ou agente terapêutico estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica, enquanto que as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o

bioativo pode ficar retido ou adsorvido (Figura 5) (SCHAFFAZICK et al., 2003; SOPPIMATH et al., 2001).

Devido a habilidade para manter a estabilidade da proteína e seu direcionamento ao sítio

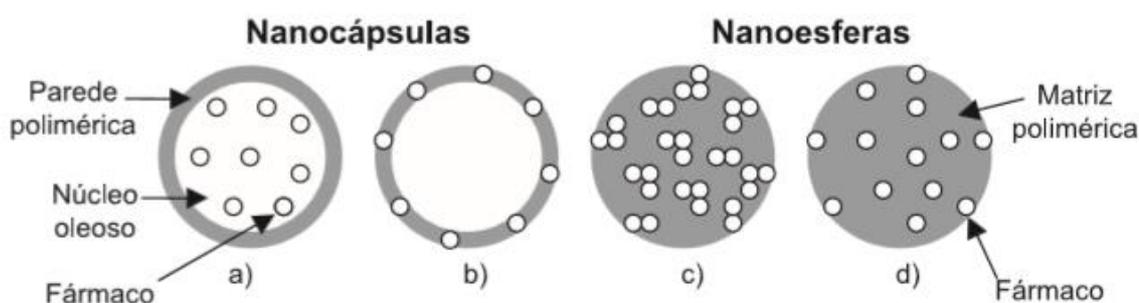


Figura 5. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas. Fonte: SCHAFFAZICK et al., 2003.

onde deverá ser estimulada a angiogênese, as NPs poliméricas tornaram-se carreadores atrativos para o reparo cardíaco. Outrossim, esse nanossistema também é capaz de penetrar nos vasos em tecido perfundido, devido a porosidade e permeabilidade aumentadas. Esse fenômeno é conhecido como o efeito de retenção e permeação aprimorada, e já é bem caracterizado em modelos de câncer, no qual observa-se uma ruptura anormal e a presença de poros quando comparado à vasculatura normal. No infarto do miocárdio, as NPs podem se acumular na região cardíaca com injúria, enquanto a permeabilidade vascular é aprimorada (DVIR et al., 2012; HO; POINARD; KAH, 2016; MATOBA; EGASHIRA, 2014).

Estudos já vêm demonstrando as vantagens do uso de NPs como carreadores de fatores de crescimento no infarto do miocárdio. Como demonstrado por Chang e colaboradores (2013), as NPs de PLGA foram essenciais para o efeito prolongado do fator de crescimento do tipo insulina (IGF-1), o qual promoveu a redução do tamanho do infarto, prevenção contra apoptose e melhora da função cardíaca. Além do infarto, esse nanossistema também pode ter aplicação em outras patologias associadas ao sistema cardiovascular. A exemplo, Matoba e colegas (2017) testaram NPs poliméricas de PLGA para intervir na inflamação causada pela aterosclerose, e concluíram uma melhora no quadro, bem como a efetividade do carreador.

2.8.2 Copolímero de poli (ácido lático-co-ácido glicólico)

Atualmente, vários biomateriais sintéticos são investigados, incluindo caprolactona, poliuretano, e ácidos lático e glicólico (CHERAGHI et al., 2017). Dentre eles, o poli (ácido

lático-co-ácido glicólico) ou PLGA é o nanossistema biodegradável de maior sucesso para o desenvolvimento da nanomedicina, devido à sua hidrólise no corpo, o qual produz metabólitos monoméricos biodegradáveis. Uma vez que estes monômeros são produzidos, uma baixa toxicidade sistêmica está associada ao PLGA, tornando-o um biomaterial seguro (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

O PLGA é um copolímero de poli ácido lático (PLA) e poli ácido glicólico (PGA) (Figura 6) aprovado pelo órgão de Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos, caracterizado como um copolímero biodegradável, altamente biocompatível e o mais popular entre os disponíveis no mercado. Além disso, o PLGA tem sido extensivamente investigado no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, principalmente de NPs, para a entrega de moléculas pequenas como os peptídeos e proteínas (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

Os sistemas de entrega de drogas baseados em nanoestruturas, especialmente os que são constituídos de PLGA biodegradável, exibem múltiplas funcionalidades e diversidade em seus tamanhos, formas e superfícies com uma ampla variedade de cargas eletrostáticas e conjugados biomoleculares, que estão sendo estabelecidos para aplicações nas DCV (MIR; AHMED; REHMAN, 2017).

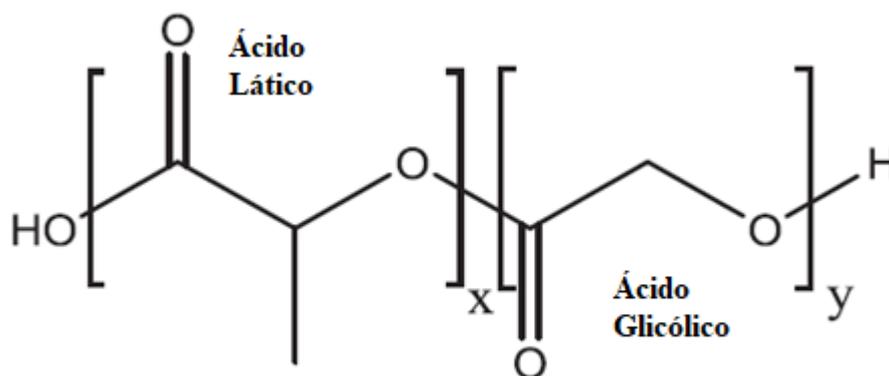


Figura 6. Estrutura química do poli (ácido lático-co-ácido glicólico).

2.8.2.1 Propriedades físico-químicas do PLGA

Os poliésteres são os sistemas biodegradáveis melhor caracterizados e mais amplamente estudados (UHRICH et al., 1999). Dentro dessa classe encontra-se o PLGA, que pode ser

preparado em quase todas as formas e tamanhos, e pode encapsular moléculas também de diferentes tamanhos. É solúvel em uma grande variedade de solventes comumente utilizados, incluindo clorados, tetra-hidrofurano, acetona ou acetato de etila (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

O PLGA é um copolímero hidrofílico e altamente cristalino com uma taxa de degradação relativamente rápida, porém superior a outros homopolímeros. Embora estruturalmente muito similar ao PGA, PLA exibe diferentes propriedades químicas, físicas e mecânicas devido à presença de um grupo metil ligado ao carbono α , que o torna mais hidrofóbico do que o PGA (LANAO et al., 2013). Conseqüentemente, o polímero de PLGA que apresenta mais PLA em sua composição são menos hidrofílicos, absorvem menos água e subsequentemente degradam mais lentamente. Além disso, o PLGA também apresenta propriedades físicas, as quais dependem de múltiplos fatores, incluindo o peso molecular inicial, a relação de ácidos láctico e glicólico, tamanho, exposição a água (forma da superfície), e temperatura de armazenamento (HOUCHIN; TOPP, 2009).

As propriedades químicas destes polímeros permitem a degradação hidrolítica através da de-esterificação. Uma vez degradado, os componentes monoméricos de cada polímero são removidos pelas vias bioquímicas naturais. O PGA é convertido a metabólitos ou eliminado por outros mecanismos, e o PLA pode ser eliminado através do ciclo do ácido tri-carboxílico ou ciclo de Krebs (GENTILE et al., 2014).

2.9 ENCAPSULAMENTO DE PROTEÍNA MODELO EM NANOPARTÍCULAS

Para a caracterização de micro- e nanopartículas carregadas com proteínas, muitos trabalhos têm utilizado a albumina sérica bovina (BSA) como proteína modelo (GUEDJ et al., 2015; PANYAM et al., 2003; SALVADOR et al., 2015). A BSA é uma proteína altamente estável e amplamente usada para avaliar a liberação controlada de novos sistemas de liberação controlada de drogas (MUKHERJEE et al., 2008). Além disso, BSA é uma proteína natural, biocompatível, biodegradável, não-tóxica e não-imunogênica, capaz de formar complexos em várias formas (YU et al., 2014).

Neste contexto, inicialmente este estudo buscou desenvolver e caracterizar nanopartículas de PLGA carregadas com BSA, visando avaliar as características e estabilidade do nanossistema. Após esta etapa de padronização da formulação, o peptídeo adrenomedulina-2 tornou-se apto para ser encapsulado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar a eficácia de uma formulação de ADM-2 à base de nanopartículas poliméricas através de ensaios *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Formular lotes de nanopartículas de PLGA utilizando albumina sérica bovina (BSA) como proteína modelo em ensaios de pré-formulação;
- Caracterizar as nanoformulações quanto aos parâmetros físico-químicos estabelecidos na metodologia;
- Avaliar a estabilidade das suspensões de BSA por um período de 90 dias;
- Avaliar a citotoxicidade da formulação de BSA padronizada em cultivos de macrófagos e cardiomiócitos;
- Produzir e caracterizar nanopartículas de PLGA contendo ADM-2 com base nos ensaios de pré-formulação utilizando BSA;
- Avaliar a citotoxicidade da formulação de ADM-2 em cultivos de macrófagos e cardiomiócitos;
- Avaliar a bioatividade da ADM-2 incorporada nas nanopartículas através de ensaios de proliferação celular em cultivos de células endoteliais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRÉ-FORMULAÇÕES

Com o intuito de padronizar uma formulação de nanopartículas poliméricas, diversas variações foram realizadas na execução da metodologia previamente descrita por Salvador et al. (2015) (Tabela 1). Neste sentido, nove lotes (pré-formulações) contendo a albumina sérica bovina (BSA) como proteína modelo foram preparadas com PLGA (Resomer® RG 502H, 50:50; Mw 7,000 – 17,000; viscosidade 0,16-0,24 dL/g, Sigma Aldrich, Germany) através do método de emulsão múltipla por extração de solvente. Em seguida, com base na formulação padronizada e caracterizada, a formulação contendo adrenomedulina-2 (ADM-2) foi produzida.

Tabela 1. Produção de pré-formulações.

Formulação N°	PLGA (mg)	PVA (%)	Tween 80 (%)	Sonicação (tempo/frequência)	Ultra-turrax® (rpm/min)
F1	100	0,5	-	2 min/6 Hz	12.000/7
F2	100	0,5	6	2 min/6 Hz	12.000/7
F3	100	-	6	2 min/6 Hz	12.000/7
F4	100	0,5	-	-	12.000/7
F5	100	2	-	2 min/6 Hz	7.000/5
F6	100	0,5	-	2 min/6 Hz	7.000/5
F7	2,5	1	-	15/20 s/6 Hz	-
F8	50	2	-	2 min/6 Hz	10.000/5
F9	50	0,5	-	2 min/6 Hz	10.000/5

4.1.1 Preparação das nanopartículas poliméricas por emulsão múltipla (W/O/W)

Inicialmente, 2,5 mg, 50 mg ou 100 mg de PLGA 50:50 foram solubilizados em 3 ml de acetona. Em seguida, foram adicionados lentamente 300 µl de uma solução de BSA a 10% (0,1 mg/µl) em tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4), e a emulsificação ocorreu sob 2 minutos de agitação constante e frequência de 6 Hz, utilizando o sonicador (Branson® Sonifier 450 analógico). Após isto, 0,5%, 1% ou 2% (p/v) de álcool polivinílico (PVA), ou 6% (v/v) de Tween 80, foi incorporado na emulsão primária previamente formada e homogeneizada em diferentes tempos e velocidades com o auxílio de um agitador de alto cisalhamento (T18 Digital Ultra Turrax®) para formação da emulsão múltipla. Para finalizar, 10 ml de isopropanol a 2%

(20 µl/ml) foram incorporados sob agitação overnight e a emulsão permaneceu em temperatura ambiente para permitir a evaporação do solvente. Todos os lotes foram centrifugados em dois ciclos de 17.000g (Rotor JA-12) por 30 minutos através da ultracentrífuga (Beckman® Coulter Avanti J-20). Após a ressuspensão dos pellets em 4 ml de água milli-Q®, as suspensões foram congeladas a -80°C para posterior liofilização a uma pressão de 0,36 mBar e temperatura do condensador a -55°C. Por fim, os liófilos foram mantidos a 4°C.

4.2 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) das nanopartículas foram estimados em triplicata pelo método de espalhamento dinâmico da luz (DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Este equipamento baseia-se no direcionamento de um feixe de luz sobre uma amostra em suspensão e calcula o espalhamento decorrido do movimento Browniano das partículas. Dessa forma, para cada avaliação destes parâmetros, uma alíquota de 1 ml de cada lote em suspensão foi inserida em cubeta e as leituras foram realizadas a um ângulo de detecção fixo de 173° e à temperatura de 25°C.

As análises de cada amostra foram realizadas automaticamente pelo Zetasizer Software.lnk 7.12 (Malvern Instruments, UK), o qual exibe o resultado em tempo real. Todas as caracterizações foram feitas no Zetasizer Nano ZS do Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente (CIEnAm) localizado na Universidade Federal da Bahia (UFBA) de Salvador.

4.2.2 Estabilidade de 90 dias

Para avaliar a estabilidade ao longo de 90 dias (Tabela 2), as suspensões de nanopartículas foram homogeneizadas vigorosamente previamente a cada medição, e em seguida analisadas quanto ao pH e condutividade elétrica (CE) através pHmetro Edge (HANNA® Instruments), e a turbidez foi medida pelo turbidímetro (TB100, Tecnal Adamo®), o qual apresenta uma faixa de trabalho de 0 a 1000 unidade de Turbidez Nefelométrica (NTU). As medições foram feitas em diferentes dias até o dia 90, e ambas as suspensões foram mantidas a 4°C até o momento da análise.

Tabela 2. Estabilidade ao longo de 90 dias das suspensões de nanopartículas.

Dias							
0	3	7	14	21	28	60	90

4.3.2 Análises morfológicas

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET) das nanopartículas contendo BSA foram realizadas na plataforma de microscopia do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz/Bahia com auxílio do Serviço de Microscopia Eletrônica.

4.3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias das nanopartículas foram obtidas utilizando o microscópio JSM-6390LV (JEOL), o qual permite análises morfológicas, mas também a identificação dos elementos químicos presentes. Para o preparo das amostras, 2 mg de nanopartículas liofilizadas foram fixadas em um suporte de alumínio (stub) coberto com uma fita de carbono condutora. Após fixação da amostra, os stubs foram submetidos à metalização em partículas de ouro, e em seguida acoplados ao leitor do MEV para as análises de tamanho e topografia.

4.3.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Para as análises morfológicas das nanopartículas em suspensão, o microscópio JEM-1230 (JEOL) foi utilizado. No preparo da amostra, uma alíquota de 20 µl de nanopartículas em suspensão foram aplicados sobre uma grade de cobre revestida com fino filme de carbono, chamada de grade de formvar, e deixada secar por 2 minutos. Após este tempo, o excesso da amostra foi delicadamente removido com papel absorvente, e em seguida o conteúdo presente na grade de formvar foi marcado negativamente com a adição de uranila a 2%, a qual permitiu o contraste e visualização das nanopartículas. Em seguida, as amostras preparadas foram deixadas em repouso por 1 minuto e o excesso da solução foi retirado.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Para determinar a concentração de BSA encapsulada nas nanopartículas e avaliar a eficiência do encapsulamento de proteína na formulação padronizada (NP-BSA), o kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad, US) foi utilizado. Inicialmente, considerando 100% de encapsulamento, 10 mg de nanopartículas liofilizadas contendo 6 mg de BSA foram rompidas em 500 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e a suspensão obtida continha a concentração de 12 mg/ml de BSA. Da mesma forma, as nanopartículas vazias (sem BSA) também foram rompidas e testadas, funcionando como um controle negativo para o encapsulamento. Já para a preparação da curva padrão, um estoque de BSA na concentração de 1 mg/ml foi diluído em série de 2, obtendo um alcance linear de 31,25 µg/ml – 1.500 µg/ml (31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml; 1.500 µg/ml). O branco foi preparado com água Milli Q®.

De acordo com o protocolo estabelecido pelo kit, após a preparação da curva padrão e das amostras de nanopartículas, 5 µl de cada ponto da curva e das nanopartículas contendo BSA e nanopartículas vazias (NP-Branca) foram dispensados em cada poço (n = 3) em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, 250 µl do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 1x foram adicionados e, após 5 minutos de reação, a leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) sob absorção óptica no comprimento de onda de 595 nm. A eficiência de encapsulação (EE %) de BSA nas nanopartículas foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$EE \% = \frac{(quantidade\ de\ BSA\ total - quantidade\ de\ BSA\ livre)}{(quantidade\ de\ BSA\ total)} \times 100$$

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Para confirmar a integridade e a presença da BSA encapsulada em diferentes lotes de nanopartículas, a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em tris-glicina foi realizada. O gel de resolução a 12% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1, 3.3% C), e o gel de empilhamento a 5% foram preparados como descrito previamente (RAMOS, 2009). O gel de poliacrilamida foi acoplado em uma cuba vertical de eletroforese

(Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad, Canadá) com tampão de migração eletroforética para passagem de corrente elétrica.

