



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Taís Monteiro Magne

**Produção, caracterização e avaliação biológica de nanopartículas  
carregadas com metotrexato e hidroxicloroquina para o tratamento da  
Artrite Reumatoide**

Rio de Janeiro

2023

Taís Monteiro Magne

**Produção, caracterização e avaliação biológica de nanopartículas carregadas com metotrexato e hidroxicloroquina para o tratamento da Artrite Reumatoide**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M196 Magne, Taís Monteiro.  
Produção, caracterização e avaliação biológica de nanopartículas carregadas com metotrexato e hidroxiclороquina para o tratamento da Artrite Reumatoide / Taís Monteiro Magne. - 2023.  
108 f.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Artrite reumatoide – Tratamento farmacológico – Teses. 2. Sistemas de liberação de fármacos por nanopartículas. 3. Metotrexato – Administração & dosagem – Teses. 4. Hidroxiclороquina – Administração & dosagem – Teses. I. Santos-Oliveira, Ralph. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.72-002.77

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Taís Monteiro Magne

**Produção, caracterização e avaliação biológica de nanopartículas carregadas com metotrexato e hidroxicloroquina para o tratamento da Artrite Reumatoide**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 07 de fevereiro de 2023.

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira (Orientador)

Instituto de Engenharia Nuclear

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Das Graças Muller de Oliveira Henriques

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Aline Oliveira da Silva de Barros

Instituto de Engenharia Nuclear

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eduardo Ricci-Junior

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2023

## DEDICATÓRIA

Para todo o sempre, as minhas conquistas serão dedicadas à você: MÃE, que, aí desse outro lado, emana, incansavelmente, forças e proteção para eu alcançar todos os meus sonhos. Saiba que a sua presença é sentida por todos nós em cada conquista e, independentemente de onde estiver, estará guardada para sempre em nossos corações.

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente a Deus e à minha mãe que caminham ao meu lado guiando, protegendo e abençoando os meus passos.

Ao meu orientador, Dr. Ralph Santos-Oliveira pela oportunidade de compor a sua equipe de pesquisa e alcançar mais uma etapa importante de minha vida. Obrigada pela confiança, dedicação, incentivo, paciência e carinho.

Aos que anos antes me orientaram, Edward Helal e Carmen Penido, por todos os ensinamentos. Hoje, estou dando mais um passo na minha trajetória acadêmica e sou muito feliz e realizada por ter sido orientada por profissionais (e seres humanos) tão incríveis.

Ao meu pai, Martin Magne, que não mede esforços para me ver chegar cada vez mais longe. Obrigada por estar sempre ao meu lado me dando forças para continuar, sem você, nenhuma dessas conquistas seria possível! Você é a minha base, a minha motivação e o meu orgulho.

À toda a minha família, em especial ao meu irmão Gil e à minha avó Marisete, que mesmo longe torcem e vibram pelas minhas conquistas. Parte dessa vitória eu dedico à vocês, que acreditam em mim mais do que eu mesma. Vocês me dão forças para ir em busca de todos esses sonhos.

Ao meu parceiro de vida, João Alberto, que diariamente afirma que “eu vou dar conta” e suporta pacientemente todos os meus momentos de estresse. Obrigada por toda a parceria, cuidado e motivação! Ter você ao meu lado torna os dias mais leves.

À todos os meus amigos que não deixam de estar presentes em minha vida mesmo com a correria do dia-a-dia e a distância. Obrigada por celebrarem comigo cada vitória e acreditarem na minha capacidade de ir cada vez mais longe. Ouvir de vocês que se orgulham de mim, me motiva à persistir e sonhar.

À Dra. Luana Corrêa pela enorme ajuda e colaboração com os experimentos in vivo. Muito obrigada pela paciência, carinho e disponibilidade. Você é incrível e um exemplo de pesquisadora.

À toda equipe do laboratório e aos colaboradores desse projeto que tornaram possível mais uma conquista. Obrigada pela ajuda e apoio em todos os momentos que precisei.

Ao auxílio financeiro fornecido pela CAPES, CNPq e FAPERJ.

## RESUMO

MAGNE, Taís Monteiro. **Produção, caracterização e avaliação biológica de nanopartículas carregadas com metotrexato e hidroxicloroquina para o tratamento da Artrite Reumatoide**. 2023. 108 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A artrite reumatoide (AR) é uma doença multissistêmica, imunomediada e crônica que se localiza, principalmente, nas articulações. É a doença reumática mais comum, afetando cerca de 1% da população mundial. A AR é uma doença multifatorial, com uma complexa interação entre o hospedeiro e o ambiente, determinando o risco geral de suscetibilidade, persistência e gravidade da doença. A progressão da doença está associada à incapacidade de realizar atividades diárias, manifestações extra-articulares, morte precoce e custos socioeconômicos. A AR é caracterizada por inflamação sinovial e hiperplasia, produção de autoanticorpos, destruição de cartilagem e osso e manifestações sistêmicas, como envolvimento pulmonar, cardiovascular e neurológico. As abordagens terapêuticas atuais para o tratamento da AR visam a redução do dano articular e a remissão precoce e persistente da doença. Contudo, apesar dos avanços no diagnóstico e adoção gradual de novas terapias, ainda há uma lacuna substancial no manejo da doença, com muitos pacientes falhando em obter respostas clínicas consideráveis e sustentadas, demonstrando resultados modestos em longo prazo. Atualmente, as drogas antirreumáticas modificadoras de doença (DMARDs) convencionais, representam a primeira linha de terapia recomendada, em especial o metotrexato (MTX) e a hidroxicloroquina (HCQ). Apesar do potencial terapêutico, baixo custo e perfil de segurança e toxicidade bem estabelecidos, os DMARDs induzem efeitos colaterais consideráveis que variam de acordo com o paciente, tempo do tratamento e dose administrada. Nesse estudo, foi desenvolvido um novo sistema de entrega de fármacos com nanopartículas de Pluronic® F-127 carregadas com HCQ e MTX, e os efeitos avaliadas em um modelo de artrite antigênica induzida em camundongos. Os resultados obtidos mostram que o nanossistema foi capaz de modular o processo inflamatório da AR e reduzir a osteoclastogênese, o edema e a migração celular na articulação. No geral, as nanopartículas carregadas com fármacos têm um efeito terapêutico duas vezes superior em comparação aos fármacos livres. Esses achados sugerem a possibilidade de desenvolvimento de um nanossistema de entrega de fármacos capaz de atingir eficácias terapêuticas observadas na prática clínica, porém com redução da dose administrada, e assim obter um perfil de segurança superior.

Palavras-chave: Nanoterapia. Tratamento da artrite reumatoide. Metotrexato. Hidroxicloroquina.

## ABSTRACT

MAGNE, Taís Monteiro. *Production, characterization and biological evaluation of nanoparticles loaded with methotrexate and hydroxychloroquine for the treatment of Rheumatoid Arthritis*. 2023. 108 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic immune-mediated multisystemic disease that is mainly located in the joints. It is the most common systemic inflammatory rheumatic disease, affecting approximately 1% of the world's population. Although a precise etiology has yet to be determined, RA is a multifactorial disease, with a complex interaction between the host and the environment determining the overall risk of disease susceptibility, persistence and severity. Disease progression is associated with inability to perform activities costs, systemic complications, early death and socioeconomic costs. RA is characterized by synovial inflammation and hyperplasia, autoantibody production, cartilage and bone destruction, and systemic manifestations such as pulmonary, cardiovascular, and neurological involvement. Current therapeutic approaches for the treatment of RA aim at reducing joint damage and at early and persistent remission of the disease. However, despite advances in diagnosis and gradual adoption of new drugs, there is still a substantial gap in disease management, with many patients failing to achieve considerable and sustained clinical responses, demonstrating modest long-term results. Currently, conventional disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) are the recommended first-line therapy, in particular methotrexate (MTX) and (HCQ). Despite their therapeutic potential, low cost and well-established safety and toxicity profile, DMARDs induce considerable side effects that vary according to the patient, time of treatment and administered dose. In this study, we developed a new drug delivery system with Pluronic® F-127 nanoparticles co-loaded with HCQ and MTX and the effects evaluated in a model of antigenic induced arthritis in mice. The results obtained show that nanoparticles loaded with drugs were able to modulate the inflammatory process of RA and reduce osteoclastogenesis, edema and cell migration to the joint. Overall, drug-loaded nanoparticles showed a 2-fold greater therapeutic effect compared to free drugs. These findings suggest the possibility of developing a drug delivery nanosystem capable of achieving therapeutic efficiencies observed in clinical practice, but with a reduction in the administered dose.

Keywords: Nanotherapy. Rheumatoid arthritis treatment. Methotrexate. Hydroxychloroquine



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Epidemiologia global da artrite reumatoide .....	13
Figura 2 –	Estruturas básicas de uma articulação sinovial .....	16
Figura 3 –	Visão esquemática de uma articulação normal e suas alterações na AR .....	18
Figura 4 –	Mecanismos envolvidos na iniciação e progressão da AR .....	21
Figura 5 –	Contribuição de células imunes inatas para a patogênese da AR .....	23
Figura 6 –	A osteoclastogênese e o impacto da atividade de osteoclastos nas articulações artríticas reumatoides .....	25
Figura 7 –	Mecanismos que contribuem para complicações clinicamente observadas a longo prazo em pacientes com AR .....	26
Figura 8 –	Algoritmo de decisão terapêutica da AR .....	29
Figura 9 –	Efeitos colaterais comuns dos DMARDs disponíveis .....	30
Figura 10 –	Estruturas químicas do Metotrexato e do Ácido fólico .....	31
Figura 11 –	Ilustração esquemática do mecanismo do MTX na inflamação .....	32
Figura 12 –	Estruturas químicas da Cloroquina e Hidroxicloroquina .....	34
Figura 13 –	Nanossistemas de entrega direcionada de fármacos para o tratamento da AR .....	38
Figura 14 –	Estrutura geral do Pluronic .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPA	Anticorpo Antiproteínas Citrulinadas
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
AFM	Microscopia de Força Atômica
AINE	Anti-inflamatório Não Esteroidal
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
AR	Artrite Reumatoide
BSA	Albumina de soro bovino
CD	Células Dendríticas
CD	Grupamento de Diferenciação
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMARDs	Drogas Antirreumáticas Modificadoras da Doença
DMEM	Dulbecco's MEM
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FR	Fator Reumatoide
HCQ	Hidroxicloroquina
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IL	Interleucina
JAK	Janus quinase
mBSA	Albumina de soro bovino metilada
M-CSF	Fator de estimulação de colônia de macrófagos
MDR	Resistência a múltiplos medicamentos
MMCD	Medicamentos modificadores do curso da doença
MMP	Metaloproteinases da Matriz
MRP1	Proteína de resistência múltipla a drogas 1
MTX	Metotrexato

NET	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NK	Célula Natural Killer
PADI	Peptidilarginina Deiminase
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Proteína C Reativa
PDI	Índice de Polidispersão
PEO	Poli(óxido de etileno)
PPO	Poli(óxido de propileno)
RANKL	Ligante do Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa B
RASF	Fibroblastos Sinovial da Artrite Reumatoide
RCF	Força Centrífuga Relativa
RFC	Transportador de Folato Reduzido
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SSF	Sinoviócitos Semelhantes à Fibroblastos
SSM	Sinoviócitos Semelhantes à Macrófagos
SSZ	Sulfassalazina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$^2$	Ao quadrado
*	Asterisco
/	Barra
[ ]	Colchetes
$\Delta$	Delta
:	Dois pontos
$\gamma$	Gama
$^\circ$	Graus
–	Hífen
=	Igual
+	Mais
$\pm$	Mais ou menos
$\leq$	Menor ou igual
<	Menor que
$\mu$	Micro
$\times$	Multipliação
( )	Parênteses
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	41
1.1	<b>Geral</b> .....	41
1.2	<b>Específicos</b> .....	41
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
2.1	<b>Reagentes</b> .....	42
2.2	<b>Preparo das Nanomicelas</b> .....	42
2.3	<b>Tamanho de partícula e potencial zeta</b> .....	42
2.4	<b>Microscopia de força atômica (AFM)</b> .....	43
2.5	<b>Liberação de fármacos <i>in vitro</i></b> .....	43
2.6	<b>Ensaio de osteoclastogênese</b> .....	44
2.7	<b>Modelo de artrite reumatoide</b> .....	44
2.7.1	<u>Animais</u> .....	44
2.7.2	<u>Avaliação do peso corporal</u> .....	44
2.7.3	<u>Indução de artrite antigênica</u> .....	45
2.7.4	<u>Grupos</u> .....	46
2.7.5	<u>Tratamento</u> .....	46
2.7.6	<u>Parâmetros</u> .....	47
2.8	<b>Atividade da proteína transportadora de efluxo (MRP1)</b> .....	47
2.9	<b>Análise estatística</b> .....	48
3	<b>RESULTADOS</b> .....	49
3.1	<b>Rheumatoid arthritis treatment using hydroxychloroquine and methotrexate co-loaded nanomicelles: <i>in vivo</i> results</b> .....	49
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	77
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	84
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	86
	<b>APÊNDICE A – Resumo do artigo publicado no Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</b> .....	104

<b>APÊNDICE B</b> – Resumo do artigo publicado no Journal of Nanostructure in Chemistry .....	105
<b>APÊNDICE C</b> – Resumo do artigo publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia .....	106
<b>APÊNDICE D</b> – Resumo do artigo publicado no Viruses .....	107
<b>APÊNDICE E</b> – Resumo do artigo publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia .....	108

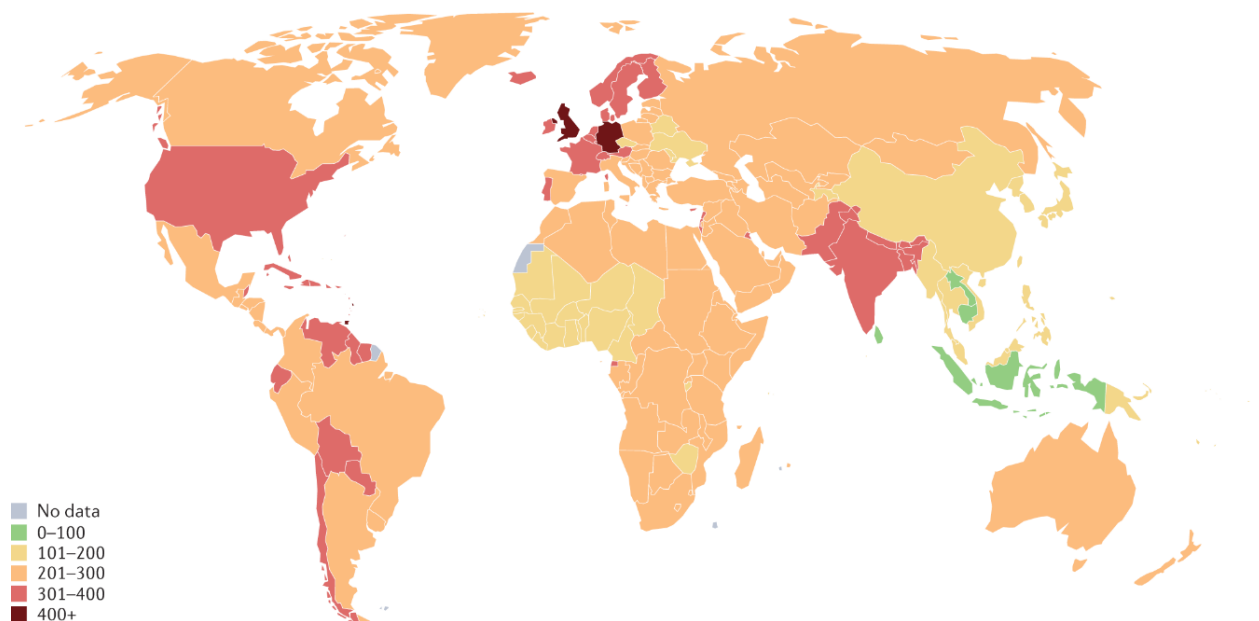
## INTRODUÇÃO

### A epidemiologia da AR

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, sistêmica e autoimune, caracterizada por articulações dolorosas e edemaciadas que podem prejudicar, gravemente, a função física e a qualidade de vida (1). Os sintomas como dor musculoesquelética, inchaço e rigidez são comuns na prática clínica, portanto, a familiaridade com o diagnóstico e o manejo da AR é crucial (2).

A prevalência da AR na população mundial varia de 0,4% a 1,3%, sendo a frequência de novos diagnósticos de AR comum entre as idades de 50 a 60 anos. As mulheres são afetadas duas a três vezes mais do que os homens e a incidência da doença é maior nas áreas urbanas do que nas rurais (3). Variações geográficas são amplamente observadas na taxa de prevalência da AR, possivelmente, devido à combinação de apresentações comportamental, climática, ambiental, genética e clínica da doença (4) (figura 1).

Figura 1 – Epidemiologia global da artrite reumatoide.



Legenda: Incidência da artrite reumatoide ao redor do mundo.  
Fonte: Finckh e colab., 2022

A ocorrência da AR é maior nos países da América Latina, com 1,25% da população atingida (6) e menor nos países do sul da Europa (7) e nas Antilhas Francesas (Martinica) (8). A prevalência na América do Sul é de cerca de 0,5% da população, variando de 0,22% no Brasil a 2,40% no Paraguai. Em vários países, as populações indígenas apresentam maior prevalência de AR, com estimativas variando de 2 a 6 vezes mais que as populações não indígenas (4). Além disso, a população indígena compartilha semelhanças nas dificuldades de acesso à cobertura de saúde, o que pode influenciar os desfechos clínicos (9).

É importante mencionar, que, a prevalência relatada de AR em todo o mundo varia amplamente e não está claro se isso se deve a inconsistências na definição de populações, as metodologias usadas para identificar pacientes com AR ou aos critérios de classificação da AR empregados (10,11). Em contrapartida, essa variação pode ser um reflexo verdadeiro do efeito de diferentes fatores de risco ao longo do tempo e entre jurisdições, incluindo idade, sexo, diferenças socioeconômicas, diferenças etnogenéticas ou exposição a outros fatores de risco (11,12).

Taxas de mortalidade mais altas em pacientes com AR em comparação com a população sem AR, foram descritas pela primeira vez em um estudo observacional longitudinal há mais de 65 anos (13). As taxas de mortalidade em indivíduos com AR são cerca de 1,5 vezes maiores do que na população em geral, com padrões semelhantes nos últimos 50 anos (14). As principais causas de morte identificadas entre os pacientes com AR são o aumento da incidência de doenças do sistema circulatório, câncer e doenças respiratórias (15).

Apesar do prognóstico a longo prazo ter melhorado nos últimos anos, em especial, devido ao diagnóstico precoce e aos novos tratamentos farmacológicos (1), estudos atuais demonstram que a AR ainda está associada a maior risco de mortalidade (1,16–18).

## **O desenvolvimento da AR**

### Etiologia da AR

A AR é uma doença heterogênea com etiologia, parcialmente, desconhecida. O entendimento atual é que a AR é uma doença multifatorial, em que interações complexas entre o hospedeiro e fatores ambientais determinam o risco geral de suscetibilidade,

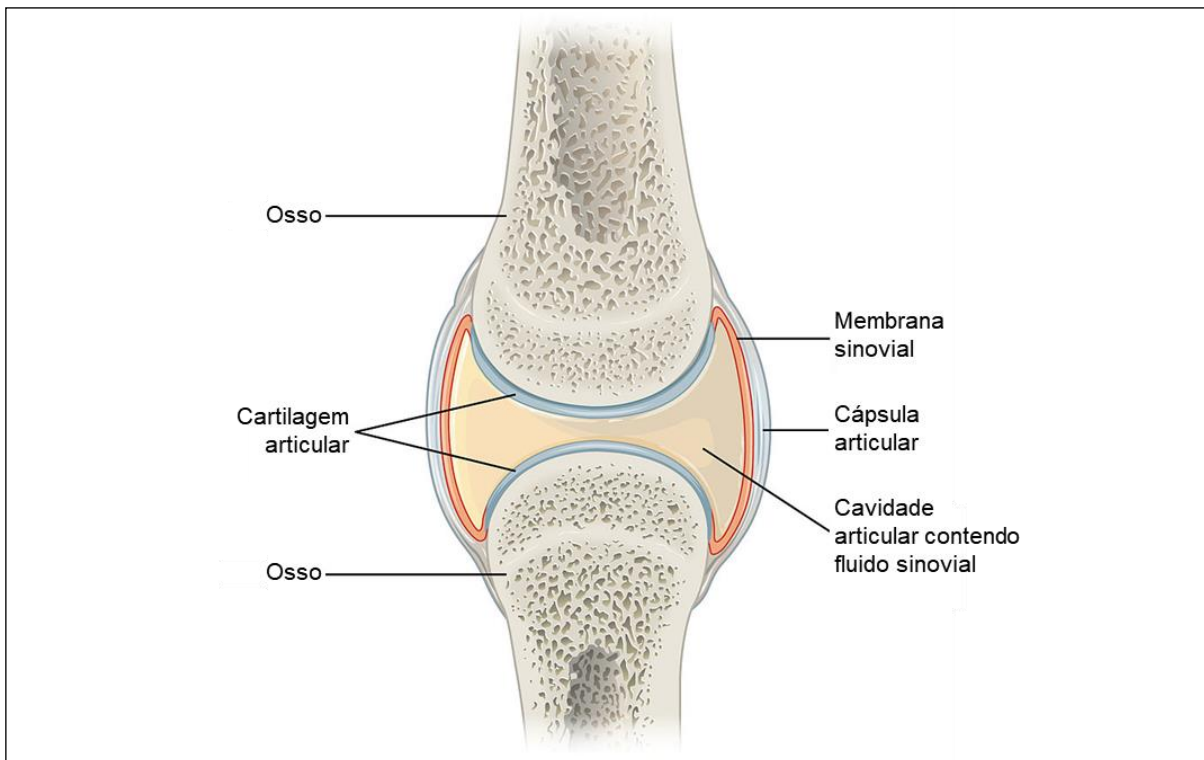


persistência e gravidade da doença (11,19). Fatores de risco relacionados ao hospedeiro são agrupados em: genéticos, epigenéticos; hormonal, reprodutiva e neuroendócrina; e fatores comórbidos do hospedeiro. Já os fatores relacionados ao ambiente incluem: tabagismo e outras exposições aéreas; microbiota e agentes infecciosos; dieta; e fatores socioeconômicos (20–23).

A forma como os fatores de risco contribuem para a doença não é, totalmente, compreendida e, provavelmente, as vias envolvidas no dano são heterogêneas e incluem mecanismos distintos entre indivíduos (5). No entanto, é provável que o estabelecimento inicial da AR exija dois eventos separados: (1) predisposição genética do respectivo paciente, resultando na geração de células T e B autorreativas e, (2) um evento desencadeante, como infecções virais e bacterianas ou lesão tecidual, estimulando células apresentadoras de antígenos (APCs) para ativação dos linfócitos autorreativos gerados anteriormente, resultando em tolerância interrompida e subsequente destruição tecidual (3).

Embora a AR seja uma doença sistêmica e uma variedade de eventos imunológicos ocorra em superfícies mucosas e tecidos linfoides primários, as articulações são o alvo central (24). Uma articulação sinovial, como a articulação do joelho, conecta dois ossos com uma cápsula articular fibrosa que é contínua à camada externa de ambos os ossos. A cápsula fibrosa é revestida por uma membrana sinovial, ou sinóvia, que possui células que produzem líquido sinovial e removem detritos, além de vasos sanguíneos e linfáticos circundantes. Juntas, a membrana sinovial e a cartilagem articular formam o revestimento interno do espaço articular (25) (figura 2).

Figura 2 – Estruturas básicas de uma articulação sinovial.



Legenda: Articulação sinovial saudável composta por suas estruturas básicas: osso, cartilagem articular, membrana sinovial, cápsula articular e cavidade articular contendo o fluido sinovial.

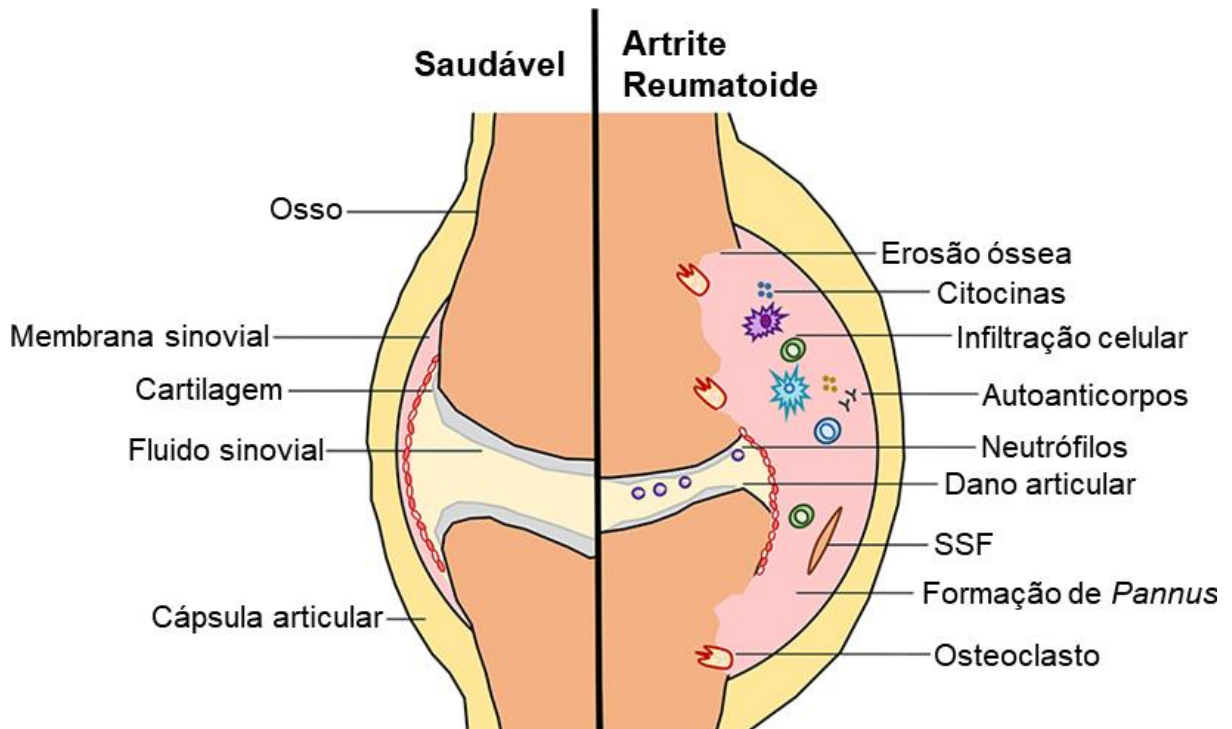
Fonte: Adaptada de TeachMe Series, 1995. Disponível em: <https://teachmeanatomy.info/the-basics/joints-basic/synovial-joint/>.

Uma sinóvia saudável é uma estrutura bastante delicada com uma camada sinovial íntima composta por sinoviócitos semelhantes à macrófagos (SSM) e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (SSF) e uma camada sinovial subíntima composta por fibroblastos, adipócitos, vasos sanguíneos e células imunes dispersas. A camada sinovial íntima é permeável, possibilitando o tráfego de células e proteínas para o líquido sinovial (26–28). A sinóvia desempenha funções importantes, como a produção de lubrificantes que permitem que as superfícies da cartilagem operem em um ambiente de baixo atrito e fornecimento de nutrientes para a cartilagem, que não tem seu próprio suprimento sanguíneo (24).

Duas alterações patogenéticas principais na sinóvia são evidentes na AR: (1) a expansão da camada sinovial íntima devido ao aumento e ativação de SSM e SSF e (2) a infiltração de células imunes adaptativas na camada sinovial subíntima (24,29–31). Tais alterações geram uma inflamação articular crônica e consequente angiogênese ao redor da articulação, o que permite a chegada de um número ainda maior de células inflamatórias (25). O grau de hiperplasia sinovial correlaciona-se com a gravidade das erosões da cartilagem,

resultando na formação de *pannus* inflamatório, que se liga e invade a cartilagem articular, enquanto a ativação dos osteoclastos, leva à destruição óssea paralela (figura 3) (19). Os osteoclastos desempenham papel fundamental na progressão da AR (3,32,33), suas características e funções serão discutidas mais adiante.

Figura 3 – Visão esquemática de uma articulação normal e suas alterações na AR.



Legenda: Principais alterações patogenéticas evidentes na AR: a expansão da camada sinovial íntima devido ao aumento e ativação de sinoviócitos semelhantes à macrófagos (SSM) e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (SSF) e a infiltração de células imunes adaptativas na camada sinovial sub-íntima. O grau de hiperplasia sinovial está correlacionado com a gravidade das erosões da cartilagem, resultando na formação de *pannus* inflamatório, que se liga e invade a cartilagem articular, enquanto a ativação dos osteoclastos, leva à destruição óssea paralela. Fonte: Adaptada de Smolen e Steiner, 2003.

## Fisiopatologia da AR

Na maioria dos pacientes, a AR começa anos antes que os sintomas clínicos sejam evidentes. Embora os mecanismos fisiopatológicos da AR não estejam totalmente elucidados, várias hipóteses têm sido postuladas envolvendo interações entre células e mediadores do sistema imunológico inato e adaptativo (30,35). Sabe-se que a patogênese da AR envolve uma complexa rede de citocinas, quimiocinas, metaloproteinases de matriz (MMPs) e células imunes que desencadeiam a proliferação de células sinoviais, culminando na destruição progressiva das estruturas articulares, geralmente acompanhada de manifestações extra-articulares (30,31,36).

Estudos demonstram que os agentes causadores da AR, como agentes infecciosos, dieta e tabagismo, podem atuar nas células das mucosas e promover a conversão pós-traducional do aminoácido arginina em citrulina em uma variedade de proteínas, incluindo proteínas intracelulares (como histonas) e proteínas de matriz (por exemplo, fibronectina, colágeno, fibrinogênio, enolase e vimentina) via indução de peptidil arginina e deiminases em um processo chamado citrulinação (também conhecido como deaminação da arginina) (24) (Figura 4a).

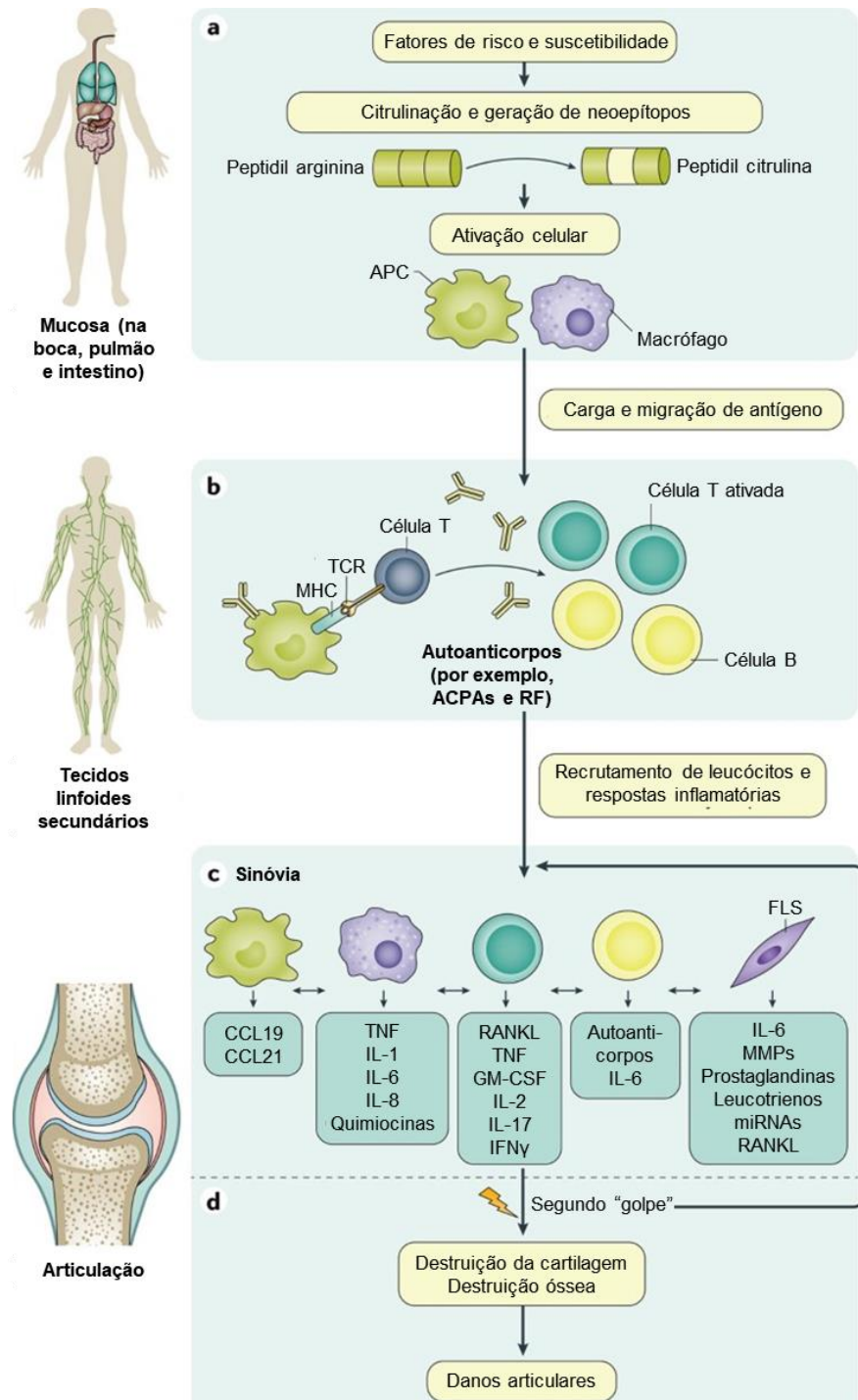
Após a citrulinação ou outras modificações pós-traducionais, os peptídeos alterados se ligam aos heterodímeros da proteína Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), levando à apresentação do antígeno às células T, que por sua vez estimulam as células B a sintetizar uma variedade de autoanticorpos, incluindo o Fator Reumatoide (FR) e os Anticorpos Antiproteínas Citrulinadas (ACPAs) (36) (Figura 4b).