Três pré-formulações (F1, F2 e F3) e suas respectivas diluições em 1:2 e 1:4 foram as amostras testadas no gel. À exceção da formulação F3, a qual apenas a diluição 1:2 foi avaliada. Primeiramente, as nanopartículas foram rompidas com DMSO P.A. e a suspensão foi mantida em gelo até o momento da aplicação no gel. As amostras previamente preparadas foram fervidas com tampão de amostra a 95°C por 5 minutos, e em seguida carregadas nos poços do gel. O marcador de peso molecular utilizado para comparar ao peso molecular da BSA foi o Prism Protein Ladder (10-175 kDa) (Abcam). Após o carregamento das amostras, foi aplicada uma voltagem de 200 V para a migração das proteínas, e o sistema foi desligado quando a linha de frente desapareceu completamente do gel.

Ao término da eletroforese, o gel foi fixado em solução contendo metanol a 50%, ácido acético a 10% e água Milli Q® durante 1 hora. Em seguida, o gel foi corado por 1 hora em uma solução do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich®) a 0,25%. Finalmente o gel foi descorado com uma solução contendo ácido acético a 10%, metanol a 30% e água Milli Q®, e deixado sob agitação até a resolução ideal das bandas.

4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Fibroblastos da linhagem L929 e macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®, Life Technologies™, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 50 µg/ml de gentamicina (Novafarma, Anápolis, Goiás, Brasil). As células foram mantidas em cultivo na estufa a 37°C e 5% de CO₂, com troca do meio DMEM suplementado a cada dois dias. Na 3ª passagem, com uma confluência celular de 80-90%, o ensaio foi realizado.

Em microplacas de 96 poços, para ambas as linhagens, a densidade celular de 1×10^4 foi plaqueada em cada poço. Posteriormente, as microplacas foram incubadas durante 24 horas na mesma condição de cultivo. Após o período de incubação, 1 mg de NP-BSA e NP-Branca foram solubilizados em 1 ml de meio DMEM, e após uma diluição em série de 10, as seguintes concentrações foram administradas: 1 mg/ml; 0,1 mg/ml; e 0,01 mg/ml. Como controle negativo, foi utilizado o cloreto de pararosanilina (PCL) e o controle positivo foi apenas o meio DMEM suplementado. Após a aplicação dos tratamentos e controles em triplicata, as microplacas foram incubadas por 72 horas a 37° C e 5% de CO₂.

Para avaliar a citotoxicidade, foram adicionados 20 µl de Alamar Blue® (Invitrogen™) em cada poço, e a placa foi mantida novamente nas mesmas condições durante 4 horas. A leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Devices, USA), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A média foi obtida a partir de três ensaios independentes.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Prism 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). Comparações de duas médias foram analisadas mediante o teste t-Student. As diferenças entre grupos foram avaliadas através de ANOVA com teste post hoc de Dunnet (estudo de estabilidade das formulações) ou Bonferroni (citotoxicidade e bioatividade). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado para justificar o uso de teste paramétrico. Valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Histogramas e valores de diâmetro médio de partícula, PDI e potencial zeta foram obtidos através do software Zetasizer (Malvern®).

5 RESULTADOS

5.1 SCREENING DE PRÉ-FORMULAÇÕES

Com a finalidade de obter uma formulação à base de nanopartículas como um sistema de entrega de proteínas, nove lotes foram produzidos através do método de emulsão múltipla por extração de solvente de acordo com Salvador et al (2015), incorporando BSA. Para cada lote produzido, análises de diâmetro médio, PDI e potencial zeta foram feitas a fim de alcançar uma formulação com os parâmetros físico-químicos ideais. Dessa forma, alterações na massa, velocidade e tempo foram realizadas durante o processo de produção.

Os lotes produzidos foram nomeados de F1 a F9, e, após a triagem, a pré-formulação F9, ou NP-BSA, foi selecionada para padronização através da repetição do método de formulação ($n = 3$). A escolha foi baseada nos parâmetros físico-químicos mais adequados, incluindo diâmetro médio de $264,7 \pm 3,1$ nm, PDI de 0,227 e potencial zeta de $-3,22 \pm 0,2$ mV (Tabela 3), os experimentos seguintes foram realizados com base nas caracterizações desta formulação.

Todos os lotes apresentaram formação de partículas, exceto a pré-formulação F7, que não foi formada (Tabela 3). Os lotes F3 e F4 apresentaram os maiores diâmetros médio, acarretando na formação de micropartículas, e, também, em maiores índices de polidispersão.

Tabela 3. Diâmetro médio, PDI e potencial zeta das pré-formulações.

Formulação N°	Diâmetro médio (nm) \pm SD ^a	PDI	Potencial Zeta (mV) \pm SD ^a
F1	292,6 \pm 8,2	0,322	-5,36 \pm 0,3
F2	448,6 \pm 38,1	0,502	-3,15 \pm 0,3
F3	2335,3 \pm 156,6	0,982	-2,43 \pm 0,2
F4	6178,5 \pm 195,9	1	-2,28 \pm 0,01
F5	406,4 \pm 7,0	0,157	-0,681 \pm 0,05
F6	966,4 \pm 77,7	0,717	-1,22 \pm 0,04
F7	-	-	-
F8	279,3 \pm 5,3	0,293	-1,35 \pm 0,1
F9	264,7 \pm 3,1	0,227	-3,22 \pm 0,2

^a As medições foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

A formulação NP-BSA foi selecionada como a formulação padrão para os ensaios posteriores com ADM-2. Previamente, 50 mg de PLGA 50:50 foram solubilizados em 3 ml de acetona sob agitação magnética, compondo a fase orgânica (FO). Em seguida, foram adicionados lentamente 300 µl de uma solução de BSA a 10% (0,1 mg/µl) em tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4, ou fase aquosa interna (FA₁), e a emulsificação ocorreu sob 2 minutos de agitação constante e frequência de 6 Hz, utilizando o sonicador. Posteriormente, 10 ml de PVA a 0.5% (5 mg/ml), ou fase aquosa externa (FA₂), foram incorporados na emulsão primária previamente formada, e homogeneizada em 10.000 rpm por 5 minutos através do Ultra Turrax®. Após a formação da emulsão múltipla, 10 ml de isopropanol a 2% (20 µl/ml), constituinte da FA₂, foi incorporado sob agitação magnética a 350 rpm, e a formulação permaneceu em temperatura ambiente overnight sob agitação para permitir a evaporação do solvente (Tabela 4). Os processos de centrifugação, congelamento e armazenamento foram realizados conforme mencionado anteriormente.

Tabela 4. Composição da formulação NP-BSA.

Constituintes	FA ₁	FO	FA ₂
PLGA 50:50		50 mg	
Acetona		3 ml	
PVA 0,5%			10 ml
BSA	300 µl		
Isopropanol 2%			10 ml

Nota: FA₁: Fase aquosa interna ou primária; FO: Fase orgânica; FA₂: Fase aquosa externa ou secundária. Para a produção de lotes sem BSA, foram adicionados apenas 300 µl de PBS 1x.

5.2 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

Após a padronização do método de formulação das nanopartículas poliméricas, lotes de NP-Branca e NP-BSA (n = 3) foram analisadas quanto ao diâmetro médio, PDI e potencial zeta, com intuito de avaliar se a encapsulação da BSA altera estes parâmetros.

Como demonstrado na Tabela 5, a formulação NP-Branca apresentou um diâmetro médio de $288,5 \pm 4,3$ nm, PDI de 0,217 e potencial zeta de $-2,93 \pm 0,3$ mV, enquanto que a formulação contendo BSA apresentou um diâmetro médio de $264,7 \pm 3,1$ nm, o PDI de 0,227 e o potencial zeta de $-3,22 \pm 0,2$ mV. Estatisticamente, os resultados da caracterização entre as nanopartículas vazias e as nanopartículas contendo a proteína não foram significantes.

As figuras 7 e 8 apresentam as populações de partículas nas formulações. No lote de nanopartículas vazias, o primeiro pico representa um diâmetro médio de $288,5 \pm 3,1$ nm, com uma elevada intensidade de 97,7%, enquanto que o segundo pico representa uma população de 2,3% de micropartículas com $5,1\mu\text{m}$ (Figura 6). No lote de nanopartículas contendo BSA, o primeiro pico representa um diâmetro médio de $264,7 \pm 3,1$ nm, com intensidade de 96,6%. Novamente, uma população de micropartículas de $5\mu\text{m}$ também foi observada, com baixa intensidade de 4,1%.

Tabela 5. Diâmetro médio, PDI e potencial zeta das formulações NP-BSA e NP-Branca.

Formulação	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
NP-Branca	$288,5 \pm 3,1$	0,217	$-2,93 \pm 0,3$
NP-BSA	$264,7 \pm 3,1$	0,227	$-3,22 \pm 0,2$

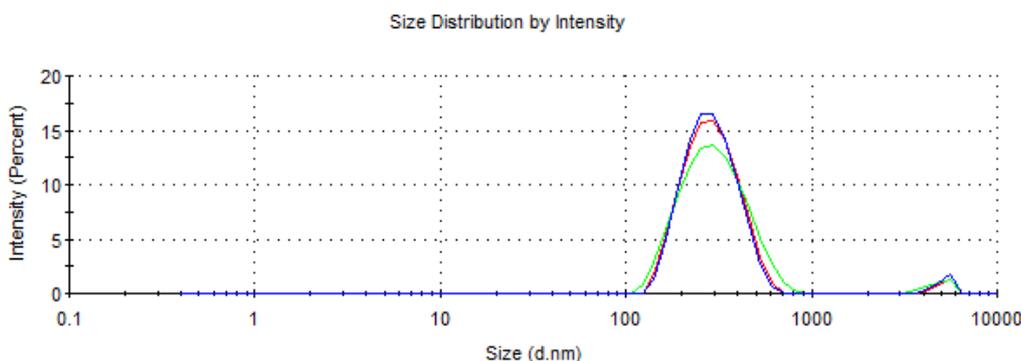


Figura 7. Distribuição do tamanho das populações na formulação NP-Branca.

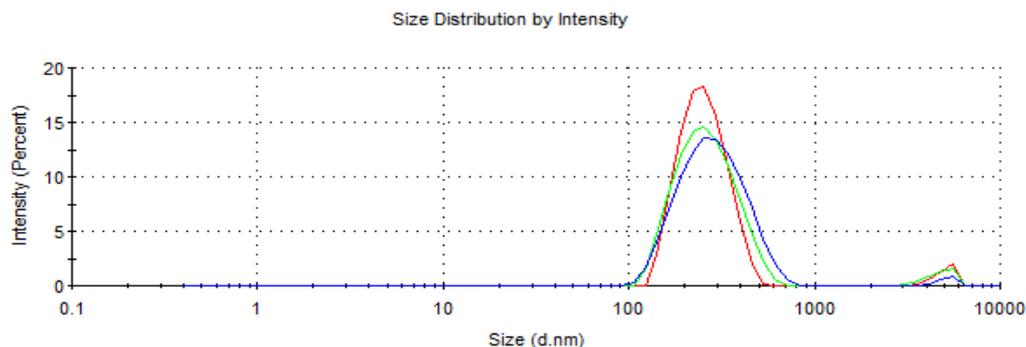


Figura 8. Distribuição do tamanho das populações na formulação NP-BSA.

5.3 ESTABILIDADE DE 90 DIAS

Com o intuito de avaliar a estabilidade da formulação NP-BSA em suspensão, o pH, condutividade elétrica e turbidez foram mensurados em determinados dias (Tabela 2), em temperatura ambiente de 22°C. Os gráficos de pH, condutividade elétrica e turbidez mostram o comportamento das formulações ($n = 2$) no meio de dispersão ao longo de 90 dias.

As análises de pH não mostraram variações significativas ao longo dos 90 dias (Figura 9), entretanto, com relação à turbidez, nos dias 60 e 90 a formulação apresentou uma diminuição do aspecto turvo, e consequentemente, um aumento na transparência e na passagem de luz (** $p < 0.01$) (Figura 10). NP-BSA demonstrou uma maior redução da capacidade de condutividade elétrica nos dias 3, 7 e 14 ($\#p < 0.0005$), e isto também foi observado nos dias 21 e 28 (** $p < 0.01$) e 90 (* $p < 0.05$) (Figura 11). Na avaliação do aspecto visual ao longo do tempo, não foram detectados agregados nos recipientes contendo as suspensões, contudo, com relação à turbidez, foi observada uma leve redução a partir do dia 60.

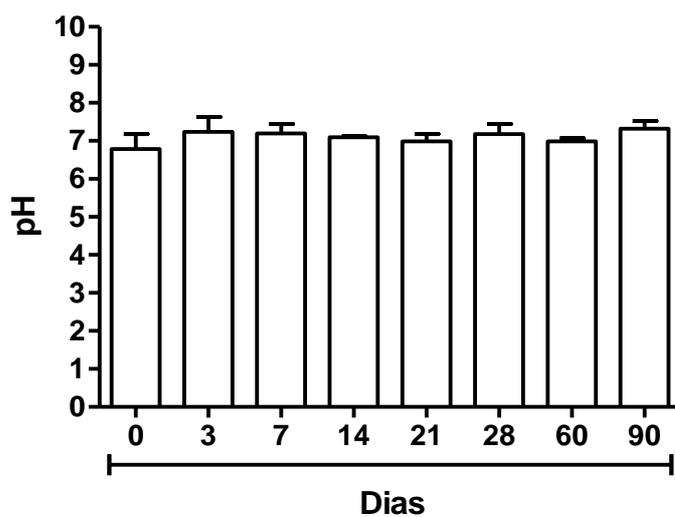


Figura 9. Análise de pH da formulação NP-BSA ao longo de 90 dias.

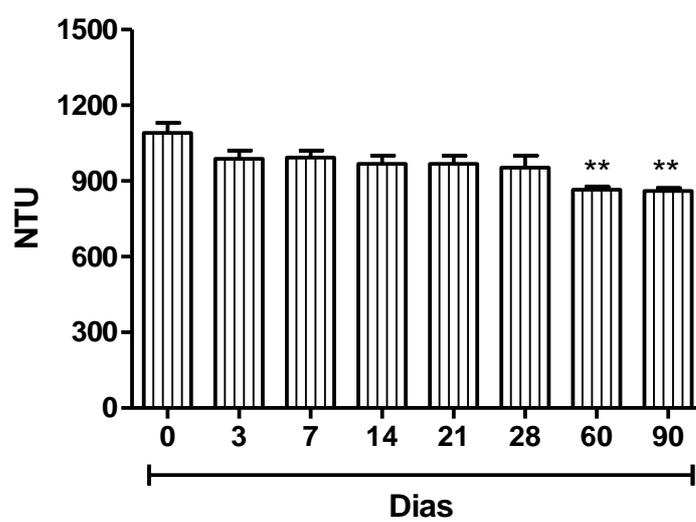


Figura 10. Análise de turbidez da formulação NP-BSA ao longo de 90 dias.

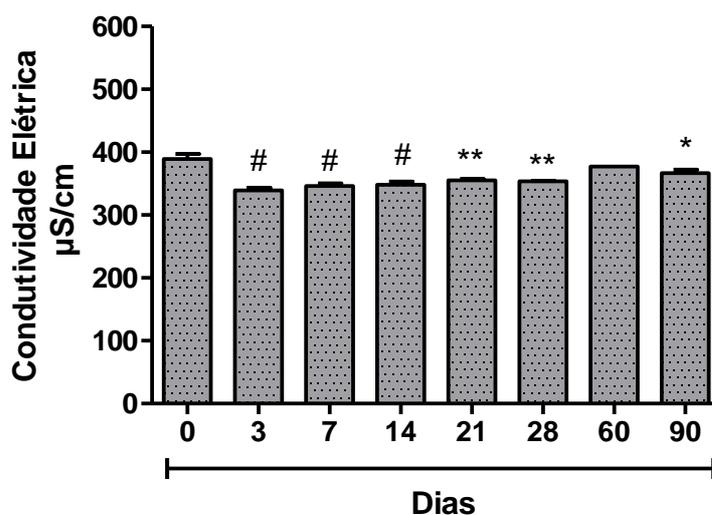


Figura 11. Análise de condutividade elétrica ao longo de 90 dias.