A presença de autoanticorpos é uma característica da AR que precede o início das manifestações da doença e prediz a progressão para o tipo soropositivo clássico. A presença de ACPAs e FR está associada a um curso mais agressivo da doença (19). No entanto, é importante ressaltar que a presença isolada de ACPAs ou FR não é suficiente para causar sinovite, um estímulo adicional (por exemplo, formação de complexo imune, ativação do complemento ou insulto microvascular) é necessário para iniciar a sinovite clínica caracterizada por aumento da permeabilidade vascular e influxo de células inflamatórias na sinóvia (24).

Uma vez que os autoantígenos específicos da RA presentes, não podem ser completamente eliminados, a ativação contínua de células imunes resulta em um estado

inflamatório crônico e autoperpetuante na articulação (3). Os SSM produzem uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , enquanto os SSF produzem, principalmente, grandes quantidades de MMPs e mediadores de prostaglandinas e leucotrienos (figura 4c). Não obstante, SSF assumem um fenótipo invasivo, sendo responsável por danos à cartilagem e potencial migratório de uma articulação para outra, favorecendo a propagação da doença (figura 4d) (24,37).

Figura 4 – Mecanismos envolvidos na iniciação e progressão da AR.



Legenda: **(a)** Modificações pós-transcricionais na mucosa podem criar neoepítomos que podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico adaptativo; **(b)** Peptídeos modificados são apresentados por APCs; **(c)** Ativação de células SSF, APCs e macrófagos; **(d)** As ações parácrinas e autócrinas das citocinas, juntamente com respostas imunes adaptativas persistentes, perpetuam a doença e levam à destruição da cartilagem e do osso. APC: Célula Apresentadora de Antígeno; TCR: Receptor de Célula T; MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade; ACPAs: Anticorpos Anti-proteína Citrulinada; FR: Fator Reumatoide; CCL: Ligante de Quimiocina; TNF: Fator de Necrose Tumoral; IL: Interleucina; RANKL: Ativador do Receptor do Ligante do Fator Nuclear  $\kappa$ B; GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos de Granulócitos; IFN: Interferon; MMP: Metaloproteinases de Matriz.

Fonte: Adaptada de Smolen e colab., 2018.

O papel das células imunes na patogênese da AR vêm sendo validada. Os neutrófilos são as primeiras células a atingir a sinóvia e os leucócitos mais abundantes nas articulações inflamadas (38). Na sinóvia, os neutrófilos induzem intensa produção de espécies reativas de oxigênio (39,40), estimulam a citrulinização da arginina devido à expressão da enzima arginina peptidil deiminase 4 (PADI4) (41,42) e amplificam a liberação de citocinas pró-inflamatórias acentuando a inflamação local (43,44). Além disso, neutrófilos ativados na sinóvia secretam “armadilhas”, ou redes, extracelulares de neutrófilos (NETs), contendo histonas citrulinadas que podem ser reconhecidas como autoantígenos por ACPAs (43,45,46).

Os monócitos e macrófagos também desempenham um papel central no início e desenvolvimento do quadro patológico da AR, principalmente devido à produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e radicais livres, e à liberação de MMPs que levam à inflamação e destruição articular (47–49). Além disso, acredita-se que os macrófagos e produtos de sua atividade estejam envolvidos na angiogênese sinovial (50).

Em especial, células linfoides inatas (ILCs) são as principais células contribuintes para a patogênese da AR. Existem três grupos diferentes de linfócitos inatos (ILCs): ILC1, ILC2, ILC3 (51). Células *natural killer* (NKs), um tipo de ILC1, se acumulam na membrana sinovial inflamada da AR e contribuem para a destruição articular via aumento da expressão de granzima B. A granzima B atua na promoção da autoimunidade, gerando novos epítomos e induzindo danos diretos à cartilagem (52,53). Ademais, as células NKs CD56+, quando ativadas com IL-12, IL-15 ou IL-18, estimulam a produção de TNF- $\alpha$  por monócitos CD14+ (54). Subpopulações de células NK podem ser usadas como biomarcadores para progressão, diagnóstico e alvos terapêuticos no tratamento da AR (49).

Até o momento, um número limitado de estudos investigam o papel de outras ILCs na patogênese da AR. Os achados indicam que, antes do desenvolvimento e durante as fases iniciais da AR, a distribuição de ILCs nos linfonodos muda de um perfil homeostático para um mais inflamatório (55). Células ILC3 CCR6+ contribuem para a inflamação da AR através da produção excessiva de IL-17 e IL-22 (56). Em contraste com a ILC1 e a ILC3, os níveis de ILC2 diminuem na sinóvia dos pacientes com AR, enquanto seu número é maior nas articulações/circulação quando os pacientes com AR estão em remissão. Aumento da inflamação e erosão óssea, devido à inativação de células T reguladoras, são observados na ausência de proliferação de ILC2 (57).

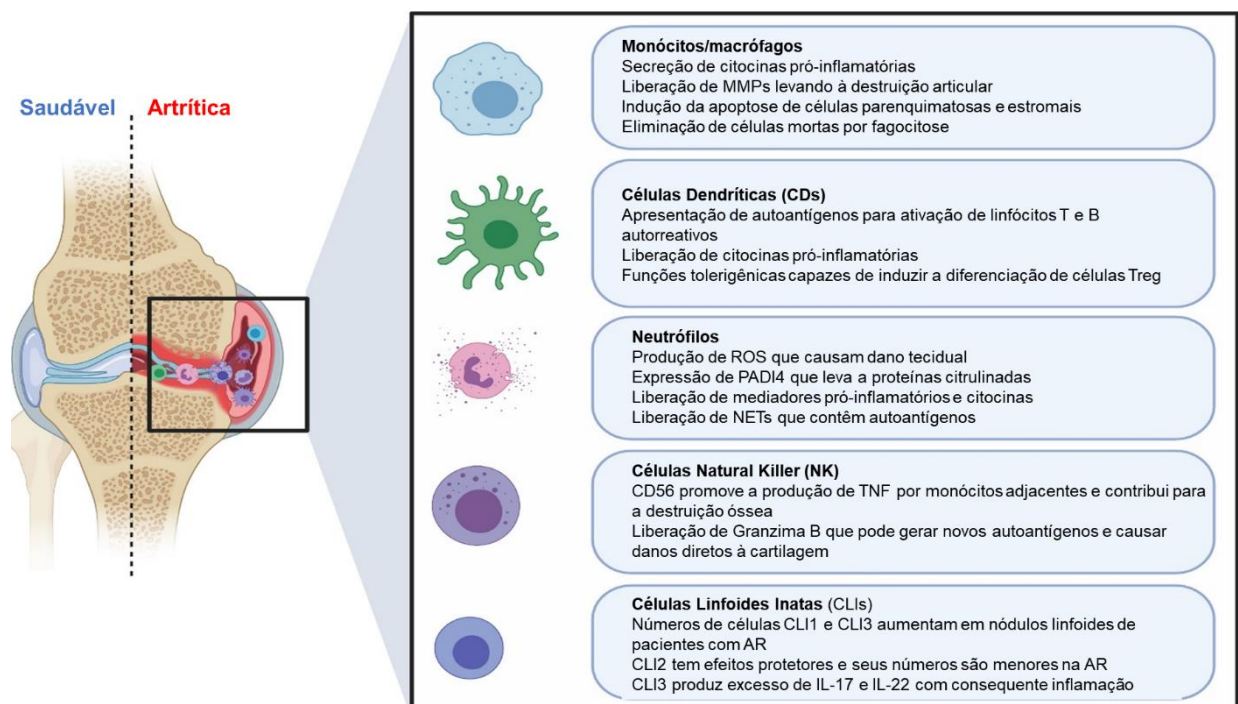
Por fim, as células dendríticas (DCs) também estão envolvidas na patogênese da AR. No tecido sinovial inflamado, a maioria das APCs são DCs totalmente diferenciadas que expressam altos níveis de MHC de classe I e II e moléculas coestimuladoras de células T



(49,58). Os subconjuntos de DCs diferem consideravelmente em localização, secreção de citocinas e funções imunológicas. O acúmulo de sinais de perigo no tecido inflamado estimula as DCs à perfis imunogênicos ou tolerogênicos que contribuem para a progressão da doença. Na AR, CD<sub>s</sub> ativadas desempenham funções imunogênicas secretando quantidades elevadas de citocinas, com TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-6, IFNs, bem como de fatores de diferenciação, incluindo o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Por outro lado, CD<sub>s</sub> podem desempenhar um papel tolerogênico controlando a diferenciação de células T reguladoras (49,59).

Os papéis relevantes das células imunes inatas na patogênese da AR estão sintetizados na imagem abaixo (figura 5)

Figura 5 – Contribuição de células imunes inatas para a patogênese da AR.



Legenda: Contribuição de células imunes inatas para a patogênese da AR. Monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células natural killer e células linfóides inatas desempenham papéis fundamentais nas fases iniciais da doença, bem como na progressão da AR. MMP: Metaloproteinases da Matriz; ROS: Espécies Reativas de Oxigênio; PADI: Peptidilarginina Deiminase; NET: Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos; TNF: Fator de Necrose Tumoral; IL: Interleucina.

Fonte: Adaptada de Edilova e colab., 2021.

### O papel dos osteoclastos na AR

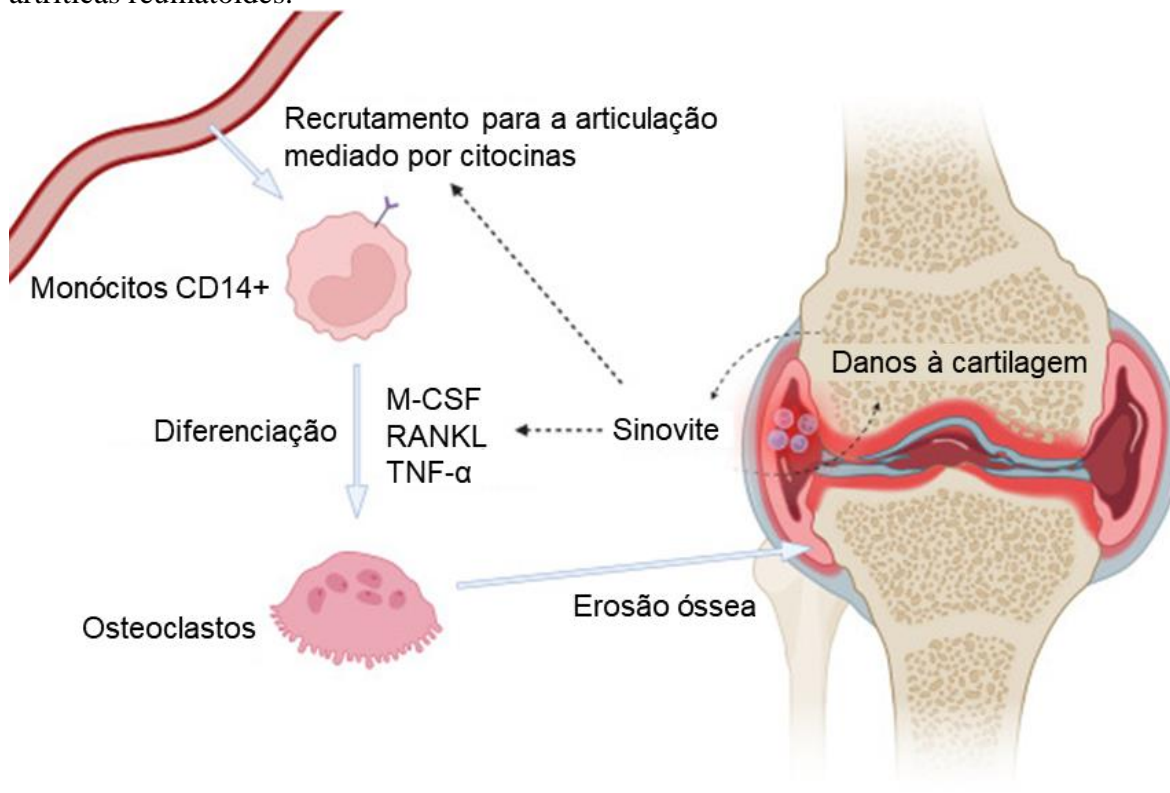
O esqueleto é um órgão metabolicamente ativo que sofre remodelação contínua ao longo da vida (60). A remodelação óssea adapta a arquitetura óssea para atender às necessidades mecânicas em constantes mudanças e repara microdanos na matriz óssea, evitando o acúmulo de osso velho. O remodelamento ósseo envolve a remoção do osso mineralizado pelos osteoclastos, seguido pela formação de matriz óssea através dos osteoblastos que posteriormente se tornam mineralizados (33,61). Uma perda de equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos contribui para a maioria das doenças ósseas em adultos, incluindo a AR (32,62,63).

As erosões ósseas características da AR são, em grande parte, devido à maturação e ativação de osteoclastos que aderem à superfície óssea e secretam enzimas ácidas e líticas que degradam a matriz (32). Os osteoclastos são células que se diferenciam de precursores da linhagem hematopoiética de monócitos/macrófagos CD14<sup>+</sup> em osteoclastos mononucleares que se fundem para formar grandes células multinucleados (32,64).

O processo de diferenciação dos osteoclastos é chamado de osteoclastogênese, e duas citocinas desempenham papéis fundamentais, o M-CSF e o Ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa B (RANKL). A ligação do M-CSF ao receptor do fator 1 estimulador de colônias (c-Fms) fornece sinais necessários para a proliferação e sobrevivência de células precursoras de osteoclastos, enquanto a ligação de RANKL ao receptor ativador nuclear kappa B (RANK) estimula os sinais necessários para a diferenciação dos osteoclastos, bem como a função reabsortiva e a sobrevivência dos osteoclastos maduros (3,32,33,65).

Os SSF e as células imunes infiltradas na sinóvia inflamada da AR secretam citocinas pró-inflamatórias e induzem a osteoclastogênese (3). Em particular, as células T e células B produzem RANKL, enquanto as células T e macrófagos secretam M-CSF (32,33,60). Além disso, em conjunto com os SSF, os monócitos e macrófagos produzem TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-17 que regulam ainda mais a secreção local de RANKL (62,66–68) (figura 6). Os altos níveis de M-CSF e RANKL na sinóvia inflamada levam à superfunção dos osteoclastos e à destruição óssea na AR, resultando em incapacidade e deformidade articular (3,32,33).

Figura 6 – A osteoclastogênese e o impacto da atividade de osteoclastos nas articulações artríticas reumatóides.



Legenda: A inflamação persistente na articulação artrítica gera uma variedade de fatores, incluindo quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, como o  $\text{TNF-}\alpha$ , e as citocinas que impulsionam a diferenciação de osteoclastos (M-CSF e RANKL). As quimiocinas recrutam células CD14+ do sangue periférico que são induzidas por M-CSF e RANKL a se diferenciarem em osteoclastos multinucleados maduros, que aderem ao osso e causam destruição óssea local. CD14: grupo de diferenciação 14; M-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos; RANKL: Ligante do Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa;  $\text{TNF-}\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa.

Fonte: Adaptada de Kim, Gyeong Min e colab., 2022.

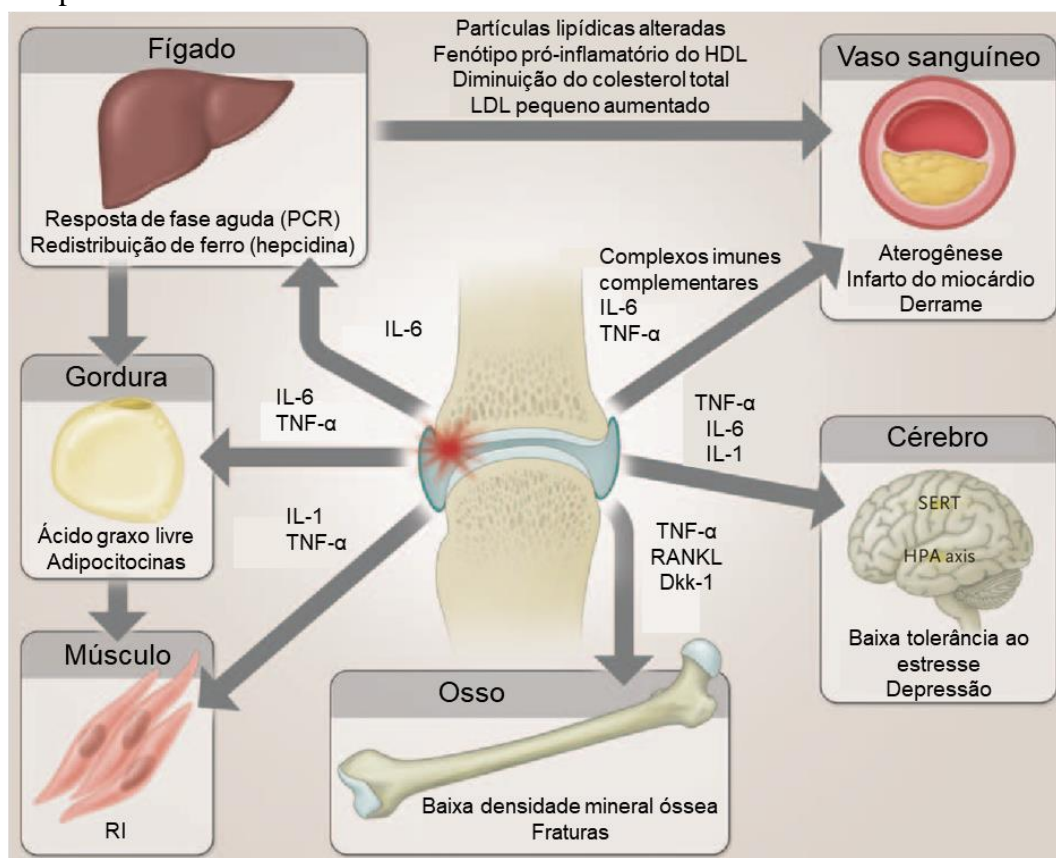
## Manifestações extra-articulares da AR

Devido à inflamação grave e persistente, manifestações sistêmicas extra-articulares podem ser observadas em pacientes com AR (25,69–72). As características bioquímicas lipídicas estão, intimamente, relacionadas à inflamação, a fim de garantir uma defesa metabolicamente eficiente ao hospedeiro. Níveis séricos reduzidos de colesterol total, HDL e LDL são observados em pacientes com AR. A exacerbação das citocinas inflamatórias nos pacientes com AR torna os tecidos musculares e adiposos resistentes à insulina, favorecendo o quadro de síndromes metabólicas. (70,73,74). Os vasos sanguíneos também são afetados, uma vez que as paredes vasculares inflamadas resultam em diferentes formas de vasculite, tornando-as propensas ao desenvolvimento de placas ateromatosas ou fibrogordurosas (25).

De fato, estudos demonstram a associação da AR com taxas aumentadas de doenças cardiovasculares, incluindo infarto do miocárdio, eventos cerebrovasculares e insuficiência cardíaca. Vale ressaltar que a incidência dessas manifestações sistêmicas em pacientes com a doença não estão relacionadas à fatores de risco tradicionais, uso de glicocorticoides ou anti-inflamatórios não esteroides ou características genéticas compartilhadas (69,75,76).

Ainda, a inflamação na AR afeta o cérebro (fadiga e redução da função cognitiva) (71), induz depressão (77), prejudica o fígado (resposta de fase aguda elevada e anemia crônica) (78), os pulmões (inflamação e doença fibrótica) (72), as glândulas exócrinas (síndrome de Sjögren secundária) (79), os músculos (sarcopenia) (80) e os ossos (osteoporose) (81,82) (figura 7). O tratamento anti-inflamatório eficaz retarda a perda óssea e suprime a alta taxa de reabsorção óssea sistêmica (83).

Figura 7 – Mecanismos que contribuem para complicações clinicamente observadas a longo prazo em pacientes com AR.



Legenda: Mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, complexos imunes e metabolismo lipídico alterado, circulam para promover várias condições coexistentes em pacientes com artrite reumatoide. PCR: proteína C-reativa, IL: interleucina, TNF: fator de necrose tumoral, RANKL: ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa B HDL: lipoproteína de alta densidade, HPA: hipotálamo-hipófise-adrenal, LDL: lipoproteína de baixa densidade e SERT: transportador de serotonina, RI: resistência à insulina.

Fonte: Adaptada de McInnes e Schett, 2011.

Para mais, o estado inflamatório persistente em indivíduos com AR aumenta o risco de desenvolvimento de tumores, como linfoma e câncer de pulmão. A associação pode estar relacionada à seleção clonal de células B, vigilância imune deficiente devido à atividade prejudicada de células T reguladoras e função prejudicada de células NK (84).

A incidência de 2 a 6 vezes mais elevada de câncer de pulmão entre pacientes com AR pode ser explicada, em parte, pela associação com o tabagismo (85). No entanto, a inflamação crônica por si só, aumenta o risco de câncer de pulmão, independentemente, do tabagismo, possivelmente, devido às manifestações extra-articulares da AR na remodelação fibrótica do tecido pulmonar intersticial (25).

Pacientes com manifestações ou complicações sistêmicas da AR devem ser tratados e monitorados de forma mais agressiva para reduzir o risco de mortalidade. Apesar dos avanços da indústria farmacêutica em relação aos resultados terapêuticos da doença, o manejo das manifestações e complicações sistêmicas permanece um desafio. Ainda, novas complicações surgiram devido às muitas terapias direcionadas (86). Por fim, a COVID-19 trouxe mais um fator de complicação e estudo aos eventos extra-articulares da AR (87).

## **Tratamento da AR**

Uma vez que a AR é diagnosticada em um paciente, o objetivo geral do tratamento é atingir a remissão completa ou, pelo menos, reduzir, significativamente, a atividade da doença, a fim de prevenir danos articulares, incapacidade e manifestações sistêmicas da AR (88).

Até o início da década de 1990, a estratégia comum de tratamento da AR baseava-se em uma pirâmide de tratamento que consistia em repouso no leito e administração de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), se esses tratamentos falhassem iniciava-se a terapia com drogas antirreumáticas modificadoras de doença (DMARDs). No entanto, a eficácia dessa estratégia de tratamento foi limitada e, em poucos anos, os pacientes apresentavam destruição articular, incapacidade de trabalhar e aumento da mortalidade (3,89). Entre os medicamentos mais utilizados, encontravam-se: ácido acetilsalicílico, sais de ouro parenterais, sulfassalazina (SSZ), cloroquina, hidroxicloroquina (HCQ), metotrexato (MTX), D-penicilamina, ciclosporina, azatioprina e outros (90,91).

Nos últimos anos o repertório de medicamentos e estratégias terapêuticas com benefícios para o tratamento da AR tem crescido de forma constante e complementado por tratamento não farmacológico, que inclui fisioterapia, medicina tradicional chinesa, entre outros, de modo a retardar a progressão da doença (92,93).

AINEs, glicocorticoides imunossupressores e DMARDs continuam sendo as classes de medicamentos mais utilizadas no tratamento da AR, no entanto com protocolos terapêuticos diferenciados (94,95). Os AINEs, embora reduzam a dor e a rigidez e melhorem a função articular, não são capazes de modificarem o curso da doença e, conseqüentemente, prevenir o dano articular. Os glicocorticoides, apesar de serem anti-inflamatórios altamente potentes que possibilitam efeitos sintomáticos rápidos e retardam a progressão radiológica em estágios iniciais, estão associados a efeitos colaterais multissistêmicos graves de longo prazo, como sangramento gastrointestinal, osteoporose e formação de úlceras (3,96,97).

Por sua vez, os DMARDs são agentes imunossupressores e imunomoduladores e são classificados como DMARDs convencionais ou DMARDs biológicos. Ambas as classes de DMARDs visam a redução da inflamação reumatoide e controle da progressão da doença, por conseqüência interferem nos sinais e sintomas da AR, melhoram a função física e inibem a progressão do dano articular estrutural (92,98). DMARDs convencionais comumente utilizados incluem MTX, HCQ e SSZ.

Os DMARDs biológicos foram introduzidos no início da década de 1990 e geralmente são prescritos após o fracasso da terapia com DMARDs convencionais. Alguns agentes biológicos incluem infliximabe, adalimumabe, etanercepte, rituximabe, abatacepte, rituximabe, tocilizumabe, tofacitinibe, entre outros. Os DMARDs biológicos são altamente específicos e têm como alvo uma via específica do sistema imunológico. Alguns desses fármacos são anticorpos monoclonais de fusões quiméricas humanizadas, enquanto outras são receptores que foram fundidos a uma parte da imunoglobulina humana ou a pequenas moléculas, como os inibidores da Janus Quinase (JAK) (92).

Atualmente, as etapas e linhas terapêuticas preconizadas pelo Ministério da Saúde para o tratamento medicamentoso da AR são (figura 8) (BRASIL, 2020):

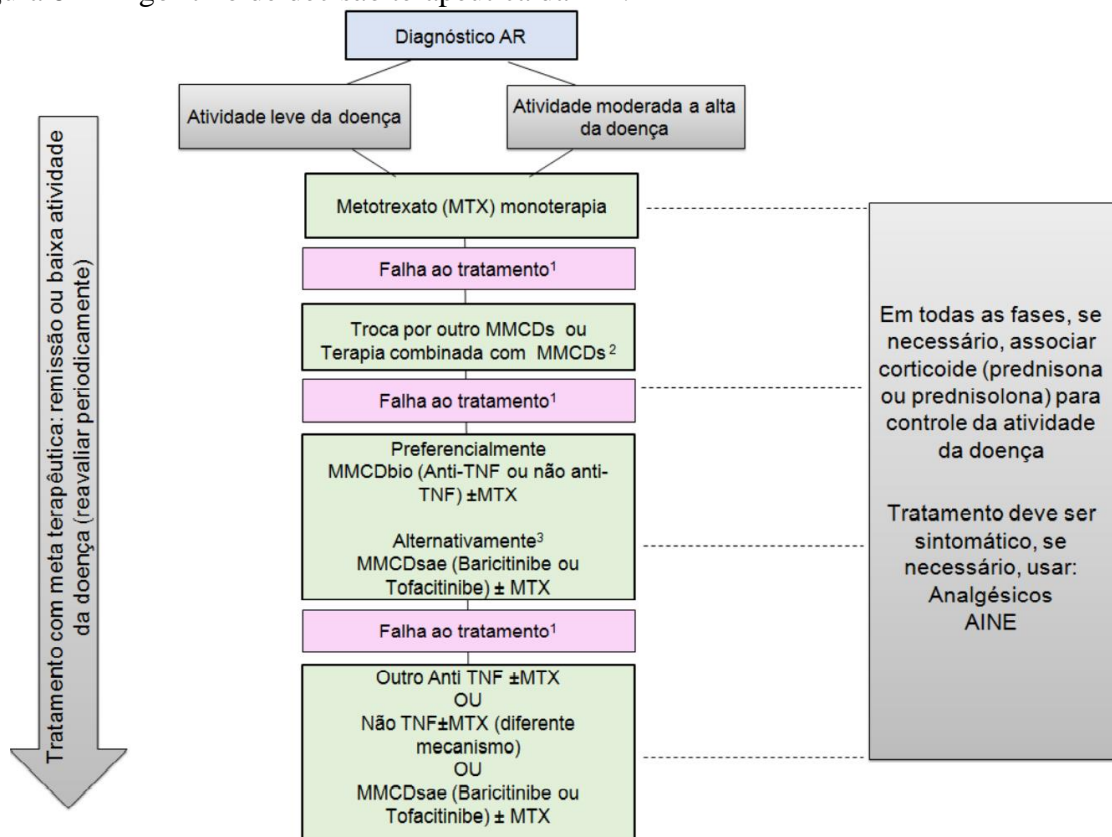
1ª Etapa: DMARDs sintéticos convencionais – uso do MTX em monoterapia deve ser a primeira escolha terapêutica. Em casos de intolerância ao MTX oral, deve-se tentar dividir a administração por via oral ou empregar o MTX injetável. Na impossibilidade de uso do MTX por toxicidade, deve-se usar outro DMARD sintético convencional em monoterapia. Em caso de falha da monoterapia inicial, após 3 meses de tratamento otimizado (dose máxima tolerada

e adesão adequada), passa-se para a terapia com a combinação dupla ou tripla de DMARDs sintéticos convencionais. A associação de MTX com HCQ está entre as mais recomendadas.

2ª Etapa: DMARDs biológicos ou DMARDs sintéticos alvo específico – após o uso de, pelo menos, dois esquemas terapêuticos na primeira etapa por no mínimo 3 meses cada um e havendo persistência da atividade da doença, utiliza-se um DMARD biológico, ou DMARD sintético alvo específico. Esses devem ser usados em associação com o MTX, exceto no caso de contraindicação. Neste caso, pode ser considerada a associação com outro DMARD sintético convencional.

3ª Etapa: DMARDs biológicos ou DMARDs sintéticos alvo específico – após pelo menos 3 meses da segunda etapa terapêutica, e havendo persistência da atividade da doença, ou toxicidade inaceitável ao medicamento utilizado nessa etapa, pode-se prescrever outro DMARDs biológicos ou DMARDs sintéticos alvo específico, desde que o medicamento selecionado não tenha sido usado anteriormente. Se possível, o medicamento selecionado deve ser associado a um DMARD sintético convencional (preferencialmente o MTX).

Figura 8 – Algoritmo de decisão terapêutica da AR.

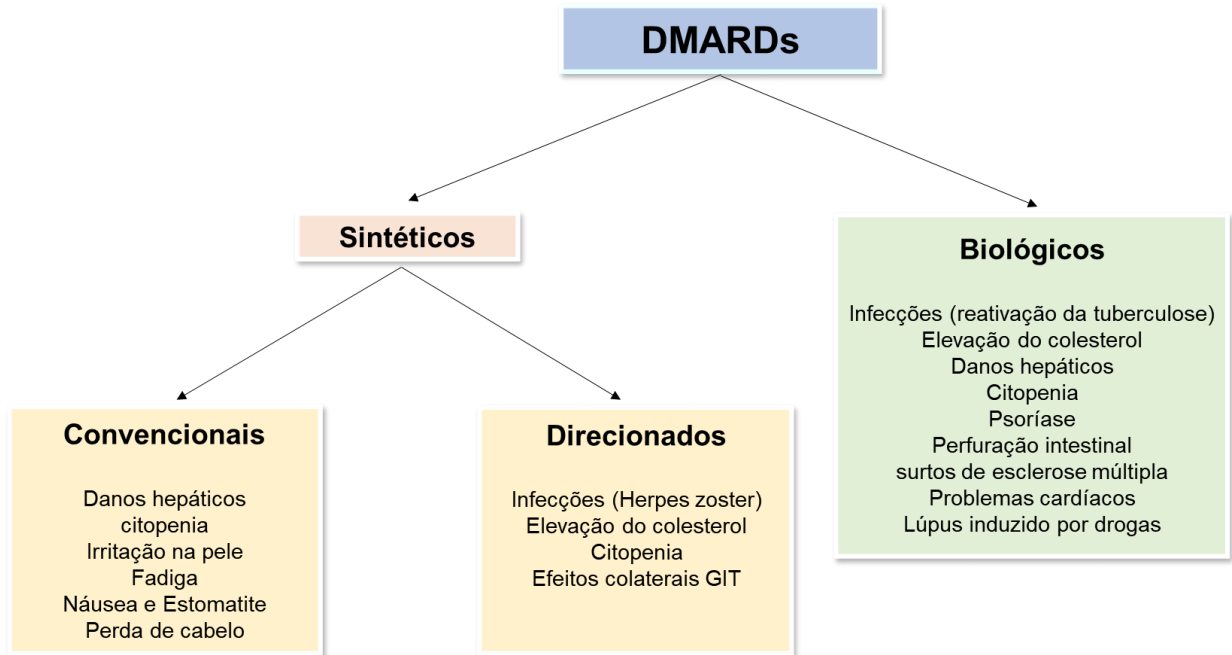


Legenda: Etapas e linhas terapêuticas para o tratamento medicamentoso da AR preconizados pelo Ministério da Saúde. MTX: metotrexato, TNF: fator de necrose tumoral.