5.4 ASPECTO MORFOLÓGICO

Com o intuito de caracterizar a morfologia, topografia, forma e tamanho, as nanopartículas foram analisadas através da microscopia eletrônica de varredura e transmissão. As micrografias obtidas pelo MEV demonstraram a superfície lisa, com pouca rugosidade, ausência de macroporos e um aspecto esférico (Fig. 12 C, D). Por outro lado, através do MET foi possível confirmar a forma esférica e a delimitação das nanopartículas, mais especificamente das nanoesferas, que são caracterizadas por uma parede polimérica mais escura (Fig. 12 A, B). Além disso, o tamanho das nanopartículas corresponde à estimativa determinada por espalhamento dinâmico da luz. Em todas as micrografias observa-se uma dispersão baixa, sem a presença de agregados.

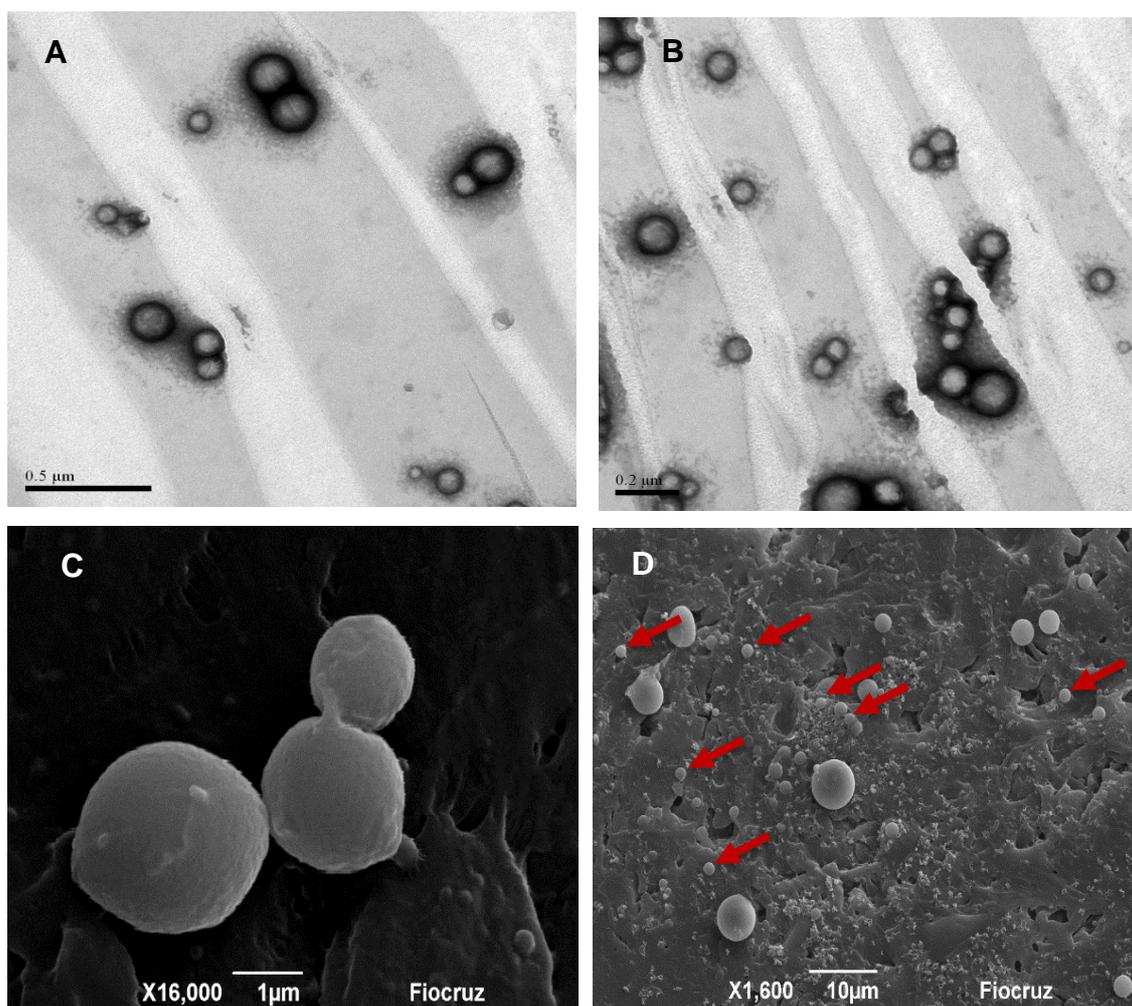


Figura 12. Micrografias de MET (Figs. A e B) e MEV (Figs. C e D) da formulação NP-BSA. As figuras A e B representam as nanopartículas de forma esférica, característico de nanoesferas, e tamanho correspondente às análises no Zetasizer Nano ZS. Nas figuras C e D, observa-se a superfície lisa, com pouca rugosidade, e uma polidispersão moderada das nanopartículas. Também é possível observar micropartículas, correspondente à população de 5% de micropartículas encontradas. A figura C foi avaliada com 16.000 X de aumento, para observação da superfície das nanopartículas, e a figura D foi obtida com um aumento de 1.600 X, para avaliar a dispersão.

5.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Com a finalidade de avaliar a toxicidade dos materiais constituintes da formulação, as linhagens celulares J774 de macrófagos e L929 de fibroblastos foram testadas nos ensaios. A formulação NP-BSA e a formulação NP-Branca (controle da formulação carregada) foram os tratamentos utilizados. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada controle e tratamentos.

Todas as concentrações testadas de NP-BSA e NP-Branca em ambas as linhagens celulares mostraram-se citocompatíveis, isto é, uma vez em contato com as formulações, as células permaneceram viáveis (Figuras 13 e 14). Além disso, não houve diferença significativa entre as formulações em todas as concentrações. Contudo, os tratamentos e DMEM apresentaram significativa diferença de viabilidade celular em relação ao PCL ($p < 0.0001$), o qual apresentou quase 90-100% de toxicidade às células.

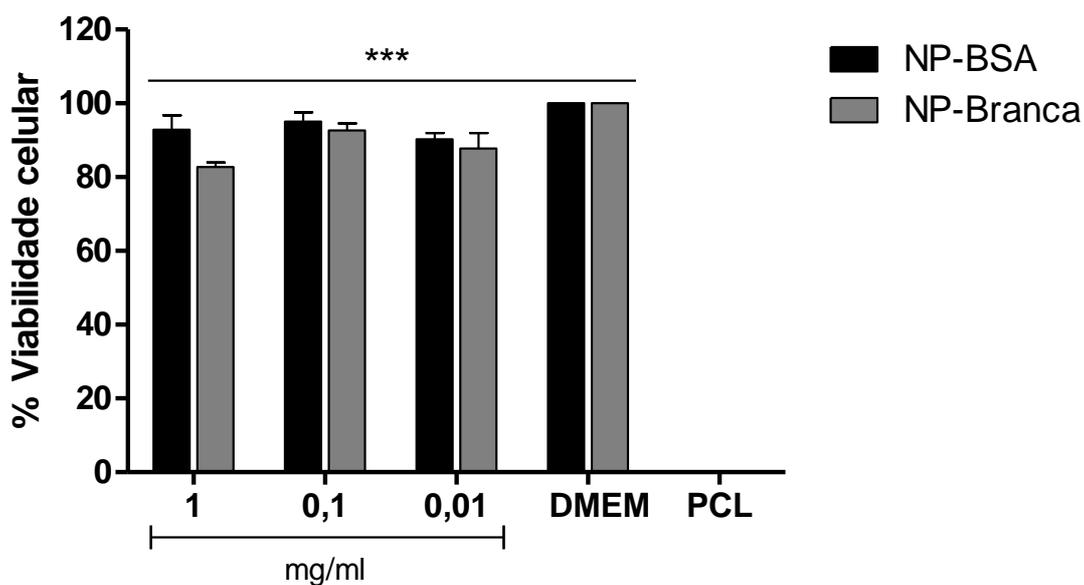


Figura 13. Citotoxicidade das formulações NP-BSA e NP-Branca sob a linhagem J774 de macrófagos.

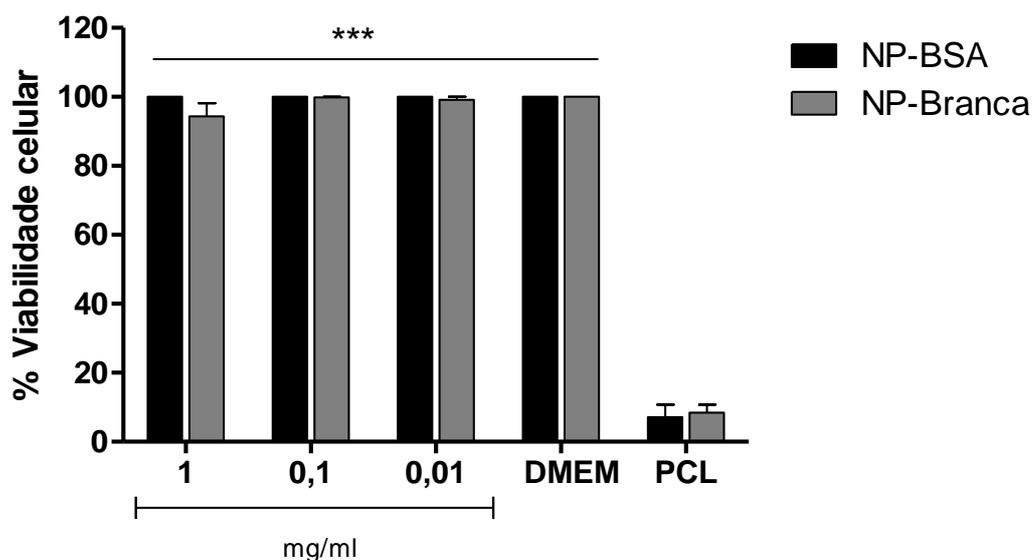


Figura 14. Citotoxicidade das formulações NP-BSA e NP-Branca sob a linhagem L929 de fibroblastos.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE BSA E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Para quantificar o teor de BSA na formulação NP-BSA e confirmar a eficiência do método de encapsulação, o método de Bradford foi realizado. Após o rompimento das nanopartículas, a BSA que estava encapsulada migrou para o sobrenadante, o qual foi posteriormente quantificado. A eficiência de encapsulação foi de aproximadamente 60%.

5.7 SDS-PAGE

A fim de verificar se a BSA estava sendo ou não encapsulada nas nanopartículas de forma íntegra, o ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizado. Todas as três formulações testadas e suas diluições apresentaram a presença da BSA, corroborando a eficácia do método de rompimento das partículas, bem como de encapsulamento de proteína (Figura 15).

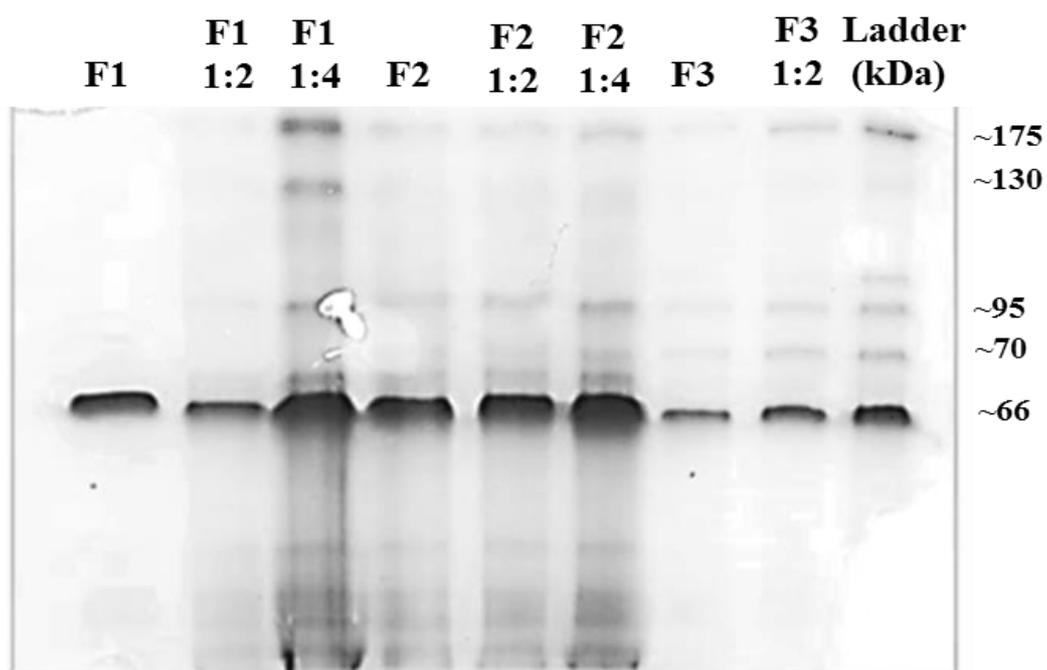


Figura 15. SDS-PAGE destacadas das pré-formulações F1, F2 e F3 e suas respectivas diluições 1:2 e 1:4.

6 ARTIGO

A metodologia, os resultados e a discussão para responder os três objetivos específicos abaixo estão descritos no artigo intitulado “Development and *in vitro* characterization of polymer nanoparticles containing recombinant adrenomedullin-2 intended for therapeutic angiogenesis”, a ser submetido à revista *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.

Objetivos específicos:

- Produzir e caracterizar nanopartículas de PLGA contendo ADM-2 com base nos ensaios de pré-formulação utilizando BSA;
- Avaliar a citotoxicidade da formulação de ADM-2 em cultivo de macrófagos e cardiomiócitos;
- Avaliar a bioatividade da ADM-2 incorporada nas nanopartículas através de ensaios de proliferação celular em cultivos de células endoteliais.

1 **Development and *in vitro* characterization of polymer nanoparticles**
2 **containing recombinant adrenomedullin-2 intended for therapeutic**
3 **angiogenesis**

4

5

6 Helenita Costa Quadros¹, Cássio Santana Meira^{1,2}, Mariana Ivo Khouri¹, Milena Botelho
7 Pereira Soares^{1,2}, William de Castro Borges³, Leonardo Paiva Farias¹, Fabio Rocha Formiga¹

8

9

10 ¹ Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador/BA, Brazil;

11 ² Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador/BA, Brazil;

12 ³ Laboratório de Enzimologia e Proteômica, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas,
13 Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto/MG, Brazil;

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28 ***Corresponding author:***

29 Fabio Rocha Formiga, PhD. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Gonçalo Moniz,
30 Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP 40296-710, Tel. +55 71 3176 2211, Salvador/BA,
31 Brazil; E-mails: fabio.formiga@bahia.fiocruz.br; fabio.formiga@upe.br.

32 **Abstract**

33

34 Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death in both men and women among
35 all racial and ethnic groups worldwide. Growth factor therapy has emerged as novel therapeutic
36 strategy under investigation for CVD. In this sense, adrenomedullin-2 (ADM-2) has been
37 recently identified as a new angiogenic factor able to regulate the regional blood flow and
38 cardiovascular function. However, the therapeutic use of ADM-2 is limited by its short
39 biological half-life and low plasma stability. Poly (lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) micro- and
40 nanoparticles have been investigated as growth factor delivery systems for cardiac regeneration.
41 In this study, we aimed to develop PLGA nanoparticles containing ADM-2 intended for
42 therapeutic angiogenesis. Protein-loaded nanoparticles were prepared by a double emulsion
43 modified method, resulting in 300 nm-sized stable particles with zeta potential around – 30 mV.
44 Electron microscopy analysis by SEM and TEM revealed spherical particles with a smooth
45 surface. High encapsulation efficiency was reached (~ 70%), which was confirmed by EDS
46 elemental composition analysis, SDS-PAGE and LC-MS/MS for peptide identification. *In vitro*
47 cell viability assays were performed in J774 macrophages and H9c2 cardiomyocyte cells, about
48 which PLGA nanoparticles loaded with ADM-2 did not cause toxicity in the range 0.01 – 1
49 mg/ml. Importantly, encapsulated ADM-2 significantly induced cell proliferation in HUVEC
50 and EA.hy926 endothelial cells, indicating the ADM-2 bioactivity was preserved during the
51 encapsulation process. Collectively, these results demonstrate the feasibility of using PLGA
52 nanoparticles as effective delivery systems for the angiogenic peptide ADM-2. It could be
53 represent a novel approach for therapeutic angiogenesis in CVD using recombinant growth
54 factors.

55

56

57 **Keywords:** adrenomedullin-2, PLGA, protein delivery, micro- and nanoparticles

58

59

60

61

62

63 1. Introduction

64 Angiogenesis is a developmental and adult physiological process conducted by a variety
65 of growth factors and cell-adhesion molecules in endothelial and mural cells [1]. This
66 underlying process refers to the sprouting of new capillaries from the postcapillary venules and,
67 in the adult, is mainly stimulated by tissue hypoxia via activation of hypoxia-inducible factor
68 (HIF-1a) expression, which serves to increase transcription of angiogenic growth factor [2].

69 Non-invasive and regenerative therapeutic approaches such as the use of growth factors
70 have focused on restoring blood flow by inducing angiogenesis [3]. In coronary artery disease
71 and peripheral arterial disease (PAD), therapeutic angiogenesis is a new concept with
72 significant clinical potential to alleviate these disorders of tissue ischemia. This includes the
73 direct delivery of growth factors into the ischemic target tissues or of genes and cells that encode
74 for synthesis of growth factors by target tissues [4], [5].