Fonte: Brasil, 2020.

Apesar do potencial terapêutico no tratamento da AR, os DMARDs não apresentam eficácia universal e o tempo de medicação ineficiente pode levar à destruição contínua das articulações e redução da expectativa de vida (SIDDIQUI e colab., 2021). Ainda, a descontinuação do tratamento é observada por uma proporção significativa de pacientes devido aos efeitos colaterais consideráveis (97). Para DMARDs sintéticos convencionais, o perfil de efeitos colaterais é bem caracterizado, incluindo erupção cutânea, baixa tolerabilidade (com náusea, fadiga, perda de cabelo e estomatite), bem como, doença pulmonar intersticial e danos hepáticos (caracterizados por níveis elevados das transaminases) (88,97). Ademais, os pacientes podem apresentar infecções frequentes, níveis elevados de colesterol, citopenia (linfopenia ou neutropenia) e efeitos colaterais gastrointestinais (figura 9) (88,96).

Figura 9 – Efeitos colaterais comuns dos DMARDs disponíveis.



Legenda: Os efeitos colaterais são subdivididos nas três classes de DMARDs: (1) sintético convencional, (2) sintético direcionado e (3) biológico.

Fonte: Adaptada de Lin e colab., 2020.

Tal fato, evidencia a necessidade de novas abordagens para o tratamento da AR. Considerando os efeitos terapêuticos potenciais dos DMARDs convencionais, em especial o MTX e a HCQ, bem como sua ampla utilização na clínica, baixo custo e perfil de segurança e toxicidade bem estabelecido, o desenvolvimento de um novo sistema de entrega capaz de

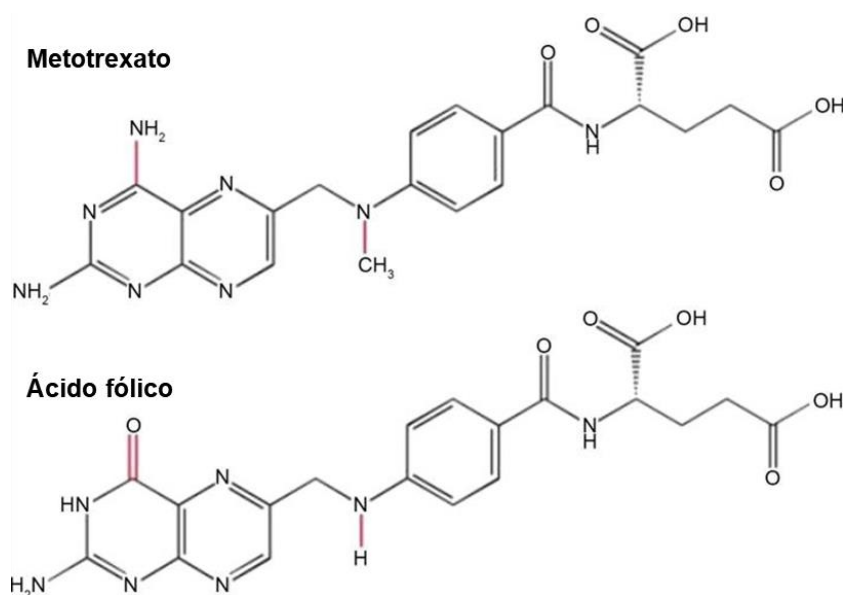


direcionar o sítio de atuação do fármaco, aumentar a sua eficácia e minimizar os efeitos adversos, poderia trazer benefícios significativos à terapêutica da AR.

### Metotrexato (MTX)

O metotrexato (MTX), ácido 4-amino-10 metil fólico, é um agente antineoplásico e imunossupressor amplamente utilizado na terapia de leucemia, linfoma, tumores sólidos, psoríase e AR (100). Estruturalmente, o MTX é um análogo do ácido fólico (figura 10) que interfere na atividade da enzima diidrofolato redutase. Ao entrar na célula, o MTX é poliglutamado, liga-se à diidrofolato redutase com uma afinidade 1.000 vezes maior que o folato e inibe competitivamente a conversão do diidrofolato em tetraidrofolato. O tetraidrofolato é essencial para a biossíntese de timidina e purinas e, conseqüentemente, para a síntese de DNA e RNA. Assim, o bloqueio da síntese do tetraidrofolato causa a incapacidade das células de se dividir e sintetizar proteínas (100–103). O MTX também exibe atividade imunossupressora potente, embora os mecanismos de ação não estejam totalmente elucidados (104).

Figura 10 – Estruturas químicas do Metotrexato e do Ácido fólico.



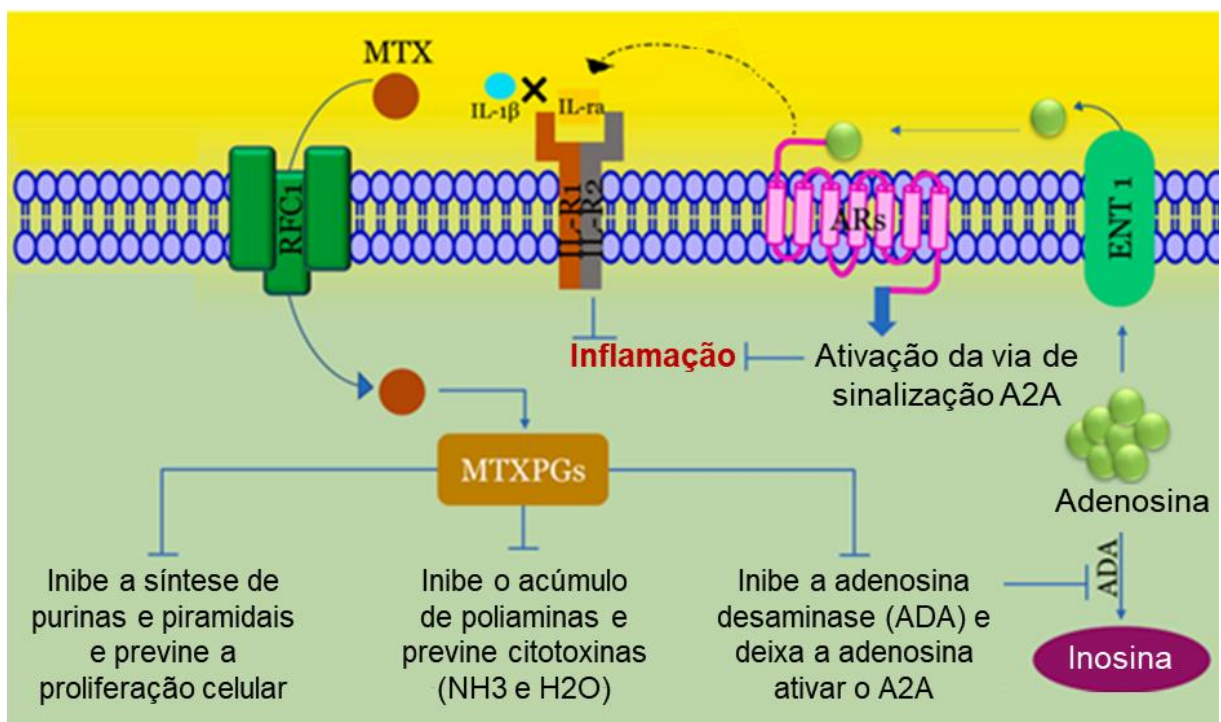
Legenda: As principais diferenças entre o metotrexato e o ácido fólico estão mostradas em vermelho.

Fonte: Adaptada de Rudin e colab., 2017.

Em adultos, a absorção oral de MTX parece ser dependente da dose. O MTX tem uma biodisponibilidade de 64-90%, embora essa diminua em doses orais acima de 25 mg, possivelmente devido à saturação do transporte mediado por carreadores do fármaco (24,104). Os níveis séricos máximos são atingidos dentro de uma a duas horas e a distribuição do MTX envolve uma variedade de tecidos, incluindo fígado, rim e líquido sinovial. O MTX é > 80% excretado como fármaco inalterado e aproximadamente 3% como o metabólito 7-hidroxiado. A excreção ocorre principalmente na urina, com 8,7-26% de uma dose intravenosa aparecendo na bile (100,102,104).

Atualmente, existe uma série de mecanismos farmacológicos sugeridos de ação do MTX, incluindo: (1) supressão das reações de transmetilação com acúmulo de poliaminas, (2) inibição da síntese de purinas e pirimidinas, (3) promoção da liberação de adenosina com supressão da inflamação mediada por adenosina e (4) redução da proliferação de células T dependentes de antígeno (figura 11). Estudos apontam que os efeitos anti-inflamatórios do MTX podem ser uma combinação de todos esses mecanismos (101,106,107).

Figura 11 – Ilustração esquemática do mecanismo do MTX na inflamação.



Legenda: Mecanismo de ação do MTX na inflamação. MTX: Metotrexato; RCF1: Transportador de Folato Reduzido 1; MTXPGs: Metotrexato poliglutamato; ADA: adenosina desaminase; ENT1: Transportador extracelular de nucleosídeos 1; ARs: Receptores de adenosina; IL: Interleucina.

Fonte: Adaptada de Katturajan e colab., 2021.

O MTX é a terapia predominante para AR há mais de 20 anos e, após o diagnóstico, é a primeira linha de terapia recomendada. Além de sua alta eficácia, o perfil de segurança e toxicidade do MTX é bem conhecido, e os custos do tratamento são baixos, quando comparados à terapia com DMARDs sintéticos direcionados ou biológicos (92,107). No tratamento da AR, as vias oral e intramuscular são as mais comuns, com uma dose usual variando de 7,5 mg a 25 mg semanalmente (106).

Embora o MTX seja a primeira escolha para o tratamento da AR, os efeitos colaterais também devem ser amplamente considerados. Os riscos de efeitos colaterais podem ser, ligeiramente, maiores durante os primeiros seis meses de administração do MTX, mas o monitoramento a longo prazo é necessário, uma vez que os riscos de efeitos colaterais podem permanecer (106). Problemas gastrointestinais, hepatotoxicidade, toxicidade pulmonar, toxicidade hematológica e toxicidade renal são os principais efeitos colaterais observados (101,108). As complicações decorrentes da MTX são mais prevalentes e graves em pacientes com disfunções renais, uma vez que cerca de 80% do fármaco é excretado por via renal (97).

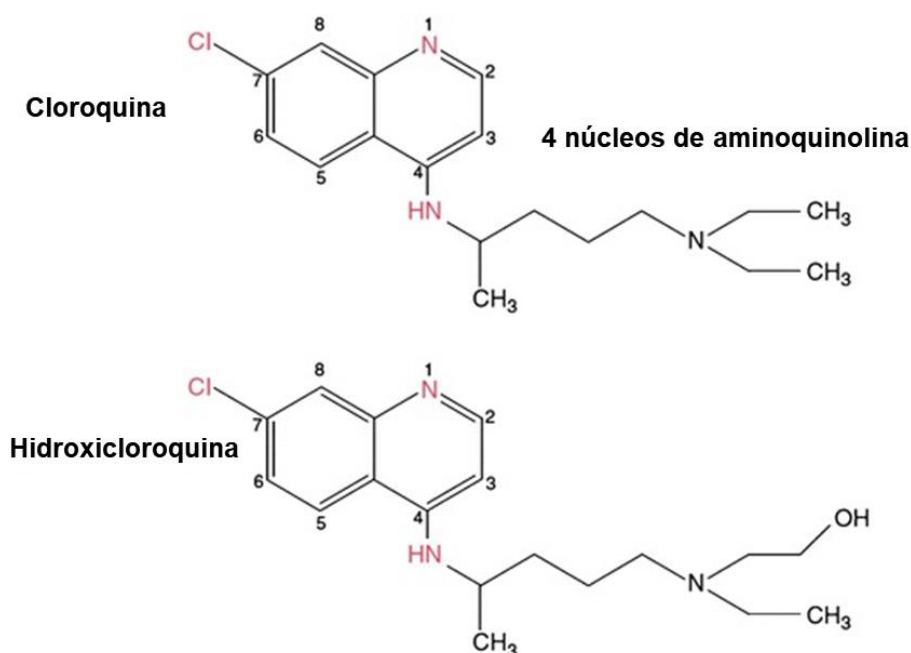
Ainda, é importante mencionar que o MTX é um substrato da proteína de resistência múltipla a drogas 1 (MRP1) e, portanto, a atividade funcional da MRP1 pode ter um impacto clínico na eficácia terapêutica do MTX na AR (108–113).

Por fim, apesar dos efeitos secundários e surgimento de diferentes medicamentos inovadores direcionados para pacientes com AR, é inegável que o MTX ainda é amplamente preferido devido ao seu efeito terapêutico potencial. Assim, seria de grande relevância clínica o desenvolvimento de novas formulações de MTX, capazes de manter a mesma eficácia clínica, porém com a administração de doses reduzidas.

### Hidroxicloroquina (HCQ)

A hidroxicloroquina (HCQ) pertence à classe dos compostos 4-aminoquinolina, sintetizada em 1946 por modificação da estrutura molecular da cloroquina com um dos grupos N-etila hidroxilado na posição 2 (BROWNING, 2014) (figura 12). Foi inicialmente comercializada como um medicamento antimalárico, precocemente substituído por medicamentos mais eficazes. Anos mais tarde, foi identificado como um DMARD convencional com ações moduladoras do sistema imunológico e, desde então, utilizado para tratar doenças autoimunes, incluindo a AR (115).

Figura 12 – Estruturas químicas da Cloroquina e Hidroxicloroquina.



Legenda: Cloroquina e hidroxicloroquina são bases anfífilas fracas baseadas em dois anéis aromáticos fundidos com ligações duplas conjugadas, o núcleo 4-aminoquinolina. As principais diferenças estão mostradas em vermelho

Fonte: Adaptada de Browning, 2014.

A HCQ está atualmente disponível como comprimido de 200 mg, na forma de sal de sulfato, equivalente a 155 mg de base, para administração por via oral (116). Após absorção, as enzimas CYP catalisam a desalquilação da HCQ em dois principais metabólitos farmacologicamente ativos: desetilcloroquina e bisdesetilcloroquina. Em indivíduos saudáveis, as concentrações máximas de HCQ são observadas dentro de 3-5 h (117,118).

A HCQ, assim como os outros 4-aminoquinolina, apresenta um grande volume de distribuição devido ao extenso sequestro do fármaco pelos tecidos, concentrando-se bastante nos pulmões, rins, fígado e baço (116,117,119). A disposição medicamentosa prossegue em três fases – distribuição do sangue para os tecidos, equilíbrio entre sangue e tecidos e liberação dos tecidos de volta ao sangue. Essas fases têm meias-vidas de 3-8 horas, 40-216 horas e 30-60 dias, respectivamente (118,120).

A excreção da HCQ ocorre, principalmente, por vias renal e hepática. Aproximadamente 40-60% é excretado como fármaco inalterado ou metabolizado através dos rins, 8-25% é excretado de forma inalterada ou alterada nas fezes, 5% é descartado através da pele e 25-45% é armazenado a longo prazo nos tecidos magros do corpo (118,119,121-124).

A disfunção renal ou hepática diminui a excreção da HCQ e leva a uma maior retenção do fármaco e maior risco de retinopatia (116,117,122).

Os efeitos terapêuticos da HCQ na AR, possivelmente são mediados por propriedades anti-inflamatórias via inibição da degradação lisossomal do antígeno e subsequente redução da apresentação de complexos peptídeo–MHC II na superfície de APCs. Juntos, esses efeitos da HCQ podem impedir a ativação de células T autorreativas e subseqüentes respostas inflamatórias (125,126). Além disso, a HCQ também inibe a produção de anticorpos RF e reagentes de fase aguda, bem como algumas enzimas, como a colagenase e a proteases, envolvidas diretamente na degradação da cartilagem (115,125,127).

A dose inicial para o tratamento da AR é de 200 mg (4–5 mg/kg/d). No tratamento da AR, a HCQ tende a ter menos efeitos colaterais quando comparada com o MTX, no entanto apresenta menor eficácia terapêutica e efeitos limitados sobre o dano articular (115). Os efeitos adversos estão predominantemente relacionados ao trato gastrointestinal, como diarreia, náusea e retinopatia. Sendo a toxicidade oftálmica o efeito colateral de maior destaque após o início do tratamento (92,96,128).