75 Despite their regenerative potential, growth factors are limited due their short biological
76 half-life, low plasma stability and low specificity to target organs [6], requiring the
77 administration of repeated doses to maintain active levels in the vessels. However, drug levels
78 in excess in the body might cause toxicity and collateral effects for the patient. Thus, the use of
79 drug delivery systems emerged to provide safety dose and efficacy of therapeutic agents [7].

80 Poly (lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) is a copolymer of poly (lactic acid) (PLA) and
81 poly (glycolic acid) (PGA) approved by FDA widely used as drug delivery vehicle because
82 their good biocompatibility, biodegradability, safety and mechanical strength [8], [9]. Many
83 studies have showed the efficacy of PLGA nanoparticles and microparticles containing soluble
84 growth factors to repair and regeneration of rat ischemic myocardium ensuring excellent results
85 such as angiogenesis, arteriogenesis and improvement of cardiac function [10]–[13].

86 Among growth factors, adrenomedullin-2 (ADM-2), also known as intermedin, was
87 recently discovered as a potential angiogenic growth factor that belongs to the
88 calcitonin/calcitonin gene-related peptide family [14], [15]. It shown multiple functions,
89 including regulating cardiovascular function, systemic dilatation and augment of the regional
90 blood flow [15]. Moreover, reports have indicated that ischemia-induced cardiac injury is
91 reduced upon IMD peptide treatment and PAD [14], [16]. Therefore, this work sought to
92 develop PLGA nanoparticles containing ADM-2 and assess their *in vitro* biological activities.

93

94

95 2. Material and methods

96 2.1. Materials

97 Recombinant human adrenomedullin-2 (ADM-2₈₋₄₇) and ELISA-Kit adrenomedullin-2
98 (human) were supplied by Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA, USA). PLGA,
99 Resomer® RG 503 H lactide:glycolide 50:50, acid terminated M_w 24-38 kDa was provided by
100 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Poly(vinyl alcohol) (PVA) 87-90% hydrolyzed (M_w: 30-
101 70 kDa) and Bovine Serum Albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-
102 Aldrich, USA). Acetone was obtained from ProQuímicos (Rio de Janeiro, Brazil).
103 Dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from Serva (Heidelberg, Germany). Isopropyl
104 alcohol was obtained from Neon (São Paulo, Brazil). 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-
105 oxide sodium salt (Resazurin) (M_w: 251.17) was supplied from Sigma-Aldrich (Oakville,
106 Canada). All media for cell culture were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA) or
107 LGC Biotecnologia (Cotia-SP, Brasil).

108

109 2.2. Preparation of polymer nanoparticles containing ADM-2

110 Particles containing ADM-2 were prepared by a solvent extraction-evaporation of a
111 double emulsion modified method [17]. Briefly, 50 mg of PLGA were dissolved in 3 ml of
112 acetone. Next, 300 µl of a solution containing ADM-2 (0.1 µg/µl) and BSA (37.5 µg/ml) in
113 saline-phosphate buffer (PBS) were added in the pre-cooled PLGA solution using a sonicator
114 (Branson® 450 sonifier) at 6 of output control and constant duty cycle for 2 min. Then, 10 ml
115 of 0.5% _{w/v} PVA solution were incorporated and homogenized at 10.000 rpm by 5 minutes
116 through homogenizer turbine (Ultra-turrax® T-25, IKA) for double emulsion formation. Next,
117 10 ml of 2% _{v/v} isopropyl alcohol solution were added and the suspension was maintained
118 overnight under magnetic stirring to allow solvent evaporation. After solvent evaporation, the
119 suspension was centrifuged twice at 17.000g by 30 minutes and then lyophilized.

120

121 2.3. PLGA particle characterization

122 2.3.1. Particle size, polydispersity and zeta potential

123 The particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential (ζ) were assessed in
124 different time points (0, 7, 14, 21 and 28 days) by dynamic light scattering technique using a
125 Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). For these analysis, 1 ml of particle

126 suspension was gently stirred before each time point and then analyzed at fixed detection angle
127 of 173° and temperature of 25°C. The particles parameters were expressed as the mean ±
128 standard deviation and the samples were measured in triplicate by Zetasizer software version
129 7.12 (Malvern Instruments, UK).

130

131 **2.3.2. Scanning electronic microscopy (SEM)**

132 SEM was used to examine the shape and surface morphology of polymer particles and
133 to identify their chemical elements by elemental analysis through of Energy Dispersive X-ray
134 Spectrometry (EDS). For both analysis, 2 mg of lyophilized ADM-2 loaded nanoparticles were
135 placed on an adhesive stub and then coated with gold palladium under vacuum using an ion
136 coater. Next, samples were analyzed and photographed at 15 kV by a microscope JSM-6390LV
137 (JEOL LTD, Japan).

138

139 **2.3.3. Transmission electronic microscopy (TEM)**

140 A transmission electron microscope JEM-1230 (JEOL LTD, Japan) was used for
141 particles imaging and to confirm their size. For that, 20 µl of a freshly particulate suspension
142 were dispersed in formvar film-coated grids, and then contrasted with uranyl acetate 2%.
143 Samples were examined after 24 h.

144

145 **2.4. Quantification of ADM-2 by ELISA and encapsulation efficiency**

146 Encapsulation efficiency of ADM-2 into polymer particles was determined by
147 dissolving an amount of lyophilized nanoparticles (5 mg, n = 3) in 1 ml of DMSO. Then, the
148 solution was centrifuged at 15,000g for 10 min and the ADM-2 content was measured through
149 ELISA following the manufacture's protocol.

150

151 **2.5. Structural integrity of ADM-2**

152 ADM-2 content into nanoparticles was qualitatively analyzed by SDS-PAGE.
153 Previously, ADM-2 peptide was extracted from PLGA particles with DMSO (5 mg in 250 µl)
154 and vortexing. This solution was centrifuged (15,000g for 10 min) and aliquots were charged

155 into 18% polyacrylamide gels. After electrophoresis, Coomassie staining SDS-PAGE gels were
156 obtained for protein band identification.

157

158 **2.6. ADM-2 identification by LC-MS/MS analyses**

159 Coomassie staining SDS-PAGE gels (free ADM-2 and ADM-2 extracted from PLGA
160 particles) were processed for protein digestion at 37 °C for 16 h using Sequencing Grade
161 Modified Trypsin (Promega, Madison, USA). Trypsinolysis was terminated by sample
162 acidification with 4 % (v/v) ultra-pure glacial acetic acid (J.T. Baker, Center Valley, USA).
163 Samples were cleaned up by solid phase extraction using a Strata C18-E cartridge (55 µm,
164 Phenomenex, Macclesfield, UK).

165 For LC-MS/MS analyses, samples were loaded onto a UltiMate® 3000 UHPLC system
166 (Thermo Scientific, Bremen, Germany) equipped with an Acclaim PepMap100 C18 Nano-Trap
167 Column (75 µm i.d. × 2 cm, 3 µm, 100 Å; Thermo Scientific) in line with an Acclaim
168 PepMap100 C18 RSLC (75 µm i.d. × 15 cm, 2 µm, 100 Å; Thermo Scientific) capillary column.

169 Trapped peptides were washed for 3 min in 2 % (v/v) acetonitrile/0.05 % (v/v)
170 trifluoroacetic acid, at a flow rate of 5 µL/min, before switching the flow to the capillary column.
171 Peptide separation was carried out at 40 °C under a multi-step gradient using a combination of
172 solvents A (0.1 % (v/v) formic acid), and B (80 % (v/v) acetonitrile/0.1 % (v/v) formic acid).

173 A nano UHPLC system interfaced with a Q-Exactive™ instrument (Thermo Scientific)
174 allowed the mass spectrometric analysis of eluting peptides. A Nanospray Flex Ion Source
175 (Thermo Scientific) fitted with a stainless steel nano-bore emitter needle (150 µm o.d. × 30 µm
176 i.d., Proxeon, Thermo Scientific) was operated at 1.9 kV. MS/MS spectra were acquired at a
177 17,500 resolution with maximum injection time of 150 ms and target value of 2×10^5 ions.

178

179 **2.7. FT-IR spectroscopy**

180 Infrared spectroscopy was carried out to determine the chemical composition of the
181 prepared nanoparticles using FT-IR (Vertex 70, Bruker, EUA) operating in the wavenumber
182 range of 400-4000 cm^{-1} at the absorption mode. For obtaining of infrared spectrum, 3 mg of
183 empty and ADM-2 nanoparticles were analyzed by total reflection attenuated technique.

184

185

186 **2.8. *In vitro* cytocompatibility assays**

187 Cardiomyocytes H9c2 and murine J774 macrophages were used for cytocompatibility
188 tests. Both cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM),
189 supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, Brazil) and 50 µg/mL
190 gentamicin (Novafarma, Anápolis-GO, Brazil). Cells were plated into 96-well culture plates at
191 densities of 5×10^3 cells/well and 10^4 cells/well, respectively. Cells were maintained in an
192 incubator containing 5% CO₂ at 37 °C for 24h. Next, non-loaded and ADM-2-loaded
193 nanoparticles were added to the cells at different concentrations: 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml and 1
194 mg/ml. Cells were incubated for 72 h. DMEM was used as cell viability positive control and
195 pararosaniline chloride (Sigma-Aldrich, 10 µM) served as negative control. Assessment of cell
196 viability was performed by AlamarBlue® reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). Metabolic
197 activity was determined by fluorescence measurement of reaction products read in a
198 spectrophotometer at 570 e 600 nm.

199

200 **2.9. Bioactivity of ADM-2 PLGA nanoparticles**

201 The bioactivity of ADM-2 entrapped into PLGA nanoparticles was evaluated *in vitro*
202 by determining the proliferative capacity of a human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)
203 and a human endothelial hybrid cell line (EA.hy926) after ADM-2 treatment. Cells were
204 maintained in RPMI and DMEM medium, respectively, and were supplemented with 10% fetal
205 bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin.

206 For the proliferation assay using HUVEC, cells were plated into 96-well culture plates
207 at a density of 3×10^3 cells/well and maintained with 10% FBS. After 24 h, FBS was reduced
208 to 5% and the cells were maintained for an additional 24 hours. Then, cells were incubated with
209 supernatant from non-loaded or ADM-2-loaded nanoparticles and free ADM-2 (20 ng/ml).
210 Culture medium was used as control. After incubation at 37°C and 5% CO₂ for 24 h, cell
211 proliferation in each group was measured using Alamar Blue® Cell Viability Assay.

212 Bioactivity assays with EA.hy926 cells were performed into 6-wells culture plates at a
213 density of 7×10^4 . After adherence of the cells, FBS was removed from medium and the cells
214 were maintained by 24 hours under normal culture conditions. Then, cells were treated with 20
215 ng/ml of free ADM-2 or ADM-2 extracted from the nanoparticles. Culture medium was used
216 as control. After incubation at 37°C and 5% CO₂ for 24 h, cell proliferation in each group was
217 measured using Alamar Blue® Cell Viability Assay.

218 3.0. Statistical analysis

219 Results are expressed as mean \pm SEM. Comparisons among groups were assessed by
220 ANOVA with a Bonferroni post-hoc correction when the measured values were normally
221 distributed. Statistics were calculated using Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San
222 Diego, CA, USA). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

223

224 4. Results and Discussion

225 4.1. Characterization of PLGA nanoparticles

226 As reported in Table 1, size of non-loaded particles varied from 271.9 ± 8.4 nm to 292.8
227 ± 5.8 nm between day 0 and day 28. This increase was also found for ADM-2 particles, which
228 varied from 312.1 ± 1.3 nm to 372.9 ± 14.1 nm. Despite slight increasing on particle size after
229 ADM-2 encapsulation, PDI values and zeta potential measurements did not change
230 significantly over time. Of note, surface charge of particles indicates good colloidal stability
231 (zeta potential ~ 31 mV). These data corroborate an additional study of stability monitoring pH,
232 electrical conductivity and turbidity of the produced PLGA suspensions (not shown).

233 In this study, PLGA nanoparticles were successfully prepared by a solvent extraction-
234 evaporation of a double emulsion modified method, which produced spherical particles with a
235 smooth surface visualized by SEM (Fig. 1-A) [13, 19]. These particles were submitted to EDS
236 analysis in order to obtain elemental information. Amounts of carbon and oxygen were
237 identified, which was expected due to both protein and PLGA composition. Unlike to non-
238 loaded nanoparticles, it was found a remarkable amount of sulfur in ADM-2 nanoparticles,
239 which could be attributable to cysteine and methionine amino acids content in the ADM-2
240 peptide sequence (Fig. 1-B-D).

241 Particle formation was also confirmed by TEM, corroborating the particle size analysis
242 performed by dynamic light scattering (Fig. 2). Particles were dispersed with some aggregation,
243 indicating that the double emulsion modified method did not elicit a strong particle aggregation
244 during formulation process.

245

246 4.2. Determination of ADM-2 encapsulation and structural integrity

247 Entrapment of ADM-2 into PLGA nanoparticles was demonstrated by encapsulation
248 efficiency $\sim 70\%$ (Table 2), which correlates to other studies encapsulating growth factors such
249 as VEGF [10, 12, 18] and NRG-1 [13], which have molecular weight similar to ADM-2.
250 Corroborating this finding, SDS-PAGE revealed the presence of an ADM-2 specific band after

251 extraction from PLGA particles (Fig. 3). Apparently, extracted ADM-2 from nanoparticles
252 migrated faster than unencapsulated or free ADM-2, probably due to charge alteration attributed
253 to the extraction solvent (DMSO) used for break up nanoparticles. These results confirm the
254 efficiency of ADM-2 encapsulation and either the maintenance of peptide integrity after the
255 formulation process, ensuring biological activity of peptide.

256

257 **4.3. ADM-2 identification by LC-MS/MS analyses**

258 Peptide identification by high-resolution LC-MS/MS analyses were performed using
259 samples of excised SDS-PAGE gels. A specific band at 4 kDa was detected, which corresponds
260 to free ADM-2 peptide. In contrast, no clear band was visualized in the running sample of
261 ADM-2 extracted from PLGA particles (Fig. 4-A). For both Coomassie staining SDS-PAGE
262 gel samples, plots with data analyses of LC-MS/MS are showed in Fig. 4-B. A spectral
263 similarity between samples of free ADM-2 peptide and ADM-2 extracted from PLGA particles
264 were found, confirming the findings of encapsulation efficiency by ELISA and structural
265 integrity by SDS-PAGE.

266

267 **4.4. FT-IR spectroscopy**

268 The FT-IR spectrum of the empty PLGA nanoparticles is showed in Fig. 5-A. It
269 spectrum demonstrated a strong peak, observed at 1751 cm^{-1} (carbonyl -C=O stretching), as
270 well as a peak at $1088\text{--}1166\text{ cm}^{-1}$ (C-O stretching), both spectra are typical of PLGA polymer.
271 In the ADM-2-loaded NPs was observed the same spectrum of empty PLGA NPs, indicating
272 entrapping successfully of peptide in nanoparticles (Fig. 5-B, C).

273

274 **4.5. Cell viability**

275 Cytocompatibility assays were performed in J774 macrophages and H9c2
276 cardiomyocyte cells exposed to non-loaded and ADM-2-loaded nanoparticles at different
277 concentrations. After 72 h, cell viability was analyzed using the Alamar Blue assay (Fig. 6-A,
278 B). There were no significant differences observed in the percentage cell viability between cells
279 treated with all three concentrations of particles and untreated cells (cell viability positive
280 control, DMEM). Still, all PLGA particles treatments were significantly different from negative

281 control ($p < 0.0001$ vs. PCL). Therefore, no toxic concentrations were determined in the range
282 0.01 – 1 mg/ml, whereas the nanoparticles did not alter cell viability of both cell lines.

283

284 **4.6. ADM-2 bioactivity**

285 To assess whether ADM-2 bioactivity was preserved during the encapsulation process,
286 the biological activity of ADM-2 extracted from PLGA nanoparticles was examined in HUVEC
287 and EA.hy926 endothelial cells. Encapsulated ADM-2 induced an increase in proliferation of
288 HUVEC 1.3-fold ($p < 0.05$) in comparison with control (DMEM). Of note, this increase was
289 similar that promoted by free ADM-2 ($p = \text{NS}$) (Fig. 7-A). Regarding the bioactivity assays with
290 EA.hy926 cells, ADM-2 extracted from PLGA nanoparticles significantly induced the cell
291 proliferation 1.4-fold ($p < 0.0001$) (Fig. 7-B). Surprisingly, this treatment showed an even higher
292 cell proliferation than free ADM-2 ($p < 0.01$). This could indicate that PLGA nanoparticles
293 efficiently protect the small peptide ADM-2 from proteolytic degradation, guaranteeing its
294 biological activity.

295

296 **5. Conclusions**

297 In this study, the angiogenic peptide ADM-2 was successfully encapsulated into PLGA
298 nanoparticles by a solvent extraction-evaporation of a double emulsion modified method. This
299 formulation presented high encapsulation efficiency and stability. Of note, ADM-2-loaded
300 nanoparticles were *in vitro* compatible with J774 macrophages and H9c2 cardiomyocytes with
301 no toxic concentrations. Importantly, the bioactivity of the loaded ADM-2 was preserved, as
302 demonstrated by their capacity to induce endothelial cell lines *in vitro*. In summary, this is the
303 first report dedicated to development of delivery systems containing ADM-2, which could be
304 represent a novel approach for therapeutic angiogenesis using recombinant growth factors.

305

306 **Acknowledgements**

307 Authors thank to Dr. Marilda Gonçalves and Dr. Clarissa Gurgel from FIOCRUZ/BA for her
308 kindly donation of HUVEC and EA.hy926 endothelial cells, respectively. Financial support
309 from CNPq (Grant number 461865/2014-9) and Capes is gratefully acknowledged.

310

311 **References**

- 312 [1] N. Ferrara and R. S. Kerbel, “Angiogenesis as a therapeutic target,” *Nature*, vol. 438, no.
313 7070, pp. 967–974, 2005.
- 314 [2] B. H. Annex and M. Simons, “Growth factor-induced therapeutic angiogenesis in the
315 heart: Protein therapy,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 65, no. 3, pp. 649–655, 2005.
- 316 [3] F. R. Formiga, E. Tamayo, T. Simón-Yarza, B. Pelacho, F. Prósper, and M. J. Blanco-
317 Prieto, “Angiogenic therapy for cardiac repair based on protein delivery systems,” *Heart*
318 *Fail. Rev.*, vol. 17, no. 3, pp. 449–473, May 2012.
- 319 [4] W. S. Jones and B. H. Annex, “Growth factors for therapeutic angiogenesis in peripheral
320 arterial disease,” *Curr. Opin. Cardiol.*, vol. 22, no. 5, pp. 458–463, Sep. 2007.
- 321 [5] H. Thiagarajan, U. Thiyagamoorthy, I. Shanmugham, G. Dharmalingam Nandagopal,
322 and A. Kaliyaperumal, “Angiogenic growth factors in myocardial infarction: a critical
323 appraisal,” *Heart Fail. Rev.*, 2017.
- 324 [6] J. D. S. Rebouças, N. S. Santos-magalhães, and F. R. Formiga, “Review Article Cardiac
325 Regeneration using Growth Factors : Advances and Challenges,” pp. 271–275, 2016.
- 326 [7] T. Matoba, J. Koga, K. Nakano, K. Egashira, and H. Tsutsui, “Nanoparticle-mediated
327 drug delivery system for atherosclerotic cardiovascular disease,” *J. Cardiol.*, vol. 70, no.
328 3, pp. 206–211, 2017.
- 329 [8] R. A. Jain, “The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable
330 poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2475–
331 2490, 2000.
- 332 [9] Y. Xu, C. S. Kim, D. M. Saylor, and D. Koo, “Polymer degradation and drug delivery in
333 PLGA-based drug–polymer applications: A review of experiments and theories,” *J.*
334 *Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 105, no. 6, pp. 1692–1716, 2017.
- 335 [10] F. R. Formiga *et al.*, “Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves
336 vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion
337 model,” *J. Control. Release*, vol. 147, no. 1, pp. 30–37, 2010.
- 338 [11] T. Simón-Yarza, F. R. Formiga, E. Tamayo, B. Pelacho, F. Prosper, and M. J. Blanco-
339 Prieto, “PEGylated-PLGA microparticles containing VEGF for long term drug
340 delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 440, no. 1, pp. 13–18, 2013.

- 341 [12] Y. Oduk *et al.*, “VEGF Nanoparticles Repair Heart after Myocardial Infarction.,” *Am. J.*
342 *Physiol. Heart Circ. Physiol.*, p. ajpheart.00471.2017, 2017.
- 343 [13] F. R. Formiga *et al.*, “Controlled delivery of fibroblast growth factor-1 and neuregulin-
344 1 from biodegradable microparticles promotes cardiac repair in a rat myocardial
345 infarction model through activation of endogenous regeneration,” *J. Control. Release*,
346 vol. 173, pp. 132–139, Jan. 2014.
- 347 [14] R. S. Smith, L. Gao, G. Bledsoe, L. Chao, and J. L. Chao, “Intermedin is a new
348 angiogenic growth factor,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 297, no. 3, pp. H1040–
349 H1047, 2009.
- 350 [15] S. Y. Zhang, M. J. Xu, and X. Wang, “Adrenomedullin 2/intermedin: A putative drug
351 candidate for treatment of cardiometabolic diseases,” *Br. J. Pharmacol.*, 2017.
- 352 [16] K. Chen *et al.*, “Intermedin1–53 enhances angiogenesis and attenuates adverse
353 remodeling following myocardial infarction by activating AMP-activated protein
354 kinase,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 15, no. 4, pp. 1497–1506, Mar. 2017.
- 355 [17] A. Salvador *et al.*, “Design and evaluation of surface and adjuvant modified PLGA
356 microspheres for uptake by dendritic cells to improve vaccine responses,” *Int. J. Pharm.*,
357 vol. 496, no. 2, pp. 371–381, 2015.
- 358 [18] F. Yi, H. Wu, and G.-L. Jia, “Formulation and characterization of poly (D,L-lactide-co-
359 glycolide) nanoparticle containing vascular endothelial growth factor for gene
360 delivery,” *J. Clin. Pharm. Ther.*, vol. 31, no. 1, pp. 43–48, 2006.
- 361 [19] R. L. McCall and R. W. Sirianni, “PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-
362 emulsion with Vitamin E-TPGS,” *J. Vis. Exp.*, no. 82, pp. 1–8, 2013.
- 363
- 364
- 365
- 366
- 367
- 368
- 369

370 **Captions for Figures and Tables**

371

372 **Table 1.** Characterization and stability data of polymer nanoparticles

373

374 **Figure 1.** (A) Representative scanning electron microscopy images of ADM-2 PLGA
375 particles. (B, C) EDS spectra showing elemental composition analysis of non-loaded
376 and ADM-2 PLGA particles, respectively. (D) Amino acid sequence of ADM-2 peptide.

377

378 **Figure 2.** (A) Representative transmission electron microscopy images of ADM-2
379 PLGA nanoparticles; scale bar = 2 μ m. (B) Size distribution of these particles measured
380 by dynamic light scattering.

381

382 **Table 2.** Encapsulation efficiency of ADM-2 entrapped in PLGA nanoparticles.

383

384 **Figure 3.** Structural integrity of ADM-2 by SDS-PAGE. Coomassie gel showing bands
385 of free ADM-2 (no encapsulated, 500 ng) and ADM-2 extracted from PLGA
386 nanoparticles (350 ng). Visible bands of BSA of both non-loaded (blank PLGA) and
387 loaded nanoparticles are indicated.

388

389 **Figure 4.** ADM-2 identification by LC-MS/MS analyses. (A) Coomassie staining SDS-
390 PAGE gels excised for protein digestion (dotted rectangles). Note a specific band at 4
391 kDa of free ADM-2 peptide (1500 ng). For ADM-2 PLGA lane, no clear band is
392 visualized, which was excised, digested and submitted to LC-MS/MS analyses for
393 ADM-2 peptide identification. (B) Data from high-resolution LC-MS/MS analyses,
394 showing spectral similarity between samples derived from SDS-PAGE gels excised of
395 free ADM-2 peptide and ADM-2 PLGA.

396

397 **Figure 5.** FT-IR spectra analysis of empty (A) or non-loaded and ADM-2 PLGA
398 particles (B). (C) FT-IR spectrum plotting among both particle formulations.

399

400 **Figure 6.** Cell viability post-administration of PLGA particles in J774 macrophages (A)
401 and H9c2 cardiomyocytes (B) at different concentrations (1.0 mg/ml, 0.1 mg/ml and
402 0.01 mg/ml). DMEM medium was used as cell viability positive control and
403 pararosaniline chloride (PCL, 10 μ M) served as negative control. *** $p < 0.0001$ vs. PCL.

404

405 **Figure 7.** Bioactivity of ADM-2 PLGA particles in HUVEC (A) and EA.hy926 (B)
406 endothelial cells. Proliferation induced by free ADM-2 or ADM-2 extracted from PLGA
407 nanoparticles both at 20 ng/mL for 24 h. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.0001$ vs. RPMI or DMEM
408 medium control. (C) Representative images of EA.hy926 cell density in each treatment.

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

Table 1

428

Analysis	Non-loaded NPs			ADM-2-loaded NPs			
	Days	Mean diameter (nm)	PI	Zeta Potential (mV)	Mean diameter (nm)	PI	Zeta Potential (mV)
Day 0		271.9 ± 8.4	0.29 ± 0.01	-27.1 ± 0.5	312.1 ± 1.3	0.34 ± 0.01	-33.2 ± 1.01
Day 7		273.6 ± 4.4	0.3 ± 0.01	-33.5 ± 0.7	285.2 ± 3.7	0.27 ± 0.03	-32.4 ± 0.25
Day 14		249.6 ± 1.4	0.2 ± 0.01	-26.8 ± 0.7	317.8 ± 4.46	0.34 ± 0.01	-30.1 ± 0.52
Day 21		281.1 ± 3.5	0.28 ± 0.02	-30.3 ± 0.8	355.2 ± 2.8	0.42 ± 0.03	-29.6 ± 0.32
Day 28		292.8 ± 5.8	0.31	-20.2 ± 0.6	372.9 ± 14.1	0.4 ± 0.03	-31.1 ± 0.15

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

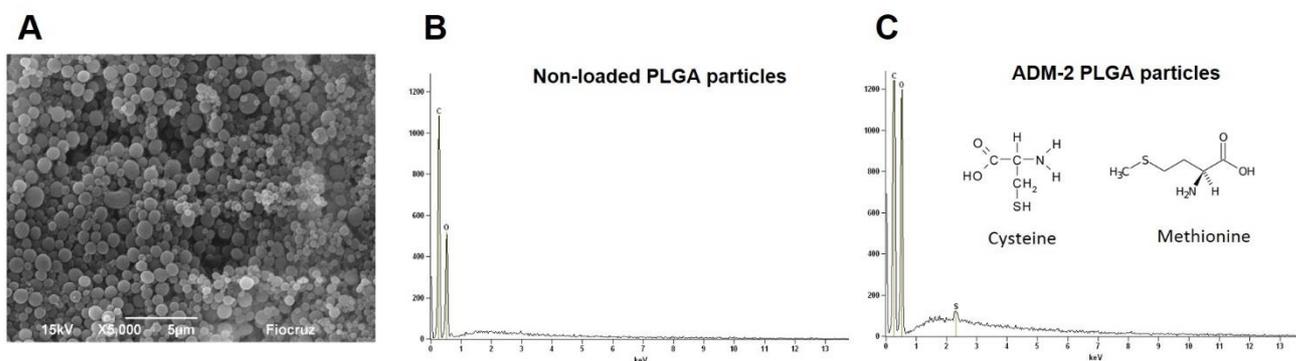
448

449

450

Figure 1

451

**D**

Val-Gly-Cys-Val-Leu-Gly-Thr-Cys-Gln-Val-Gln-Asn-Leu-Ser-His-
 Arg-Leu-Trp-Gln-Leu-Met-Gly-Pro-Ala-Gly-Arg-Gln-Asp-Ser-Ala-
 Pro-Val-Asp-Pro-Ser-Ser-Pro-His-Ser-Tyr-NH₂

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

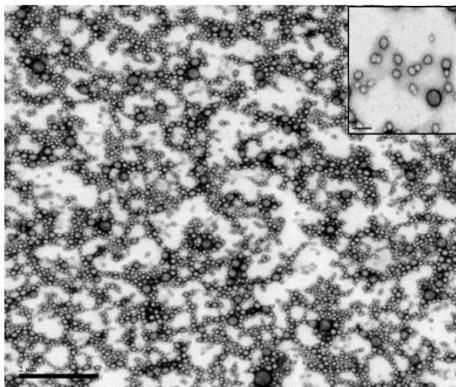
466

467

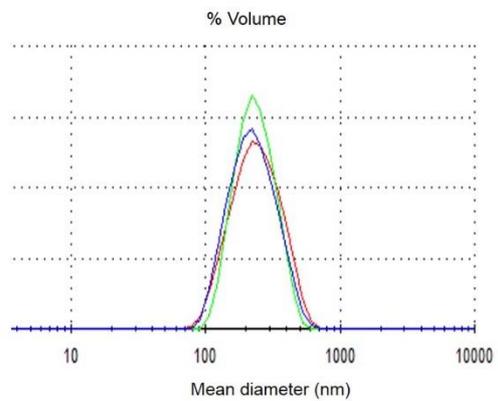
Figure 2

468

A



B



469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

Table 2

487

Polymer composition	Encapsulation efficiency (%)	ADM-2 concentration (ng/mg)
50 mg PLGA (Resomer 503H)	67.28%	134.5