### Terapia combinada

Combinações de DMARDs estão sendo cada vez mais utilizadas em pacientes com AR em estágios iniciais quando os resultados da monoterapia sequencial de DMARD a longo prazo são ineficazes. Os resultados demonstram que terapias combinadas de DMARDs podem ser mais eficazes do que a monoterapia, sem eventos adversos adicionais de curto prazo (129).

A terapia tripla com MTX, SSZ e HCQ foi um dos pilares da terapia da AR antes que os DMARDs biológicos ou DMARDs sintéticos alvo específico estivessem disponíveis (130). O princípio por trás da terapia combinada é associar fármacos com diferentes mecanismos de ação para aumentar a eficácia, mantendo um perfil favorável de efeitos colaterais/toxicidade. Em geral, se o "fármaco A" é combinada com o "fármaco B", espera-se a intensificação dos efeitos favoráveis ou a redução dos efeitos adversos do fármaco B (131).

Como mencionado anteriormente, a abordagem tradicional tem sido o uso de monoterapia com DMARDs sintéticos convencionais, com substituição de um DMARD alternativo quando há resposta inadequada ou toxicidade ao anterior (BRASIL, 2020). Embora a evolução da doença seja retardada até certo ponto com essa abordagem, os danos estruturais

e funcionais das articulações progridem enquanto o fármaco "correto" é procurado (106,129). Assim, as utilizações de terapias combinadas têm sido priorizadas nos últimos anos.

## **Nanomedicina**

A nanociência e a nanotecnologia representam uma área de pesquisa em expansão, que envolvem estruturas, dispositivos e sistemas com novas propriedades e funções devido ao arranjo de seus átomos na escala de 1 a 100 nm. Nos últimos anos, as nanotecnologias têm sido aplicadas à saúde humana com resultados promissores, especialmente, no campo do tratamento de patologias, incluindo a AR (132).

Lipossomas, micelas, nanopartículas metálicas e nanopartículas poliméricas são os sistemas carreadores nanoparticulados mais comumente utilizados para administração de fármacos. Diversas nanopartículas exibem uma ampla variedade de propriedades físicas e químicas, como tamanho, área de superfície em relação à massa e carga de superfície que podem afetar significativamente seu potencial biomédico e propiciar melhores resultados terapêuticos (133–135).

Para maximizar a eficácia terapêutica dos agentes encapsulados, os nanocarreadores devem atender, *in vivo*, a alguns requisitos fundamentais quando administrados por via intravenosa: (1) Permanecer estável na circulação e evitar dispersão antes de atingir os locais inflamados; (2) Evitar a endocitose mediada pelo sistema reticuloendotelial; (3) Se direcionar preferencialmente para regiões inflamadas; e (4) Manter a liberação sustentada do fármaco em locais-alvo ou internalização eficientes dos nanocarreadores pelas células-alvo (136).

Ao alterar as características biofarmacêuticas e farmacocinéticas de medicamentos, os sistemas de nanofármacos podem ser uma abordagem promissora para a obtenção de novas propriedades medicamentosas. Demonstrou-se que os nanocarreadores podem aumentar a solubilidade, prolongar o tempo de circulação, reduzir a depuração e entregar os fármacos aos locais-alvo de forma controlada (133,136–140). Mais recentemente, nanocarreadores multifuncionais emergentes com sofisticadas propriedades de direcionamento e liberação de fármacos foram projetados para alcançar a entrega inteligente de medicamentos e promover a eficácia terapêutica (141,142).

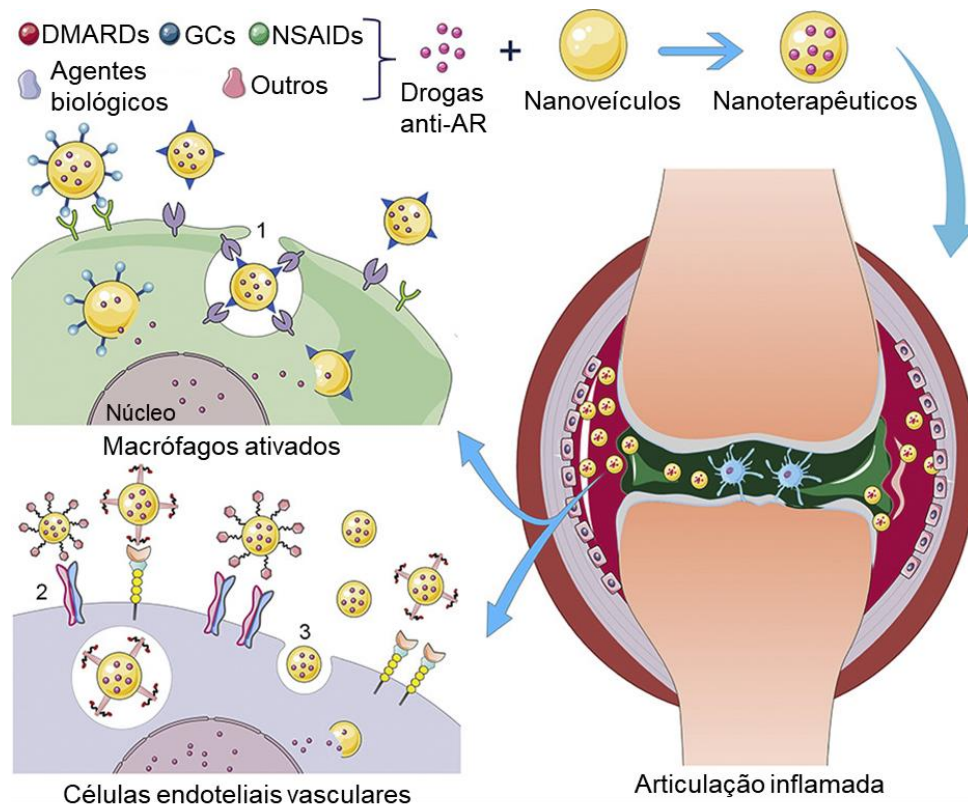
Como destacado ao decorrer desse trabalho, apesar dos avanços no diagnóstico e adoção gradual de novas abordagens terapêuticas para a AR, o tratamento eficiente para a

doença ainda enfrenta desafios consideráveis. Atualmente, não há cura para a AR e as estratégias terapêuticas clínicas existentes sofrem dos problemas de baixa eficácia, efeitos colaterais graves, baixa capacidade de resposta e ausência de remissão sustentada (136). Para superar os problemas associados à terapia da AR convencional, a nanotecnologia representa uma ferramenta promissora.

O aumento da permeabilidade vascular e a infiltração de leucócitos são as principais características patológicas da AR, que fornecem condições favoráveis e células-alvo para sistemas de liberação de nanofármacos. A inflamação persistente aumenta a permeabilidade vascular, o que permite que o nanocarreador acumule e libere os fármacos seletivamente no tecido sinovial por meio do efeito “*ELVIS*” (extravasamento através da vasculatura e subsequente sequestro mediado por células inflamatórias), que é semelhante ao aumento da permeabilidade e efeito de retenção observados no tratamento de tumores (143).

Conforme mostrado na figura 13, os agentes terapêuticos podem ser entregues seletivamente e se acumular nos locais inflamados por meio de direcionamento passivo ou ativo de nanoveículos após administração sistêmica (144). Por um lado, os danos a outros órgãos causados pela distribuição fora do alvo são notavelmente reduzidos. Por outro lado, os nanoveículos que encapsulam os agentes terapêuticos os protegem contra a biodegradação, levando à liberação sustentada do fármaco e à cinética de circulação prolongada. Portanto, o sistema de administração de fármacos em nanoescala aumenta a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos específicos, possibilitando a redução da dose administrada e, conseqüentemente, os efeitos adversos (133,143–147).

Figura 13 – Nanossistemas de entrega direcionada de fármacos para o tratamento da AR.



Legenda: Ilustração esquemática do sistema de entrega de direcionamento passivo e ativo de diferentes drogas antirreumáticas encapsuladas por nanocarreadores para gerenciamento da AR. DMARD: drogas antirreumáticas modificadoras de doença; GC: Glicocorticoides; NSAID: drogas anti-inflamatórias não esteroides; AR: Artrite reumatoide.

Fonte: Adaptada de Yang e colab., 2017.

### Pluronic® como nanocarreadores para a entrega de fármacos

No campo da nanomedicina, as nanopartículas feitas de polímeros são de particular interesse. Existem diversas propriedades fundamentais dos polímeros úteis na resolução de problemas de administração de fármacos, como: (1) possibilidade de combinações, por meio de ligações covalentes ou não covalentes, com fármacos para superar problemas de solubilidade, estabilidade, permeabilidade e outros (148,149); (2) possibilidade de direcionamento dos fármacos para locais específicos do corpo (150,151); (3) desenvolvimento de materiais responsivos a estímulos ambientais, permitindo a liberação controlada e sustentada do fármaco no local da ação (152,153); e (4) capacidade de interação e



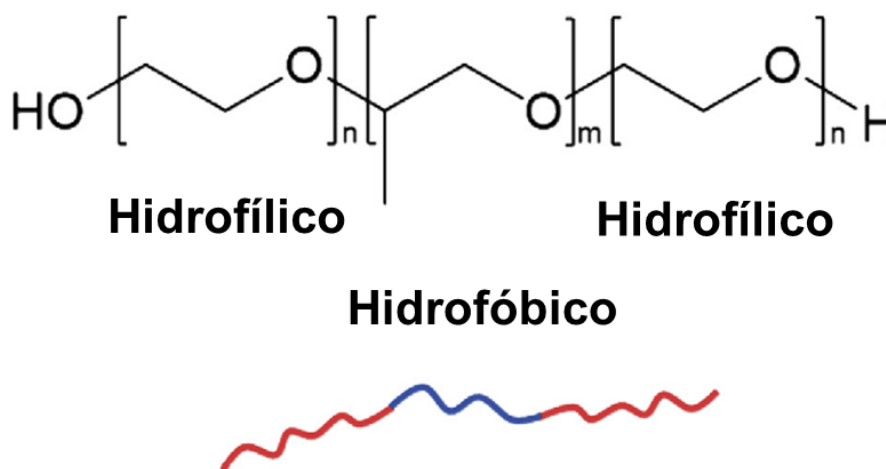
modificação da atividade de vários sistemas endógenos de transporte de fármacos no organismo, afetando a entrega de fármacos (154,155).

Entre os muitos nanossistemas orgânicos e inorgânicos investigados, os nanoveículos derivados de copolímeros de blocos anfifílicos (ABCs) sintéticos têm atraído particular atenção. Devido ao baixo peso molecular, os polímeros anfifílicos associam-se em água para formar “micelas poliméricas”, acima de uma certa concentração, designada concentração micelar crítica (149,150,156).

O uso de copolímeros de blocos anfifílicos Pluronic tem sido descrito há muitos anos em aplicações farmacêuticas e clínicas. Atualmente, são utilizados em uma variedade de produtos cosméticos ou como excipientes em formulações farmacêuticas devido às suas propriedades como surfactantes e agentes solubilizantes e emulsificantes (148,157,158).

Os Pluronic são copolímeros triblocos não iônicos compostos por um núcleo central hidrofóbico de poli(óxido de propileno) (PPO) flanqueado por cadeias hidrofílicas de poli(óxido de etileno) (PEO) com uma estrutura geral PEO<sub>n</sub>-PPO<sub>m</sub>-PEO<sub>n</sub>, onde n e m denominam o número médio de unidades PEO e PPO no copolímero em bloco (figura 14) (159). Eles estão disponíveis comercialmente sob o nome Pluronic em uma ampla gama de pesos moleculares e comprimentos e proporções de cadeia PPO/PEO que, por sua vez, são responsáveis por suas propriedades físico-químicas e biológicas únicas. Dentre eles, está o Pluronic® F-127, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso farmacêutico e investigado para diferentes aplicações terapêuticas (150,160–163).

Figura 14 – Estrutura geral do Pluronic.



Legenda: O núcleo hidrofóbico central de poli(óxido de propileno) (PPO) é flanqueado por cadeias hidrofílicas de poli(óxido de etileno) (PEO) com uma estrutura geral de PEO<sub>n</sub> PPO<sub>m</sub>-PEO<sub>n</sub>.

Fonte: Adaptada de Jarak e colab., 2020.

As cadeias de Pluronic tendem a se autoagregar em uma variedade de estruturas supramoleculares termodinamicamente estáveis em solução que é controlada não apenas pela composição de Pluronic, mas também por uma série de fatores externos. As condições como temperatura, concentração e composição, na qual as micelas são montadas, afetam a forma de agregação de Pluronic e dispersão no meio (159,164,165).

As micelas poliméricas formadas, consistem em nanossistemas constituídas por um núcleo interno hidrofóbico rodeado por uma camada externa hidrofílica. O interior hidrofóbico apresenta elevada capacidade para encapsular compostos hidrofóbicos, melhorando a solubilidade aquosa dos mesmos, enquanto o exterior hidrofílico serve como interface estabilizante entre o núcleo hidrofóbico e o ambiente externo aquoso (159,166,167).

Essa capacidade do Pluronic de se automontar sob as diferentes condições descritas, foi identificada como uma estratégia atraente para resolver a problemática de baixa solubilidade em água de muitos compostos hidrofóbicos farmacologicamente ativos, que apresentam uma farmacocinética indesejável devido à instabilidade e insolubilidade em meio fisiológico (159,168). A dispersão sólida com Pluronic F127 foi proposta como abordagem alternativa para modificar as propriedades farmacologicamente relevantes do MTX (149,169,170).

Considerando os dados mencionados ao decorrer desse trabalho, no presente estudo foram desenvolvidas e caracterizadas nanopartículas de Pluronic® F-127 carregadas com MTX e HCQ. Os efeitos desse nanossistema foram investigados *in vitro* e *in vivo*, em um modelo de artrite antigênica induzida em camundongos. Em busca de melhorias das terapias atuais para a AR, a osteoclastogênese, mecanismo de resistência à drogas e parâmetros inflamatórios após o tratamento com as nanopartículas carregadas com os fármacos antirreumáticos MTX e HCQ foram avaliados.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar nanopartículas de Pluronic® F-127 carregadas com MTX e HCQ como tratamento da Artrite Reumatoide.

### 1.2 Objetivos específicos

- Produzir e caracterizar (tamanho e índice de polidispersão) de nanopartículas de Pluronic® F-127 carregadas com MTX e HCQ;
- Avaliar, *in vitro*, o perfil de liberação de MTX e HCQ incorporadas em nanopartículas de Pluronic® F-127;
- Avaliar, *in vitro*, os efeitos das nanopartículas de Pluronic® F-127 carregadas com MTX e HCQ na osteoclastogênese;
- Investigar, *in vivo*, parâmetros inflamatórios do tratamento com nanopartículas de Pluronic® F-127 carregadas com MTX e HCQ em modelo de artrite induzida por antígeno.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

Tampão fosfato-salino (PBS), PBS/Ácido etilenodiamino tetra-acético (PBS/EDTA), co) (10 mM) solução recém-preparada, Albumina de soro bovino (BSA), BSA metilada (mBSA), Adjuvante completo de Freund, Reagente Histopaque, Pluronic F127, Kit de coloração TRAcP, Dulbecco's MEM (DMEM) alta glicose, Soro fetal bovino (FBS), Fator de estimulação de colônia de macrófagos (M-CSF), Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK-L), doxorrubicina, poli-D-lisina, glicose, Tampão HEPES, cálcio e magnésio foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os corantes MayGrünwald e Giemsa foram adquiridos da Merck (Alemanha). O pentabarbital sódico a 3% (Hypnol®) foi adquirido da Syntec (Brasil). O Tevameto (MTX injetável 25 mg/mL) foi adquirido da Teva Farmacêutica Ltda (Brasil) e a HCQ foi adquirida da Sigma Aldrich.

### 2.2 Preparo das Nanomicelas

Uma concentração de 0,3 mg/mL de HCQ e 0,6 mg/mL de MTX foram adicionados na dispersão micelar de Pluronic F127. O sistema foi agitado suavemente usando uma barra magnética (Agitador Magnético, IKA, C-MAG HS-7) e posteriormente processado por 5 min usando um processador ultrassônico (UP100H, Hielscher, Potência: 100%, Ciclo: 1) sob banho de gelo a 10°C.

### 2.3 Tamanho de partícula e potencial zeta

O tamanho de partícula, distribuição de tamanho e índice de polidispersão (PDI) do nanossistema foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) usando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). As medidas foram

realizadas em triplicata a 25 °C e o ângulo de incidência do laser em relação à amostra foi de 173° utilizando uma cubeta de quartzo de 12 mm<sup>2</sup>. A média ± desvio padrão (DP) foi avaliada. O potencial zeta de cada nanossistema foi realizado usando um Litesizer 500 (Anton Paar, Alemanha). As medidas foram realizadas a 20°C e o ângulo de incidência do laser em relação à amostra foi de 15°, utilizando uma cubeta em formato Omega. Todos os dados são uma média de 1000 execuções.