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

Figure 3

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

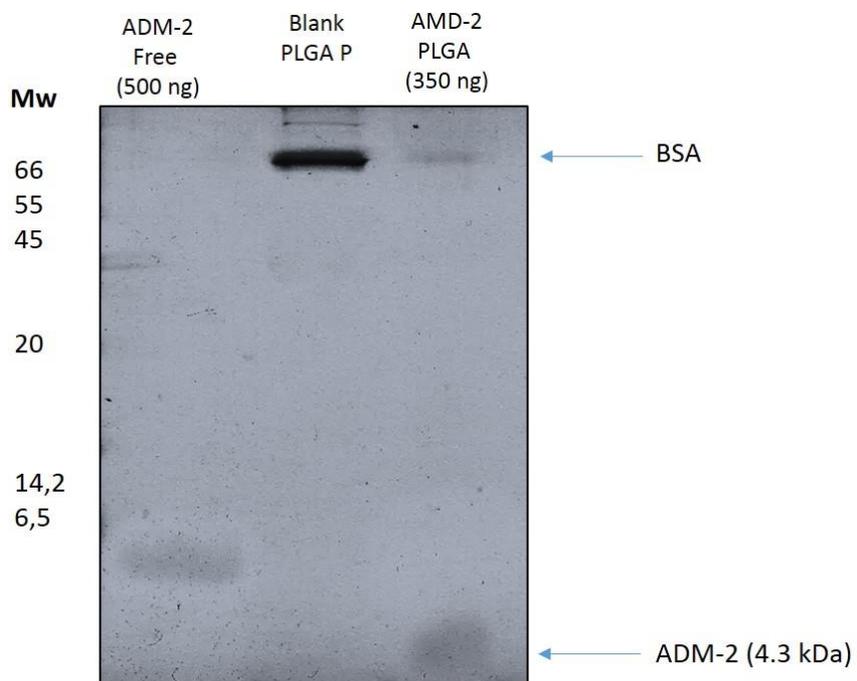
529

530

531

532

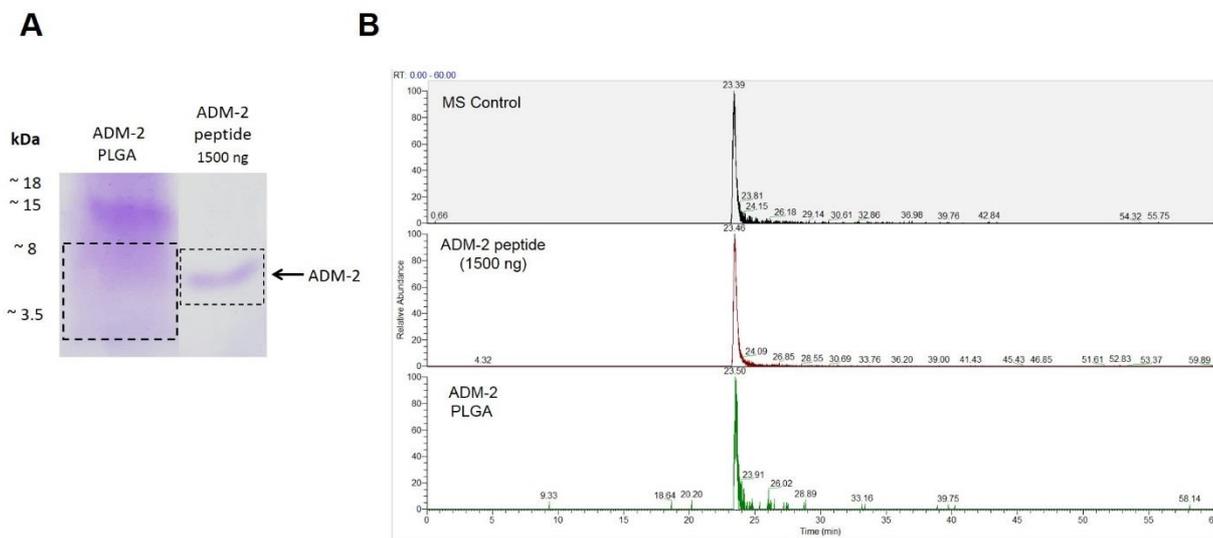
533



534

Figure 4

535



536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

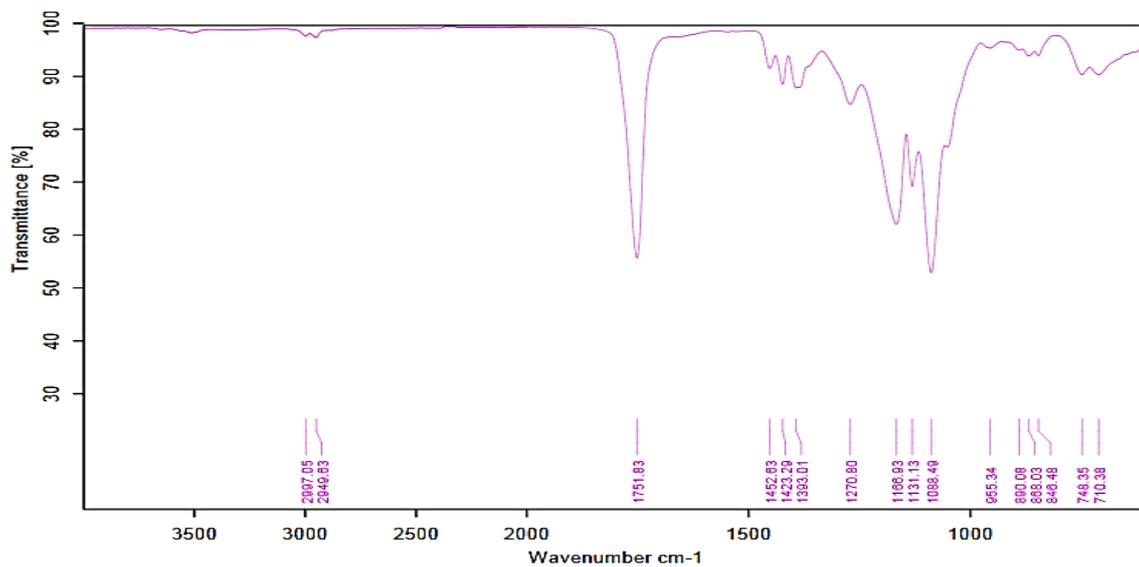
550

551

552

Figure 5

553

**Fig. 5-A.** FT-IR of empty PLGA nanoparticles.

554

555

556

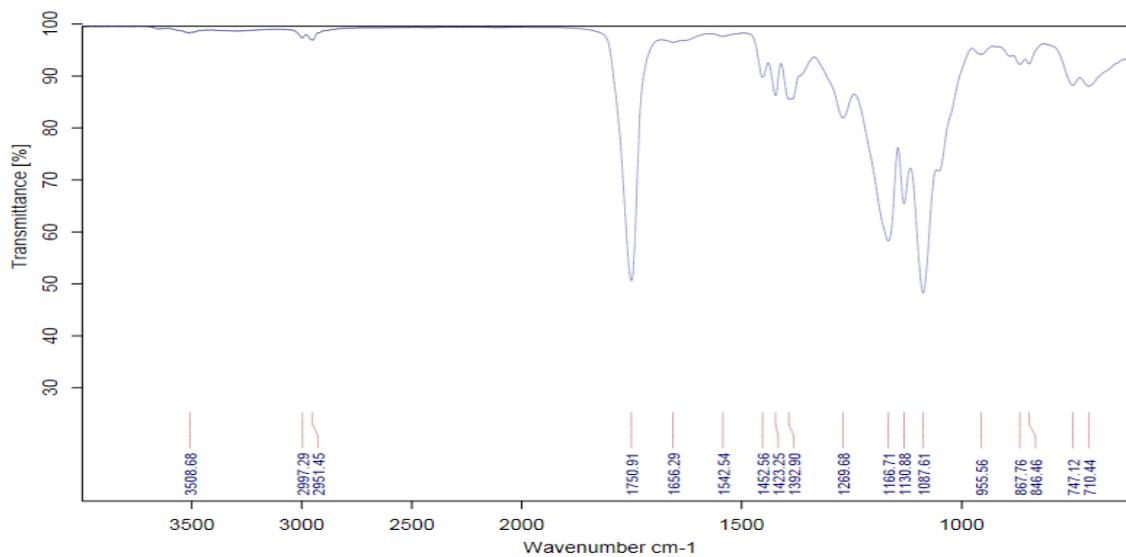
557

558

559

560

561

**Fig. 5-B.** FT-IR of ADM-2 loaded in PLGA nanoparticles.

563

564

565

566

567

568

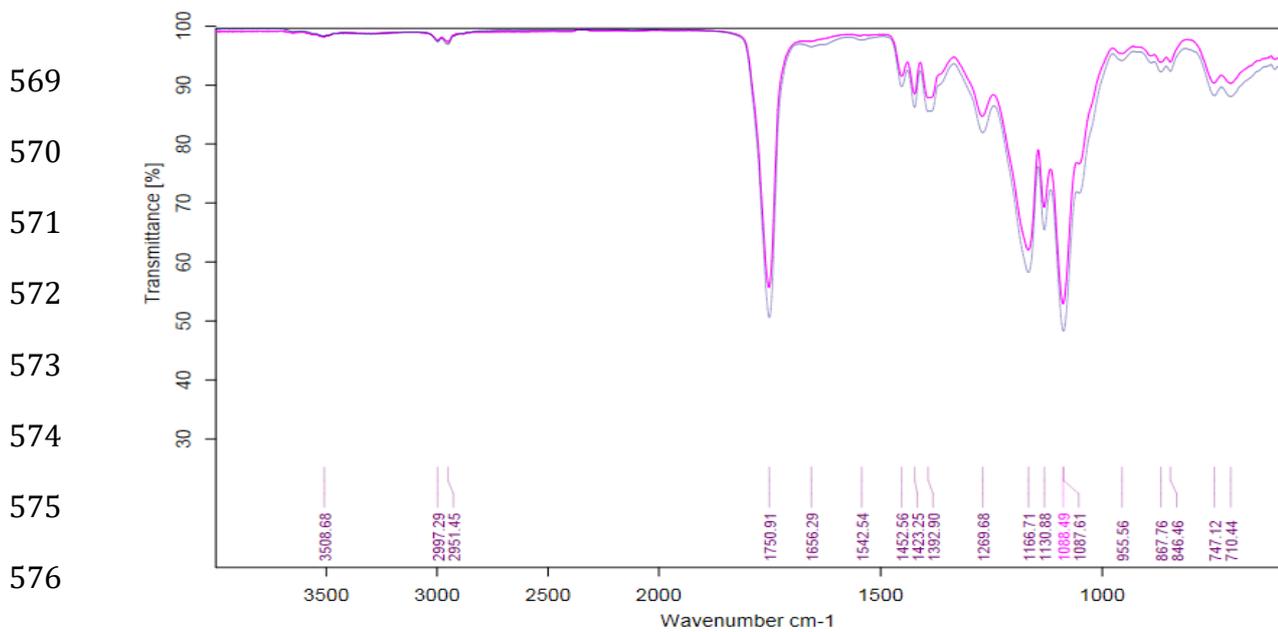


Fig. 5-C. FT-IR spectrum plotting among both particle formulations.

595

Figure 6

596

597

598

599

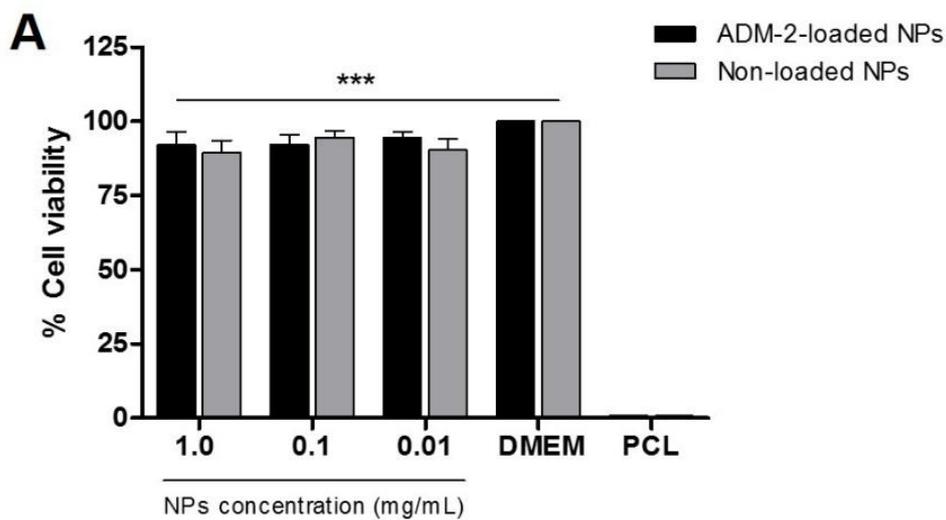
600

601

602

603

604



605

B

606

607

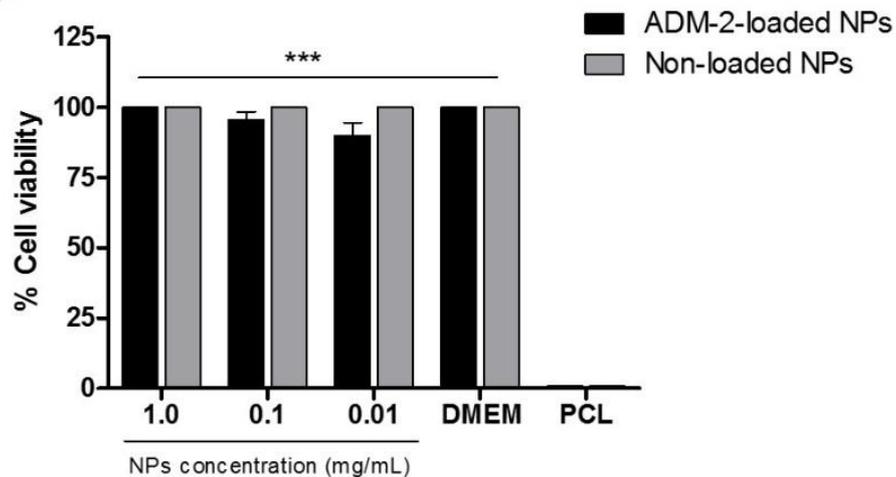
608

609

610

611

612



613

614

615

616

617

618

619

620

621

Figure 7

622

623

624

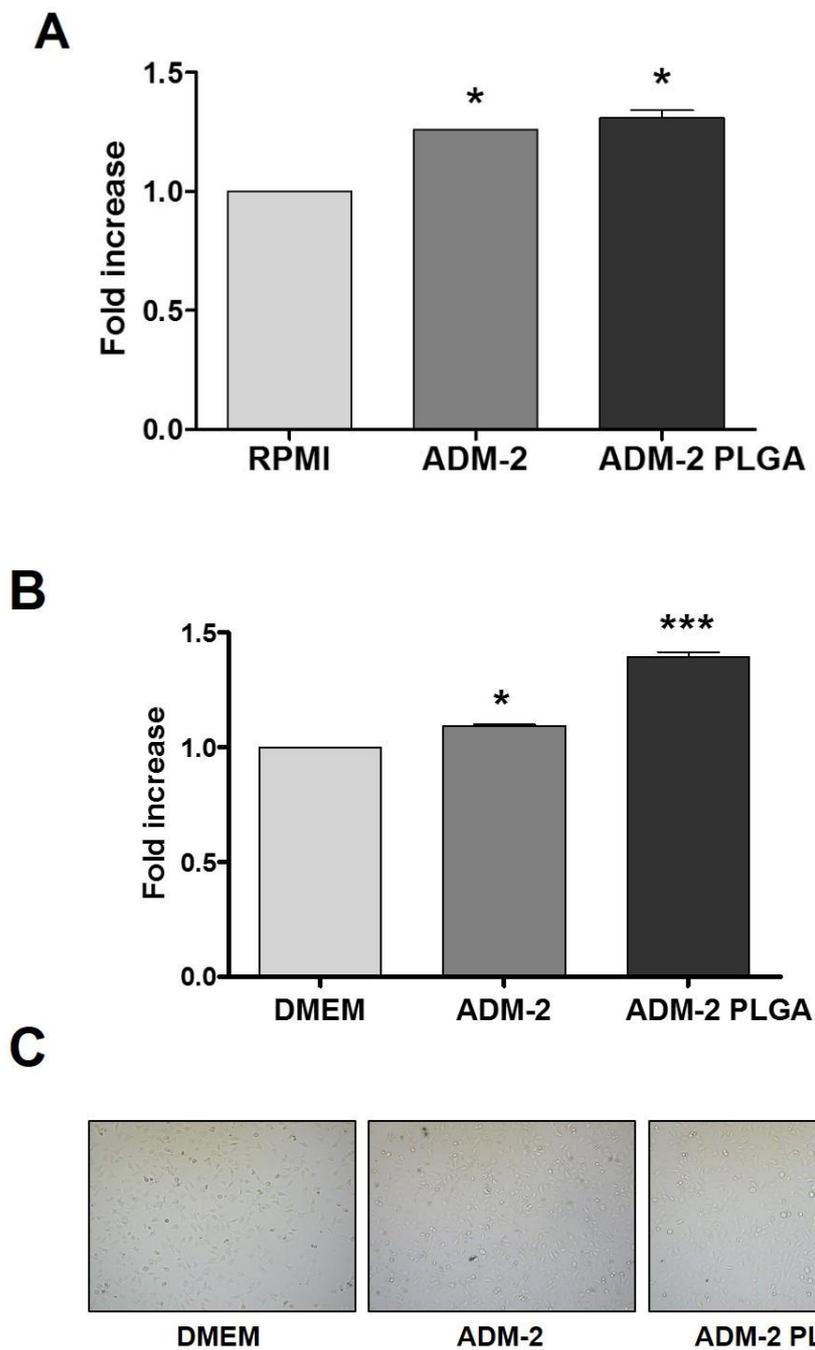
625

626

627

628

629



7 DISCUSSÃO

As doenças isquêmicas são uma importante causa de morbidade e mortalidade no mundo, acarretando em anormalidades na função, reparo, e ritmo cardíaco. Dessa forma, a entrega de drogas cardioprotetoras para o sítio do infarto do miocárdio e sistema cardiovascular emergiu como uma solução promissora. Dentre estas drogas inclui-se os peptídeos angiogênicos, os quais podem atuar como uma abordagem terapêutica de prevenção para a insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio. Entretanto, devido às limitações pertinentes às biomoléculas, incluindo a curta meia-vida, baixa estabilidade em plasma, pobre biodistribuição, rápida degradação pelas enzimas hidrolíticas e fácil eliminação pelo sistema mononuclear fagocitário, sua administração de forma livre no sítio-alvo torna-se discutível (LIU et al., 2014).

Dessa forma, com o intuito de superar as limitações dos peptídeos e proteínas administrados de forma livre no alvo terapêutico, a encapsulação destas biomoléculas em uma nanoformulação destaca-se como uma estratégia de sucesso. Para estudos de desenvolvimento e caracterização de formulações à base de nanopartículas com um ativo encapsulado, é comum a utilização da albumina sérica bovina (BSA) como a proteína modelo (BLANCO; ALONSO, 1997; LAMPRECHT; UBRICH; PE, 2000). Neste sentido, pré-formulações de nanopartículas poliméricas contendo a BSA foram desenvolvidas através do método de emulsão múltipla por extração de solvente, o qual é caracterizado como o método mais comum para encapsulação de drogas hidrofílicas, especialmente proteínas e peptídeos (MAKADIA; SIEGEL, 2011; YANG; CHUNG; PING NG, 2001).

Até alcançar uma nanoformulação com as características adequadas, nove pré-formulações foram produzidas com diversas modificações, seguido de caracterizações físico-químicas. A formulação F1 e F8 apresentaram tamanho, PDI e potencial zeta semelhantes à formulação F9, entretanto, a F9 utilizou apenas 50 mg do PLGA e 0,5% de PVA, enquanto que a F1 foi formulada com 100 mg de PLGA e a formulação F8 foi preparada com 2% de PVA. Dessa forma, concluímos que, embora as três pré-formulações mencionadas não tenham apresentado diferenças significativas quanto aos parâmetros avaliados, a preparação da formulação com menores quantidades dos polímeros torna-se mais adequado.

As formulações F3 e F4 apresentaram PDI elevado e tamanhos entre 2 μm e 6 μm , respectivamente. Já a formulação F7 não formou partículas, pois houve apenas uma breve

agitação na emulsão primária e nenhuma agitação na fase contínua, impossibilitando a formação das nanopartículas. A formulação F4 não foi agitada durante a formação da emulsão primária, obtendo um tamanho de partícula um pouco elevado, de aproximadamente 400 nm.

Portanto, dentre todas as pré-formulações, a F9 ou NP-BSA, foi definida como a formulação padrão para os ensaios seguintes com adrenomedulina-2 (ADM-2), uma vez que a mesma apresentou diâmetro médio de $264,7 \pm 3,1$ nm, PDI de 0,227 e potencial zeta de $-3,22 \pm 0,2$ mV. Além disso, ao comparar os diâmetros médios, PDI e potencial zeta entre NP-BSA e as nanopartículas brancas (NP-Branca), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, indicando que a incorporação de proteína não altera estes parâmetros físico-químicos. Isto pode estar relacionado à ligações entre a proteína encapsulada e o polímero, a qual reduz o tamanho das nanopartículas.

Segundo Schaffazick e colaboradores (2003), mesmo preparadas por diferentes métodos, as nanopartículas apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm, corroborando com o diâmetro médio encontrado na formulação NP-BSA. Além disso, de acordo com Matoba e colaboradores (2017), o diâmetro médio de no máximo 300 nm evita a excreção renal e permite que as nanopartículas permaneçam na circulação, podendo extravasar da vasculatura com maior permeabilidade. Esta é uma característica primária dos sistemas de liberação de drogas na escala nano, acarretando na biodistribuição das nanopartículas no tecido, especialmente nos vasos do coração após a isquemia-reperfusão.

Para avaliar a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das nanopartículas, o índice de polidispersão (PDI) foi calculado. Este índice pode variar de 0 a 1, sendo 1 o valor máximo de dispersão das partículas. De acordo com Nemen & Lemos-Senna (2013), um PDI igual ou menor do que 0,3 é considerado baixo, com pouca dispersão dos tamanhos e alta homogeneidade. Portanto, com o PDI de 0,227, a formulação NP-BSA apresenta-se homogênea, com pouca variação dos tamanhos das nanopartículas e sem a presença de agregados.

Outro importante preditor da estabilidade coloidal é o potencial zeta, descrito como a carga adquirida por uma partícula ou molécula em um dado meio. Também é considerada uma medida do grau de repulsão eletrostática ou atração em um sistema coloidal, a qual fornece informação sobre a química da superfície ou interface de componentes individuais da partícula e as interações interpartículas (MALVERN, 2016). Assim, segundo Bhattacharjee et al. (2016), uma dispersão de nanopartículas com valores de potencial zeta entre 0 ± 10 mV, $\pm 10 - 20$ mV

e $> \pm 30$ mV são consideradas altamente instáveis ou neutras, relativamente estáveis, ou altamente estáveis, respectivamente.

A formulação NP-BSA apresentou um potencial zeta de $-3,22 \pm 0,2$ mV, sendo considerada instável ou neutra. Devido a esta característica, a formulação pode ser susceptível à agregação enquanto estiver no estado de dispersão coloidal. Contudo, após a preparação, a formulação é liofilizada, o que diminui as limitações associadas à dispersão. Ainda, a pequena carga negativa associada à formulação é atribuída à ionização dos grupos carboxila do polímero PLGA sobre a superfície das nanopartículas (VARSHOSAZ et al., 2017).

Para a formulação contendo ADM-2, o PLGA 502H Resomer® foi substituído por PLGA 503H Resomer®, conferindo um aumento de 10 vezes no potencial zeta das nanopartículas, que alcançou -31 mV de carga superficial. Este elevado potencial zeta, encontrado também em micropartículas de PLGA 503H (FORMIGA et al, 2013), classifica esta nova formulação como altamente estável e com valor comum à um sistema de liberação de drogas.

Ao longo de 90 dias, a formulação também foi avaliada quanto ao comportamento físico-químico dos parâmetros pH, condutividade elétrica e turbidez. Dessa forma, NP-BSA demonstrou alta estabilidade quanto ao pH, refletindo uma baixa degradação do polímero. Além disso, uma leve diminuição da turbidez foi registrada apenas nos dias 60 e 90 com um valor na faixa de 900 NTU, demonstrando uma estabilidade ótima ao longo de 2 meses, sem indicativo de coalescência ou agregação das nanopartículas.

A condutividade elétrica (CE) é um parâmetro físico-químico que indica a presença de íons em uma solução aquosa. Assim, embora tenha ocorrido uma baixa degradação do polímero no meio aquoso e nenhuma mudança significativa do pH ao longo do tempo, as variações de CE podem ser decorrentes da carga negativa associada à ionização do PLGA, como observado logo após a preparação das nanopartículas.

Outro importante parâmetro físico-químico é a morfologia das nanopartículas, a qual pode ser avaliada com alta precisão através da microscopia. Portanto, com o uso da microscopia eletrônica de varredura e transmissão, as nanopartículas formuladas com PLGA pelo método de emulsão múltipla por extração de solvente apresentaram a superfície lisa e forma esférica, corroborando com a morfologia encontrada por outros autores utilizando o mesmo polímero e método de fabricação (FORMIGA et al., 2014a; MCCALL; SIRIANNI, 2013).

Para quantificar a proteína encapsulada nas nanopartículas, é necessário lisá-las para ocorrer a liberação do ativo para o meio. Assim, a extração de BSA das nanopartículas através

do solvente DMSO mostrou-se eficiente, uma vez que foi possível observar a completa dissolução das nanopartículas no meio aquoso, bem como quantificar a proteína liberada. Além disso, demonstrou a eficiência do método de encapsulação do princípio ativo e sua retenção na nanopartícula. Um problema apontado com o uso de ativos hidrofílicos é a sua tendência elevada em migrar para a fase interna orgânica. Entretanto, esse problema pode ser contornado com o método de emulsão múltipla por extração de solvente, uma vez que as proteínas ou peptídeos podem ser dissolvidos na fase aquosa interna (SEVERINO, 2012).

Neste sentido, em comparação com a carga teórica carregada nas nanopartículas, obtivemos uma boa eficiência de encapsulação de aproximadamente 60%, o mesmo valor encontrado por Gupta et al. (1997), utilizando o mesmo método de preparação. Também, utilizando o PVA como surfactante/estabilizador e realizando o mesmo método de preparo, Adebileje, Valizadeh & Amani (2017) encontraram uma eficiência de encapsulação de 66%, próximo ao valor encontrado na formulação padronizada pelo nosso grupo. Além disso, a eficiência do método de encapsulação e extração via DMSO também foi caracterizado através do SDS-PAGE, sendo possível observar claramente as bandas de BSA de 66 kDa em três pré-formulações analisadas.

As nanopartículas de PLGA contendo BSA também foram avaliadas *in vitro* quanto à sua citotoxicidade em duas linhagens celulares de murino: linhagem de macrófagos J774 e linhagem de fibroblastos L929. Na linhagem L929, todas as concentrações demonstraram-se citocompatíveis, refletindo em torno de 100% de viabilidade celular. Com relação aos macrófagos da linhagem J774, na maior concentração testada (1 mg/ml), as nanopartículas acarretaram na morte de 15 – 20% das células, o mesmo observado por Subbarayan e colaboradores (2011). Nas demais concentrações, 95 – 100% das células mantiveram-se viáveis. De acordo com a ISO/EN10993-5 da Organização Internacional para Padronização (2009), se a viabilidade celular relativa para a maior concentração testada for maior $\geq 70\%$ do controle, o material é considerado não-tóxico. Dessa forma, as nanopartículas são consideradas citocompatíveis.

Guedj et al. (2015) também testaram nanopartículas em uma linhagem de monócitos de humano, chamada THP-1, e observaram que ambas as nanopartículas (carregadas com BSA ou vazias) não apresentaram toxicidade às células em concentrações similares às testadas no nosso estudo.

Os principais fatores que influenciam na citotoxicidade de nanopartículas são o material, tamanho, forma, composição, carga superficial e hidrofobicidade da superfície. Os fagócitos,

como os macrófagos, reagem mais fortemente às micropartículas do que às nanopartículas, demonstrando ausência de citotoxicidade quando nanopartículas são testadas. Em especial, as nanopartículas formuladas com PLGA são destacadas por não apresentarem citotoxicidade, principalmente devido à sua constituição com dois monômeros (ácido lático e ácido glicólico), os quais são naturalmente metabolizados pelo organismo através de rotas metabólicas comuns (FRÖHLICH, 2012).

Após desenvolver e caracterizar uma pré-formulação com BSA como a proteína modelo, a formulação contendo ADM-2 foi produzida. Através de avaliações físico-químicas foi possível observar o mesmo padrão de estabilidade obtido pelos ensaios prévios com BSA. Nanopartículas contendo ADM-2 foram caracterizadas e avaliadas *in vitro* quanto a sua citotoxicidade e bioatividade. ADM-2 foi encapsulada com êxito em nanopartículas de PLGA, as quais não alteraram a viabilidade de macrófagos J774 e de cardiomiócitos H9c2, demonstrando, portanto, a compatibilidade *in vitro* da nanoformulação. Através de ensaios de proliferação em diferentes linhagens de células endoteliais, também determinou-se a capacidade proliferativa destas células quando estimuladas com ADM-2 extraída das nanopartículas, indicando a preservação da atividade biológica desta proteína após o processo de formulação em nanopartículas poliméricas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi delineado para desenvolver uma nanoformulação da proteína angiogênica adrenomedulina-2 (ADM-2) e, assim, contribuir para posicionar esta biomolécula como uma nova abordagem biotecnológica no âmbito das terapias emergentes para o infarto do miocárdio. Um conjunto de experimentos prévios utilizando albumina (BSA) como proteína modelo foi realizado. A partir destes dados, nanopartículas contendo ADM-2 foram desenvolvidas.

Técnicas de caracterização de nanomateriais e ensaios *in vitro* de proliferação celular foram empregados neste trabalho para elucidar o comportamento físico-químico das nanoformulações produzidas, o perfil de citotoxicidade e atividade biológica. ADM-2 foi formulada com êxito em nanopartículas poliméricas utilizando o método de emulsão múltipla com evaporação do solvente. A formulação demonstrou compatibilidade *in vitro* com macrófagos da linhagem J774 e cardiomiócitos da linhagem H9c2. Também foi capaz de estimular a proliferação celular das linhagens endoteliais HUVEC e EA.hy926, indicando que a atividade biológica deste fator de crescimento foi preservada após seu processo de formulação em nanopartículas de PLGA.

Este trabalho é o primeiro estudo de desenvolvimento de uma nanoformulação de ADM-2, com potencial de inovação, no âmbito da terapia com fatores de crescimento, direcionada ao infarto do miocárdio. Para explorar este potencial, ensaios pré-clínicos de eficácia com modelos animais de infarto do miocárdio deverão ser executados no futuro.

REFERÊNCIAS

- ADEBILEJE, T.; VALIZADEH, A.; AMANI, A. Effect of formulation parameters on the size of PLGA nanoparticles encapsulating bovine serum albumin : a response surface methodology. **Journal of Contemporary Medicine**, v. 3, n. 12, p. 306–312, 2017.
- AGRAHARI, V. Novel drug delivery systems, devices, and fabrication methods. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 8, p. 2–5, 2017.
- ANDERSON, J. L.; MORROW, D. A. Acute Myocardial Infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 21, p. 2053–2064, 2017.
- ANNEX, B. H.; SIMONS, M. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis in the heart: Protein therapy. **Cardiovascular Research**, v. 65, n. 3, p. 649–655, 2005.
- ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. Cell-mediated delivery of nanoparticles: Taking advantage of circulatory cells to target nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 531–541, 2014.
- AWADA, H. K., HWANGA, M. P.; WANG, Y. Towards Comprehensive Cardiac Repair and Regeneration after Myocardial Infarction: Aspects to Consider and Proteins to Deliver Hassan. **Biomaterials**, v. 82, p. 94–112, 2016.
- BELL, D. et al. Peptides Plasma levels of intermedin (adrenomedullin-2) in healthy human volunteers and patients with heart failure. **Peptides**, v. 76, p. 19–29, 2016a.
- BELL, D. et al. Peptides Endothelium-derived intermedin / adrenomedullin-2 protects human ventricular cardiomyocytes from ischaemia-reoxygenation injury predominantly via the AM 1 receptor. **Peptides**, v. 76, p. 1–13, 2016b.
- BELL, D.; MCDERMOTT, B. J. Intermedin (adrenomedullin-2): A novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. SUPPL. 1, p. 247–262, 2008.
- BENJAMIN, E. J. et al. **Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association**. [s.l: s.n.]. v. 135
- BETGEM, R. P. et al. Intramyocardial haemorrhage after acute myocardial infarction. **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, n. 3, p. 156–167, 2015.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BLANCO, M. D.; ALONSO, M. J. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 1997.

BLOOMEKATZ, J.; GALVEZ-SANTISTEBAN, M.; CHI, N. C. ScienceDirect Myocardial plasticity: cardiac development, regeneration and disease. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 40, p. 120–130, 2016.

CAHILL, T. J.; CHOUDHURY, R. P.; RILEY, P. R. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: Translational opportunities for novel therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 10, p. 699–717, 2017.

CARBONE, F. et al. Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 2005, n. 6, p. 501–514, 2013.

CHANG, M. Y. et al. Functionalized nanoparticles provide early cardioprotection after acute myocardial infarction. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 2, p. 287–294, 2013.

CHEN, K. et al. Intermedin1–53 enhances angiogenesis and attenuates adverse remodeling following myocardial infarction by activating AMP-activated protein kinase. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 4, p. 1497–1506, mar. 2017.

CHERAGHI, M. et al. Recent advances in cardiac regeneration: Stem cell, biomaterial and growth factors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 37–45, 2017.

CHU, H.; WANG, Y. Therapeutic angiogenesis: controlled delivery of angiogenic factors. **Therapeutic Delivery**, v. 3, n. 6, p. 693–714, 2012.

DVIR, T. et al. Nanoparticles for targeting the infarcted heart. **Addiction** (Abingdon, England), v. 105, n. 3, p. 452–65, mar. 2012.

FERRARA, N.; KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 967–974, 2005.

FIORELLI, A. I. et al. Insuficiência cardíaca e transplante cardíaco. **Revista Medica**, v. 87, n. 2, p. 105–120, 2008.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, n. 1, p. 27–30, 1995.

FORMIGA, F. R. et al. Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 1, p. 30–37, 2010.

FORMIGA, F. R. et al. Angiogenic therapy for cardiac repair based on protein delivery systems. **Heart Failure Reviews**, v. 17, n. 3, p. 449–473, 7 maio 2012.

FORMIGA, F. R. et al. Biodegradation and heart retention of polymeric microparticles in a rat model of myocardial ischemia. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 665-672, 2013.

FORMIGA, F. R. et al. Controlled delivery of fibroblast growth factor-1 and neuregulin-1 from biodegradable microparticles promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model through activation of endogenous regeneration. **Journal of Controlled Release**, v. 173, n. 1, p. 132–139, 2014a.

FORMIGA, F. R. et al. Controlled delivery of fibroblast growth factor-1 and neuregulin-1 from biodegradable microparticles promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model through activation of endogenous regeneration. **Journal of Controlled Release**, v. 173, p. 132–139, 10 jan. 2014b.

FRANGOIANNIS, N. G. The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodeling. **Nature Reviews Cardiology**, v. 11, n. 5, p. 255–265, 2015.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5577–5591, 2012.

GAFFNEY, M. M. et al. Cardiovascular gene therapy: Current status and therapeutic potential. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 2, p. 175–188, 2007.

GALDOS, F. X. et al. Cardiac Regeneration: Lessons from Development. **Circulation Research**, v. 120, n. 6, p. 941–959, 2017.

GELDENHUYS, W. J. et al. Drug Delivery and Nanoformulations for the Cardiovascular System. **Research & reviews. Drug delivery**, v. 1, n. 1, p. 32–40, fev. 2017.

GENTILE, P. et al. An Overview of Poly (lactic- co -glyc) Acid (PLGA). **Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering**, p. 3640–3659, 2014.

GORADEL, N. H. et al. Stem Cell Therapy: A New Therapeutic Option for Cardiovascular Diseases. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 95–104, jan. 2018.