#### 2.4 Microscopia de força atômica (AFM)

A análise AFM foi realizada usando um microscópio Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara, CA). Duas análises principais foram realizadas na amostra (nanomicelas 127-Pluronic-HCQ-MTX): (1) morfologia e topografia das nanomicelas, comparando os tamanhos observados nas imagens AFM com os resultados DLS; (2) mapas nanomecânicos das micelas obtidos através da aquisição de aproximadamente 65.000 curvas de força sobre cada área de escaneamento. Para essas medições, foram utilizadas sondas Scanasyt Air, com constante de mola nominal de 0,4 N/m, porém, a constante de mola real de cada sonda foi calibrada pelo método de ruído térmico. Uma gota da solução de nanomicelas foi depositada em mica recém-clivada para formar o filme de nanomicelas. O modo de varredura utilizado foi o *Peak Force Tapping Quantitative Nanomechanics* (QNM), com resolução de 256 × 256 linhas por varredura e frequência de varredura de 0,5 Hz.

#### 2.5 Liberação de fármacos *in vitro*

Os perfis de liberação de fármacos das nanomicelas 127-Pluronic-HCQ-MTX foram estudados por um método de diálise bem estabelecido [15,16]. Resumidamente, 400 µL das nanomicelas foram colocados na bolsa de diálise (MWCO 12000–14000 Da). A bolsa de diálise foi suspensa e agitada em 30 mL de PBS contendo 0,1% de Tween 80 a 37 °C para simular a “condição de afundamento”. Foram coletados 300 µL do meio nos pontos de tempo programados ao longo de 24 h. A HCQ e o MTX liberados foram quantificados pelo leitor de microplacas nos comprimentos de onda de 340 nm e 310 nm, respectivamente.

## 2.6 Ensaio de osteoclastogênese

Monócitos foram isolados do sangue periférico de voluntários sadios por meio de centrifugação em gradiente de densidade. Resumidamente, o sangue foi coletado em tubos contendo o anticoagulante heparina, estratificado 1:1 no reagente Histopaque (Sigma Aldrich) e centrifugado durante 30 min a 400 RCF sem interrupção e aceleração. Após, as células foram lavadas duas vezes e semeadas, com densidade de  $2,4 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>, em atmosfera úmida controlada a 37°C 5% CO<sup>2</sup>. Após 3 h, o meio de cultura foi substituído por DMEM de alta glicose suplementado com 10% de FBS e 20 ng/mL de M-CSF para induzir a proliferação de monócitos.

Após 3 dias, as células foram tratadas com DMEM de alta glicose suplementado com 10% de FBS e 20 ng/mL de M-CSF e 30 ng/mL de RANK-L, com ou sem nanomicelas, com uma concentração de 20 µg/mL HCQ e 0,74 ng/mL MTX ou 70 µg/mL HCQ e 2,6 ng/mL MTX, respectivamente. O tratamento foi substituído a cada 3 dias durante 14 dias. As células seguintes foram fixadas e coradas com o kit de coloração TRAcP (Sigma Aldrich) e o número de osteoclastos (células multinucleadas positivas para TRAcP) foi quantificado.

## 2.7 Modelo de artrite reumatoide

### 2.7.1 Animais

Camundongos machos C57BL/6 (20–30 g) (n = 30) foram mantidos em um ciclo de 12 horas claro/escuro com temperatura controlada com comida e água *ad libitum*. O estudo animal foi conduzido de acordo com as diretrizes éticas da Associação Internacional para o Estudo da Dor e aprovado pelo Comissão de Ética de Uso de Animais (licença número CEUA LW-43/14).

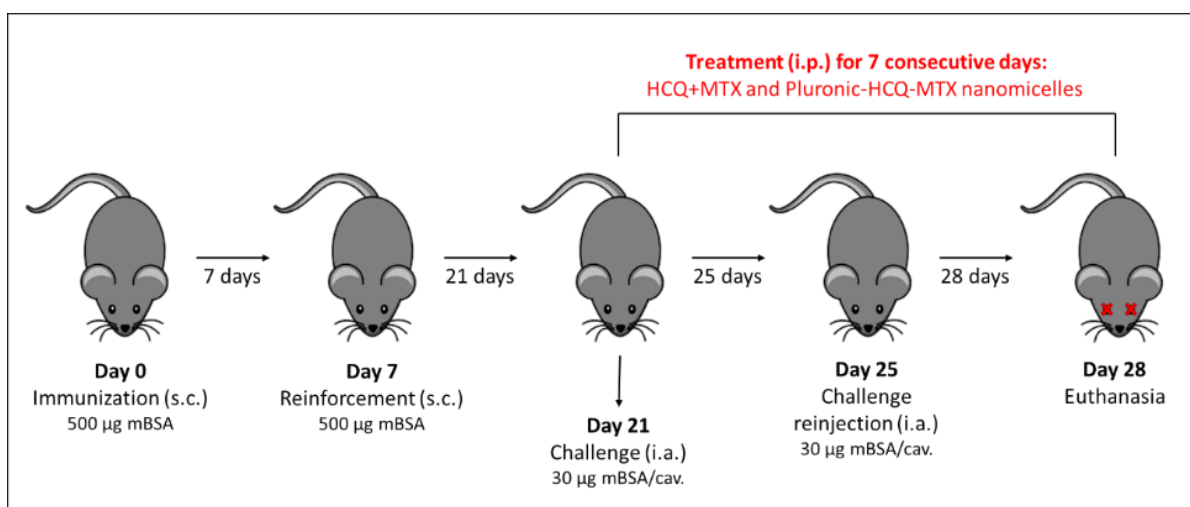
### 2.7.2 Avaliação do peso corporal

O peso corporal de todos os animais foi aferido por meio de balança no início e no final do tratamento.

### 2.7.3 Indução de artrite antigênica

Camundongos C57BL/6 foram imunizados por injeção subcutânea (s.c.) no dia 0 usando 500 µg de mBSA em 0,2 mL de uma emulsão contendo: 0,1 mL de solução salina e 0,1 mL de adjuvante completo de Freund. Os camundongos foram reforçados com a mesma solução no dia 07. Camundongos *sham* (falsamente imunizados) receberam injeções semelhantes no dia 0 e no dia 07, mas sem o antígeno (mBSA). No 21º dia após a injeção inicial, a artrite foi induzida nos animais imunizados por injeção intra-articular (i.a.) de mBSA (30 µg/cavidade; 25 µL). Os camundongos simulados receberam solução salina. A partir desse período, os animais foram tratados diariamente, por meio de injeções intraperitoneais (i.p., 100 µL/animal), por 7 dias, e no 25º dia foi realizada uma reinjeção com antígeno (30 µg/cavidade). No dia 28, os camundongos foram eutanasiados com excesso de anestésico (pentobarbital sódico 3% - Hypnol) para análises posteriores.

Esquema 1 – Representação esquemática do protocolo experimental de artrite induzida por antígeno.



#### 2.7.4 Grupos

O tratamento foi avaliado em 7 grupos experimentais, compostos por 5 animais (camundongos C57BL/6) em cada grupo. Os grupos foram divididos em: (1) falsa imunização: *sham*; (2) grupo controle: salina; (3) imunizados: mBSA; (4) grupo veículo: 127-Pluronic; (5) grupo de tratamento padrão: HCQ + MTX (2 mg/Kg e 1 mg/Kg, respectivamente); (6) grupo intervenção 1: nanomicelas 127-Pluronic-HCQ-MTX (2 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente); (7) grupo de intervenção 2: Nanomicelas 127-Pluronic-HCQ-MTX (1 mg/kg e 0,5 mg/kg, respectivamente).

#### 2.7.5 Tratamento

O tratamento padrão de HCQ + MTX (2 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente) foi administrado por via i.p. (100 µL/animal). Os animais do grupo de intervenção 1 foram administrados por via i.p. (100 µL/animal) com nanomicelas carregadas com HCQ + MTX na mesma dose do tratamento padrão (nanomicelas 127-Pluronic-HCQ-MTX, 2 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente), enquanto os animais do grupo intervenção 2 receberam via i.p. (100 µL/animal) com nanomicelas carregadas de HCQ + MTX na metade da dose do tratamento padrão (nanomicelas 127-Pluronic-HCQ-MTX, 1 mg/kg e 0,5 mg/kg, respectivamente).

Os animais do grupo controle (salina) e do grupo imunizado (mBSA) receberam 100 µL de solução salina estéril por via i.p. Os animais do grupo veículo foram administrados por via i.p. com 100 µL de Pluronic F127 10% solubilizado em solução salina estéril (Tabela 1).



Tabela 1 – Tratamentos administrados a diferentes grupos após indução de artrite experimental.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>
<b>Sham</b>	Salina estéril
<b>Salina</b>	Salina estéril
<b>mBSA</b>	Salina estéril
<b>Pluronic</b>	Pluronic 10%
<b>HCQ+MTX</b>	HCQ: 2 mg/kg + MTX: 1 mg/kg
<b>Pluronic-HCQ-MTX nanomicelas 1</b>	HCQ: 2 mg/kg + MTX: 1 mg/kg
<b>Pluronic-HCQ-MTX nanomicelas 2</b>	HCQ: 1 mg/kg + MTX: 0,5 mg/kg

### 2.7.6 Parâmetros

Todos os grupos foram eutanasiados com excesso de anestésico (pentobarbital sódico 3% Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japão). A espessura da articulação do joelho foi avaliada e expressa em milímetros (mm). As cavidades sinoviais do joelho foram lavadas com 300  $\mu$ L de PBS/EDTA (10 mM) e foram realizadas contagens de leucócitos (Coulter Z2, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EUA).

### 2.8 Atividade da proteína transportadora de efluxo (MRP1)

O efeito de nanomicelas (nanomicelas 127-Pluroni-HCQ-MTX) no efluxo de calceína-AM mediado por MRP1 foi verificado usando citometria de fluxo. Células MRP1 superexpressando HEK 293 foram preparadas em meio sem soro a uma densidade de  $7 \times 10^5$  células/mL e tratadas com várias concentrações (0,1%, 0,25%, 0,5% e 1%) de nanomicelas 127-Pluronic-HCQ-MTX para 10 minutos a 37°C. As células foram então tratadas com calceína-AM (0,25 $\mu$ M) por 30 min. A concentração final de DMSO foi mantida em menos de 1% (v/v). A atividade de efluxo mediada por MRP1 foi interrompida usando tampão PBS gelado (3 mL). As células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em

um tampão PBS frio contendo 1% de paraformaldeído. A fluorescência intracelular de calceína-AM foi detectada usando o citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA) com excitação e emissão a 480 nm e 533/30 nm, respectivamente. A intensidade fluorescente foi determinada como uma média de 10.000 eventos. Os tratamentos foram feitos em triplicata e repetidos em dois experimentos independentes.

## 2.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por meio do teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Newman-Keuls-Student ou Tukey para comparação entre mais de dois grupos. O teste “t” de Student foi usado para comparar dois grupos experimentais. Todos os testes foram realizados usando GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). Valores de p menores ou iguais ( $\leq$ ) a 0,05 foram considerados significativos (\*; +).

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Artigo principal (publicado)**

RHEUMATOID ARTHRITIS TREATMENT USING HYDROXYCHLOROQUINE AND  
METHOTREXATE CO-LOADED NANOMICELLES: *IN VIVO* RESULTS

**Taís Monteiro Magne, Edward Helal-Neto, Luana Barbosa Correa, Luciana Magalhães,  
Rebelo Alencar, Sara Gemini Piperni, Surtaj H. Iram, Prapanna Bhattarai, Lin Zhu,  
Eduardo Ricci-Junior, Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques, Elaine Cruz  
Rosas, Ralph Santos-Oliveira**

Submetido para: Colloids Surf B Biointerfaces

## **RHEUMATOID ARTHRITIS TREATMENT USING HYDROXYCHLOROQUINE AND METHOTREXATE CO-LOADED NANOMICELLES: *IN VIVO* RESULTS**

Tais Monteiro Magne<sup>a</sup>, Edward Helal-Neto<sup>a</sup>, Luana Barbosa Correa<sup>a,g,h</sup>, Luciana Magalhães Rebelo Alencar<sup>b</sup>, Sara Gemini Piperni<sup>c</sup>, Surtaj H. Iram<sup>d</sup>, Prapanna Bhattarai<sup>e</sup>, Lin Zhue, Eduardo Ricci-Junior<sup>f</sup>, Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques<sup>g,h</sup>, Elaine Cruz Rosas<sup>g,h</sup>, Ralph Santos-Oliveira<sup>a,i,\*</sup>

<sup>a</sup>Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals and Synthesis of Novel Radiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>b</sup>Federal University of Maranhão, Department of Physics, Maranhão, Brazil; <sup>c</sup>Unigranrio, Laboratory of Multidisciplinary Studies, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>d</sup>Department of Chemistry & Biochemistry, College of Natural Sciences, South Dakota State University, Brookings, 57007, SD, USA; <sup>e</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Irma Lerma Rangel College of Pharmacy, Texas A&M University, TX, USA; <sup>f</sup>Laboratory of Nanomedicine, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>g</sup>National Institute for Science and Technology on Innovation on Diseases of Neglected Populations (INCT/IDPN), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>h</sup>Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>i</sup>Zona Oeste State University, Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, Brazil.

**Keywords:** Nanotherapy; Rheumatoid arthritis treatment; Methotrexate; Hydroxychloroquine.

Corresponding author:

**Dr. Ralph Santos-Oliveira**/Associate Professor

Brazilian Nuclear Energy Commission

Nuclear Engineering Institute

Ilha do Fundão, Rua Helio de Almeida, 75, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail: roliveira@ien.gov.br (R. Santos-Oliveira).

## **ABSTRACT**

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common inflammatory rheumatic disease, affecting almost 1% of the world population. It is a long-lasting autoimmune disease, which mainly affects the joints causing inflammation and swelling of the synovial joint. RA has a significant impact on the ability to perform daily activities including simple work and household chores. Nonetheless, due to the long periods of pain and the continuous use of anti-inflammatory drugs, RA can debilitate the quality of life and increases mortality. Current therapeutic approaches to treat RA aim to achieve prolonged activity and early and persistent remission of the disease, with the gradual adoption of different drugs available. In this study, we developed a novel hydroxychloroquine and methotrexate co-loaded Pluronic® F-127 nanomicelle and evaluated its therapeutic effects against RA. Our results showed that drug-loaded nanomicelles were capable of modulating the inflammatory process of RA and reducing osteoclastogenesis, edema, and cell migration to the joint. Overall, compared to the free drugs, the drug-loaded nanomicelles showed a 2-fold higher therapeutic effect.

## 1 INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease of unknown etiology, characterized by a complex interaction between immune mediators (cytokines and effector cells) responsible for joint damage that begins in the synovial membrane [1]. The pathophysiology of RA is complex and involves the proliferation of synovial cells and fibrosis, formation of pannus, with erosion of cartilage and bone [2]. In the long term, the pathophysiological process of RA results in joint degradation associated with pain, stiffness, loss of function and systemic comorbidities, reducing life expectancy and quality of life [3,4].

Despite advances in recent decades regarding the pathophysiology of RA and the development of new target therapies, there is still a considerable need to develop more effective therapies since complete remission is not maintained without continuous treatment. Current therapies for RA are limited by low drug bioavailability, high drug clearance, and dose-limiting adverse effects [5]. A promising strategy is to increase the effectiveness of existing RA drugs through drug delivery systems, such as nanoparticles [1,6–9].

Nanomicelles are one of the most widely used nanoparticles to improve the blood circulation time, bioavailability, and specificity of various therapeutic agents. Therapeutic agents (properly loaded into the nanocarrier) can be selectively accumulated in the inflamed sites through passive or active targeting after systemic administration [5]. In this way, the damage to other organs is remarkably reduced. In addition, the nanocarriers can protect the encapsulated therapeutic agents against biodegradation and provide the sustained drug release, leading to the increased drug efficacy [1,5,10,11].

The College of Rheumatology and the European League Against Rheumatism (ACR / EULAR) recommend methotrexate (MTX) at the beginning of RA as (part of) the first treatment due to its favorable balance in efficacy, safety profile and costs [12,13]. When MTX is used as a single agent, the benefits are quickly realized, but tend to stabilize after about 6 months of treatment [14]. The literature shows that the combined use of MTX with other disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) makes therapy more effective. Among the combined therapies for the treatment of RA, the use of MTX with the antimalarial drug Hydroxychloroquine (MTX + HCQ) has been showing good results in clinic. However, studies on the effectiveness of the combined use of these drugs and the mechanisms of action were not investigated.