- GUEDJ, A. S. et al. Preparation, characterization, and safety evaluation of poly(Lactide-co-glycolide) nanoparticles for protein delivery into macrophages. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5965–5979, 2015.
- GUPTA, R. K. et al. Determination of protein loading in biodegradable polymer microspheres containing tetanus toxoid. **Vaccine**, v. 15, n. 6–7, p. 672–8, 1997.
- HASTINGS, C. L. et al. Drug and cell delivery for cardiac regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, p. 85–106, 2015.
- HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. **Nature Reviews Cardiology**, v. 13, n. 4, p. 193–209, 2016.
- HE, C. et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657–3666, 2010.
- HEUSCH, G.; GERSH, B. J. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion : a continual challenge. *European Heart Journal*, v. 38, n. 11, 2016.
- HILL, J. A. et al. Fundamental Cardiovascular Research: Returns on Societal Investment: A Scientific Statement from the American Heart Association. **Circulation Research**, v. 121, n. 3, p. e2–e8, 2017.
- HO, Y. T.; POINARD, B.; KAH, J. C. Y. Nanoparticle drug delivery systems and their use in cardiac tissue therapy. **Nanomedicine**, v. 11, p. 693–714, 2016.
- HOLLANDER, L. L. et al. ScienceDirect Association for Academic Surgery The novel tumor angiogenic factor , adrenomedullin-2 , predicts survival in pancreatic adenocarcinoma. **Journal of Surgical Research**, v. 197, n. 2, p. 219–224, 2014.
- HONG, Y. et al. The pharmacology of Adrenomedullin 2 / Intermedin. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, p. 110-120, 2012.
- HOUCHIN, M. L.; TOPP, E. M. Physical Properties of PLGA Films During Polymer Degradation. v. 114, p. 2848–2854, 2009.
- HOUSE, S. L. et al. Fibroblast growth factor 2 is an essential cardioprotective factor in a closed-chest model of cardiac ischemia-reperfusion injury. **Physiological Reports**, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2015.
- ISO/EN10993-5. B. **International Standard ISO 10993-5 Biological evaluation of medical**

devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. 3 ed, 2009. p. 42.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475–2490, 2000.

JONES, W. S.; ANNEX, B. H. Growth factors for therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease. **Current Opinion in Cardiology**, v. 22, n. 5, p. 458–463, set. 2007.

KOCHEGAROV, A.; LEMANSKI, L. F. New trends in heart regeneration: A review. **Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 2, p. 61–68, 2016.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LAFLAMME, M. A.; MURRY, C. E. Heart regeneration. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 326–335, 2011.

LAKSHMANAN, R.; MAULIK, N. Development of next generation cardiovascular therapeutics through bio-assisted nanotechnology. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, p. 1–12, 2017.

LALIT, P. A. et al. Induced Pluripotent Stem Cells for Post-Myocardial Infarction Repair: Remarkable Opportunities and Challenges. **Circulation Research**, v. 114, n. 8, p. 1328–1345, 11 abr. 2014.

LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; PE, M. H. Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, p. 177–182, 2000.

LANAO, R. P. F. et al. Physicochemical Properties and Applications of Poly(lactic-co-glycolic acid) for Use in Bone Regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 19, n. 4, p. 380–390, ago. 2013.

LE, T. Y. L. et al. New Developments in Cardiac Regeneration. **Heart Lung and Circulation**, v. 26, n. 4, p. 316–322, 2017.

LEAL, J. et al. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. **European Heart Journal**, v. 27, n. 13, p. 1610–1619, 7 jun. 2006.

LIU, M. et al. Heart-targeted nanoscale drug delivery systems. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2038–2062, 2014.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable

- Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 1377–1397, ago. 2011.
- MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **PLoS Medicine**, p. 2011-201v. 3, n. 11, 2006.
- MATOBA, T. et al. Nanoparticle-mediated drug delivery system for atherosclerotic cardiovascular disease. **Journal of Cardiology**, v. 70, n. 3, p. 206–211, 2017.
- MATOBA, T.; EGASHIRA, K. Nanoparticle-Mediated Drug Delivery System for Cardiovascular Disease. **International Heart Journal**, v. 55, n. 4, p. 281–286, 2014.
- MCCALL, R. L.; SIRIANNI, R. W. PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-emulsion with Vitamin E-TPGS. **Journal of Visualized Experiments**, n. 82, p. 1–8, 2013.
- MIR, M.; AHMED, N.; REHMAN, A. UR. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 217–231, 2017.
- MOGHIMI, S. M.; HUNTER, C. Capture of Stealth Nanoparticles by the Body's Defences. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 18, n. 6, p. 24, 2001.
- MOZAFFARIAN, D. et al. AHA Statistical Update Executive Summary : Heart Disease and Stroke Statistics — 2016 Update A Report From the American Heart Association. **Circulation**, p. 447–454, 2016.
- MUKHERJEE, B. et al. Preparation, characterization and in-vitro evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 4, p. 487–496, 2008.
- MURRY, C. E.; REINECKE, H.; PABON, L. M. Regeneration Gaps. Observations on Stem Cells and Cardiac Repair. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 9, p. 1777–1785, 2006.
- NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais nanocarreadores lipídicos contendo reverastrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 171–176, 2013.
- NETO, G. B.; SILVA, E. N. DA. The costs of cardiovascular disease in Brazil: a brief economic comment. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 91, n. 4, p. 198, 2008.
- NI, X. Q. et al. Intermedin/adrenomedullin2: An autocrine/paracrine factor in vascular homeostasis and disease. **Science China Life Sciences**, v. 57, n. 8, p. 781–789, 2014.
- ODUK, Y. et al. VEGF Nanoparticles Repair Heart after Myocardial Infarction. **American**

- journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, p. ajpheart.00471.2017, 2017.
- OROGO, A. M.; GUSTAFSSON, Å. B. Cell death in the myocardium: My heart won't go on. **IUBMB Life**, v. 65, n. 8, p. 651–656, 2013.
- PANYAM, J. et al. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n. 1–2, p. 173–187, 2003.
- PASCUAL-GIL, S. et al. Cytokine-loaded PLGA and PEG-PLGA microparticles showed similar heart regeneration in a rat myocardial infarction model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, n. 2, p. 531–533, 2017.
- PATEL, A. et al. Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles. **Protein & Peptide Letters**, v. 21, n. 11, p. 1102–1120, 2014.
- PAULO M. PÊGO-FERNANDES, FABIO A. GAIOTTO, F. G.-F. Estado atual da cirurgia de revascularização do miocárdio Coronary artery bypass graft: state of the art. **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 87, n. 2, p. 92–98, 2008.
- PESARO, A. E. P.; SERRANO JR., C. V.; NICOLAU, J. C. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 2, p. 214–220, 2004.
- PFEFFER, M. A.; BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. **Circulation**, v. 81, n. 4, p. 1161–1172, 1990.
- PIEGAS, L. S. et al. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 105, n. 2 Suppl 1, p. 1–121, 2015.
- PRABHU, S. D.; FRANGOIANNIS, N. G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. **Circulation Research**, v. 119, n. 1, p. 91–112, 2016.
- REBOUÇAS, J. D. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; FORMIGA, F. R. Cardiac Regeneration using Growth Factors: Advances and Challenges. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 271–275, 2016a.
- REBOUÇAS, J. DE S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; FORMIGA, F. R. Cardiac Regeneration using Growth Factors: Advances and Challenges. **Arquivos Brasileiros de**

Cardiologia, v. 107, n. 3, p. 271–275, set. 2016.

RISSANEN, T. T.; YLÄ-HERTTUALA, S. Current status of cardiovascular gene therapy. **Molecular Therapy**, v. 15, n. 7, p. 1233–1247, 2007.

ROBICH, M. P. et al. Myocardial Therapeutic Angiogenesis: A Review of the State of Development and Future Obstacles. **Expert Review Cardiovascular Therapeutic**, v. 9, n. 11, p. 1469–1479, 2011.

RODRIGO, R. et al. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. **Disease Markers**, v. 35, n. 6, p. 773–790, 2013.

ROH, J. et al. Intermedin Is a Calcitonin/Calcitonin Gene-related Peptide Family Peptide Acting through the Calcitonin Receptor-like Receptor/Receptor Activity-modifying Protein Receptor Complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 8, p. 7264–7274, 2004.

ROTH, G. A. et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. **Circulation**, v. 132, n. 17, p. 1667–1678, 2015.

ROURA, S. et al. Mesenchymal stem cells for cardiac repair: Are the actors ready for the clinical scenario? **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2017.

RUFAlHAH, A. J. et al. Acta Biomaterialia Dual delivery of VEGF and ANG-1 in ischemic hearts using an injectable hydrogel. **Acta Biomaterialia**, p. 1–10, 2016.

SALVADOR, A. et al. Design and evaluation of surface and adjuvant modified PLGA microspheres for uptake by dendritic cells to improve vaccine responses. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 371–381, 2015.

SANCHIS-GOMAR, F. et al. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 13, p. 256–256, 2016.

SATTLER, S.; ROSENTHAL, N. The neonate versus adult mammalian immune system in cardiac repair and regeneration. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 7, p. 1813–1821, 2016.

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

SCIMIA, M. C.; GUMPERT, A. M.; KOCH, W. J. Cardiovascular gene therapy for myocardial infarction. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 14, n. 2, p. 183–195, 2014.

SEGERS, V. F. M.; LEE, R. T. Stem-cell therapy for cardiac disease. **Nature**, v. 451, n. February, p. 937–42, 2008.

SELCAN GUNGOR-OZKERIM, P. et al. Incorporation of growth factor loaded microspheres into polymeric electrospun nanofibers for tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 6, p. 1897–1908, 2014.

SEVERINO, P. Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas lipídicas sólidas para encapsulação de proteínas. Tese (Doutorado em Engenharia Química,). Unicamp, Campinas, p. 202, 2012.

SHARPE, J. S. N. Clinical Cardiology: new frontiers left ventricular remodeling after myocardial infarction pathophysiology and therapy. **Circulation**, n. 25, p. 2981–2988, 2000.

SHINDO, T. et al. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. **Circulation**, v. 104, n. 16, p. 1964–1971, 2001.

SIMÓN-YARZA, T. et al. PEGylated-PLGA microparticles containing VEGF for long term drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, n. 1, p. 13–18, 2013.

SKYSCHALLY, A.; SCHULZ, R.; HEUSCH, G. Pathophysiology of myocardial infarction. Protection by ischemic pre- and postconditioning. **Herz**, v. 33, n. 2, p. 88–100, 2008.

SMITH, R. S. et al. Intermedin is a new angiogenic growth factor. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 3, p. H1040–H1047, 2009.

SMITH, S. C. et al. Our time: A call to save preventable death from cardiovascular disease (heart disease and stroke). **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, n. 22, p. 2343–2348, 2012.

SOPPIMATH, K. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

TACHIBANA, A. et al. Paracrine effects of the pluripotent stem cell-derived cardiac myocytes salvage the injured myocardium. **Circulation Research**, v. 121, n. 6, p. e22–e36, 2017.

TAKAHASHI, K. et al. Immunocytochemical localization of adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in human hypothalamus, heart and kidney. **Peptides**, v. 27, n. 6, p. 1383–1389, 2006.

THIAGARAJAN, H. et al. Angiogenic growth factors in myocardial infarction: a critical appraisal. **Heart Failure Reviews**, 2017.

TIWARI, G. et al. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 2, 2012.

TURAN, R. D. et al. Evolving approaches to heart regeneration by therapeutic stimulation of resident cardiomyocyte cell cycle. **Anatolian Journal of Cardiology**, v. 16, n. 11, p. 881–886, 2016.

UHRICH, K. E. et al. Polymeric systems for controlled drug release. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181–98, 10 nov. 1999.

VAN BERLO, J. H.; MOLKENTIN, J. D. An emerging consensus on cardiac regeneration. **Nature Medicine**, v. 20, n. 12, p. 1386–1393, 2014.

VAN DER LAAN, A. M.; PIEK, J. J.; VAN ROYEN, N. Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI. **Nature Reviews Cardiology**, v. 6, n. 8, p. 515–523, 2009.

VARSHOSAZ, J. et al. Development of dry powder inhaler containing tadalafil-loaded PLGA nanoparticles. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 222–232, 2017.

VILOS, C.; VELASQUEZ, L. A. Therapeutic strategies based on polymeric microparticles. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

WANG, L. et al. Intermedin enlarges the vascular lumen by inducing the quiescent endothelial cell proliferation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, n. 1, p. ATVBAHA.117.310317, 2017.

WILKINS, E. et al. European cardiovascular disease statistics 2017 edition. **European Heart Network, Brussels**, p. 192, 2017.

XU, Y. et al. Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug–polymer applications: A review of experiments and theories. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 105, n. 6, p. 1692–1716, 2017.

YANG, X. et al. Effects of intermedin1-53 on myocardial fibrosis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 45, n. 2, p. 141–148, 2013.

YANG, Y. Y.; CHUNG, T. S.; PING NG, N. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. **Biomaterials**, v. 22, n. 3, p. 231–241, 2001.

YI, F.; WU, H.; JIA, G.-L. Formulation and characterization of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticle containing vascular endothelial growth factor for gene delivery. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 43–48, 2006.

YU, Z. et al. Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.

YUSUF, S. et al. Clinical Cardiology : New frontiers. Global burden of cardiovascular diseases. Part I: General Considerations, the Epidemiologic Transition Risk Factors, and Impact of Urbanization. **Circulation**, v. 104, n. 22, p. 2746–2753, 2001.

ZHANG, H. Y. et al. Intermedin is upregulated and has protective roles in a mouse ischemia/reperfusion model. **Hypertension Research**, v. 32, n. 10, p. 861–868, 2009.

ZHANG, S. Y.; XU, M. J.; WANG, X. Adrenomedullin 2/intermedin: A putative drug candidate for treatment of cardiometabolic diseases. **British Journal of Pharmacology**, 2017.

ZHAO, H. et al. Polymer-based nanoparticles for protein delivery: design, strategies and applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 23, p. 4060–4071, 2016.

ANEXOS

Western Blot

Após a caracterização das nanopartículas com BSA pelo SDS-PAGE, as nanopartículas contendo ADM-2 também foram caracterizadas por SDS-PAGE com posterior análise através do *Western blot*. O SDS-PAGE foi realizado em um gel de 18% de poliacrilamida e após a eletroforese das proteínas, as bandas foram transferidas para uma membrana de PVDF (0,45 µm) em tampão de transferência pelo Trans-Blot®-Turbo™ (Bio-Rad, Laboratories Inc., Alemanha). Após 1 hora em tampão de bloqueio com 5% de leite em pó em TBS 1X mais 0,05% de Tween 20, a membrana foi incubada overnight a 4°C com o anticorpo primário anti-ADM-2 (1:1000) (anticorpo do kit ELISA ADM-2). Para a imunorreação, o anticorpo secundário anti-rabbit conjugada com a horseradish peroxidase (HRP) (1:3000) foi adicionado. Após três lavagens, as bandas imunorreativas foram reveladas através do Luminol e visualizadas pelo software ImageQuant. A visualização das bandas do marcador molecular na membrana indica que a transferência das proteínas foi realizada com sucesso. Entretanto, com relação à adrenomedulina-2 extraída das nanopartículas e às concentrações conhecidas (1 ng, 5 ng, 10 ng e 50 ng) de adrenomedulina-2 em solução, o anticorpo primário não foi capaz de se ligar. Portanto, não foi possível visualizar as bandas na membrana (Figura 16). Esta limitação de ligação do anticorpo primário às proteínas pode estar atrelada ao fato deste anticorpo disponível para o kit ELISA não ter sido validado para Western Blot.

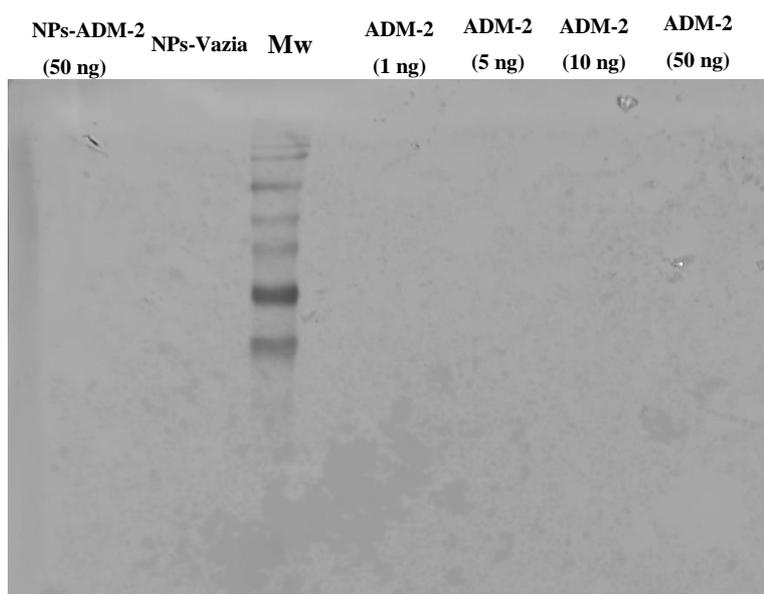


Figura 16. *Western blot* de adrenomedulina-2 extraída das nanopartículas.