In this study, we prepared and characterized Pluronic® F-127 nanomicelles co-loaded with HCQ and MTX (127-Pluronic–HCQ–MTX) and evaluated *in vitro* and *in vivo* efficacy

against RA. We demonstrated that 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles loaded with 50 % of the recommended doses used in the clinic significantly reduced osteoclastogenesis, edema, and cell migration to the joint in the antigen-induced arthritis animal model. In addition, the 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles could improve the accumulation of HCQ and MTX in the cells by modulating MRP1.

## **2 METHODOLOGY**

### **2.1 Reagents**

Phosphate buffered saline (PBS), PBS/EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) (10 mM) freshly prepared solution, bovine serum albumin (BSA), methylated bovine serum albumin (mBSA), Freund's complete adjuvant, Histopaque reagent, Pluronic F127, TRAcP staining kit, DMEM high glucose, Bovine fetal serum, M-CSF, RANK-L, Doxorubicin, Poly-D-lysine, Glucose, HEPES, Calcium and Magnesium were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). MayGrünwald and Giemsa dyes were purchased from Merck (Germany). 3% sodium pentobarbital (Hypnol®) was purchased from Syntec (Brazil). Tevametho (injectable methotrexate 25 mg/mL) was purchased from Teva Farm-acêutica Ltda (Brazil) and Hydroxychloroquine was purchased from Sigma Aldrich.

### **2.2 Preparation of the nanomicelles**

A concentration of 0,3 mg/mL of hydroxychloroquine and 0,6 mg/mL of methotrexate were added in the micellar dispersion of Pluronic F127. The system was gently stirred using a magnetic bar (Magnetic Stirrer, IKA, C-MAG HS-7) and then processed for 5 min using an ultrasonic processor (UP100H, Hielscher, Power: 100%, Cycle: 1) under ice bath at 10 °C.

### **2.3 Particle size and zeta potential**

The particle size, size distribution, and polydispersity index (PDI) of nanosystem were determined by dynamic light scattering (DLS) using the equipment Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Measurements were performed in triplicate at 25 °C and the laser incidence angle in relation to the sample was 173° using a 12 mm<sup>2</sup> quartz cuvette. The mean ± standard deviation (SD) was assessed. The zeta potential from each nanosystem has been

performed using a Litesizer 500 (Anton Paar, Germany). Measurements were performed at 20 °C and the laser incidence angle in relation to sample was 15°, using an Omega shaped cuvette. All data is a mean of 1000 runs.

#### **2.4 Atomic force microscopy (AFM)**

The AFM analysis has been performed using a Multimode 8 microscope (Bruker, Santa Barbara, CA). Two main analyses have been conducted in the sample (127-Pluronic–HCQ-MTX-nanomicelles): First, the morphology and topography of the nanomicelles were analyzed, comparing the sizes observed in the AFM images with the DLS results. In addition, nanomechanics maps of the micelles were obtained by acquiring approximately 65,000 force curves over each scanning area. For these measurements, Scanasyt Air probes were used, with a nominal spring constant of 0.4 N/m, however, the actual spring constant of each probe was calibrated by the thermal noise method. A drop of the nanomicelles solution was deposited in freshly cleaved mica to form the nanomicelles film. The scanning mode used was Peak Force Tapping Quantitative Nanomechanics (QNM), with a resolution of  $256 \times 256$  lines per scan and scan frequency of 0.5 Hz.

#### **2.5 *In vitro* drug release**

The drug release profiles of the 127-Pluronic–HCQ-MTX-nanomicelles were studied by a well-established dialysis method [15,16]. Briefly, 400 µL of the nanomicelles were placed in the dialysis bag (MWCO 12000–14000 Da). The dialysis bag was suspended and stirred in 30 mL of PBS containing 0.1% Tween 80 at 37 °C to simulate the “sink condition”. 300 µL of the outside medium were collected at the scheduled time points over 24 h. The released HCQ and MTX were quantified by the microplate reader at the wavelengths of 340 nm and 310 nm, respectively.

#### **2.6 Osteoclastogenesis assay**

Cell isolation: monocytes were isolated from peripheral blood of volunteers through density gradient centrifugation. Briefly, blood is stratified 1:1 on Histopaque reagent (Sigma Aldrich) and centrifuged during 30 min at 400 RCF with no break and acceleration. After, cells were washed twice and seeded with density of  $2,4 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> 3 h in controlled humidified



atmosphere at 37 °C 5% CO<sup>2</sup>. After 3 h medium culture was replaced with DMEM high glucose supplemented with 10% bovine fetal serum and 20 ng/mL M-CSF during 3 days to induce monocyte proliferation. 127-Pluronic–HCQ-MTX-nanomicelles exposition: After 3 days cells were treated with in DMEM high glucose supplemented with 10 % bovine fetal serum and 20 ng/mL M-CSF and 30 ng/mL RANK-L with or without nanomicelles with a concentration of 20 µg/mL HCQ – 0.74 ng/mL MTX or 70 µg/mL HCQ – 2,6 ng/mL MTX nanomicelles respectively. Treatment was replaced each 3 days during 14 days. Following cells were fixed and stained with TRAcP kit staining (Sigma Aldrich) and numbers of osteoclasts (multinucleated TRAcP positive cells) were quantified.

## **2.7 Rheumatoid arthritis model**

### **2.7.1 Animals**

Male C57BL/6 mice (20–30 g) (n = 30) were maintained on a 12 h-light/dark cycle with controlled temperature with food and water ad libitum. The animal study was conducted in accordance with the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and approved by Animal Use Ethics Committee (license number CEUA LW-43/14).

### 2.7.2 Body weight assessment

The body weight of all animals in all groups of this study were evaluated and assessed. Thus, the animals were weighted in the beginning and end of the treatment.

### 2.7.3 Induction of antigen arthritis

C57BL/6 mice were immunized by subcutaneous injection (sc) on day 0 using 500 µg of methylated bovine serum albumin (mBSA) in 0.2 mL of an emulsion containing: 0.1 mL of saline and 0.1 mL of Freund's full adjuvant. The mice were boosted with the same solution on day 07. Sham mice (fake immunized) received similar injections on day 0 and day 07, but without the antigen (mBSA). On the 21 day after the initial injection, arthritis was induced in the immunized animals by intra-articular (i.a.) injection of mBSA (30 µg/cavity; 25 µL). The sham mice received saline. From that period, the animals were treated daily, through intraperitoneal injections (100 µL/animal), for 7 days, and on the 25 day a reinjection was

performed using antigen (30 µg/cavity). On day 28 mice were euthanized using excess of anesthetic (sodium pentobarbital 3% - Hypnol) for further analyzes.

#### 2.7.4 Groups

The treatment was evaluated in 7 experimental groups, composed of 5 animals (mice C57Bl/6) in each group. The groups were divided into: i) false immunized: sham; ii) control group: saline; iii) immunized: mBSA; iv) vehicle group: 127-Pluronic; v) standard treatment group: Hydroxychloroquine (HCQ) plus Methotrexate (MTX) (2 mg/kg and 1 mg/kg, respectively); vi) intervention group 1: 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles (2 mg/kg and 1 mg/kg, respectively); vii) intervention group 2: 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles (1 mg/kg and 0.5 mg/kg, respectively).

#### 2.7.5 Treatment

The standard treatment of HCQ plus MTX (2 mg/kg and 1 mg/kg, respectively) was administered intraperitoneally (i.p., 100 µL/animal). The animals in intervention group 1 were administered intraperitoneally (100 µL/animal) with nanomicelles loaded with HCQ and MTX at the same dose as the standard treatment (127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles, 2 mg/kg and 1 mg/kg, respectively), while the animals in intervention group 2 were administered intraperitoneally (100 µL/animal) with HCQ and MTX-loaded nanomicelles in the half dose of the standard treatment (127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles, 1 mg/kg and 0.5 mg/kg, respectively). The animals in the control group (saline) and in the immunized group (mBSA) were administered intraperitoneally with 100 µL of sterile saline. The animals in the vehicle group were intraperitoneally administered with 100 µL of Pluronic F127 10% solubilized in sterile saline (Table 1).

Tabela 1 – Treatments administered to different groups after induction of experimental arthritis.

<b>Group</b>	<b>Treatment</b>
<b>Sham</b>	Sterile saline
<b>Saline</b>	Sterile saline
<b>mBSA</b>	Sterile saline
<b>Pluronic</b>	Pluronic 10%
<b>HCQ+MTX</b>	HCQ: 2 mg/kg + MTX: 1 mg/kg
<b>Pluronic-HCQ-MTX nanomicelles 1</b>	HCQ: 2 mg/kg + MTX: 1 mg/kg
<b>Pluronic-HCQ-MTX nanomicelles 2</b>	HCQ: 1 mg/kg + MTX: 0,5 mg/kg

## 2.8 Parameters

All groups were euthanized using excess of anesthetic (sodium pentobarbital 3% Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Knee joint thickness were evaluated and expressed in millimeters (mm). The knee synovial cavities were washed out using 300  $\mu$ L of PBS/EDTA (10 mM) and leukocyte counts were performed (Coulter Z2, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Finally, using optical microscopy, smears of cytopsin (Cytospin 3, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) from cells previously stained by the May-Grunwald-Giemsa method were differentially counted and reported as numbers of cells per cavity ( $\times 10^5$ ).

## **2.9 MRP1 efflux transporter protein activity**

Efflux transport activity of MRP1 was measured using doxorubicin accumulation assay. This assay was performed using confocal microscopy. Sterilized cover glasses were placed in 6-well plate and covered with 0.1 mg/mL of poly-D-lysine for 10 min prior to washing with phosphate buffered saline (PBS). HEK293 T cells were plated on poly-D-lysine-coated cover glass at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well in 2 mL culture medium. Cells were transiently transfected with 2  $\mu$ g of an MRP1-GFP expression vector after 24 h using 4  $\mu$ g of jet PRIME Transfection Reagent with 200  $\mu$ L of Transfection buffer (Polyplus-transfection SA, Illkirch, France). After 48 h, cells were pre-treated with 0.1% w/v, 0.25% w/v, 0.5% w/v and 1% w/v

of 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles for 30 min, before incubation with doxorubicin (10  $\mu\text{M}$ ) for 1 h. Cells were maintained in buffer (4.5% glucose, 10 mM HEPES, PBS containing  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ) as intracellular fluorescence was visualized using an iMIC digital microscope (TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, Germany) equipped with a 1.35 numerical aperture 60x oil-immersion objective. Excitation was done at 488 nm for GFP and doxorubicin, with emission bands of 475/42 and 605/64 nm, respectively. Images were processed using ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

## **2.10 Flow cytometry-based Calcein-AM accumulation assay**

The effect of nanomicelle (127-Pluroni–HCQ-MTX nanomicelles) on MRP1 mediated efflux of calcein-AM was ascertained using flow cytometry. HEK 293 overexpressing MRP1 cells were prepared in serum-free medium at a density of  $7 \times 10^5$  cells/mL and treated with various concentrations (0.1%, 0.25%, 0.5% and 1%) of 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelle for 10 min at 37 °C. Cells were then treated with calcein-AM (0.25 $\mu\text{M}$ ) for 30 min. Final DMSO concentration was maintained at less than 1% (v/v). MRP1 mediated efflux activity was stopped using ice-cold PBS buffer (3 mL). Cells were collected, washed twice with PBS, and re-suspended in a cold PBS buffer containing 1% paraformaldehyde. Intracellular calcein-AM fluorescence was detected using BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) with excitation and emission at 480 nm and 533/30 nm respectively. Fluorescent intensity was determined as a mean of 10,000 events. Treatments were done in triplicates and repeated in two independent experiments.

## **2.11 Statistical analysis**

The results were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (EPM) and analyzed statistically through the analysis of variance test (ANOVA), followed by the Newman-Keuls-Student or Tukey test for comparison between more than two groups. Student's "t" test was used to compare two experimental groups. All tests were performed using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). P values less than or equal ( $\leq$ ) to 0.05 were considered significant (\*; +).

### 3 RESULTS

#### 3.1 Average size determination by dynamic light scattering and zeta potential

The hydrodynamic diameter of the nanosystem was 48,323 nm (SD 4842 nm). The PDI value was 0,256 (SD 196) and zeta potential was 059 mV (SD 008 mV). The PDI value of the nanomicelle is very near of the limit of a monodispersive behavior PDI (0,3). However, for pharmaceutical purposes we assumed the limit of 0.3 and for that reason the nanomicelle showed a monodispersive behavior. The zeta potential analysis showed a mean zeta potential of 059 mV, with a conductivity of 391 mS/cm and electrophoretic mobility of 005  $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{Vs}$  (Table 2).

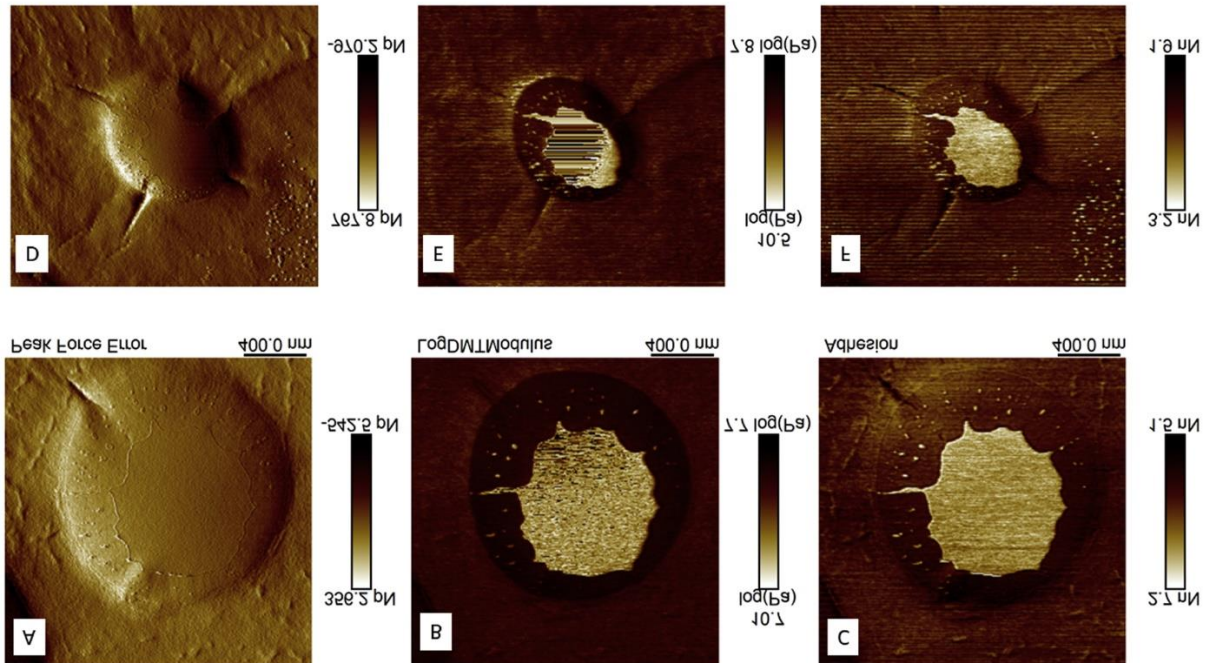
Tabela 2 – Values referring to the average size by dynamic light scattering and zeta potential of the nanomicelles loaded with HCQ plus MTX.

Parameter	Value
<b>Hydrodynamic diameter</b>	48,323 nm (SD 4,842 nm)
<b>PDI</b>	0,256 (SD 196)
<b>Zeta potential</b>	0,59 mV (SD 0,08 mV)
<b>Conductivity</b>	3,91 mS/cm (SD 0,09 mS/cm)
<b>Electrophoretic mobility</b>	0,05 $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{Vs}$ (SD 0,01 $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{Vs}$ )

#### 3.2 Atomic force microscopy maps

The Fig. 1 shows the results of topography (peak force error - Fig. 1a and d), Young's modulus (Fig. 1b and e) and adhesion (Fig. 1c and f). Topographic images reveal micelles with diameters of 1.41  $\mu\text{m}$  and 1.06  $\mu\text{m}$ , respectively. The Young's modulus maps show two very distinct elastic characteristics: in the center of the micelle, a region with greater Young's modulus (lighter region), and around that region, a shell with a lower E value, indicating composite materials, in this case, the drug core and the polymeric shell (127-Pluronic). The adhesion images show the same characteristic of heterogeneous material, in this case, the core

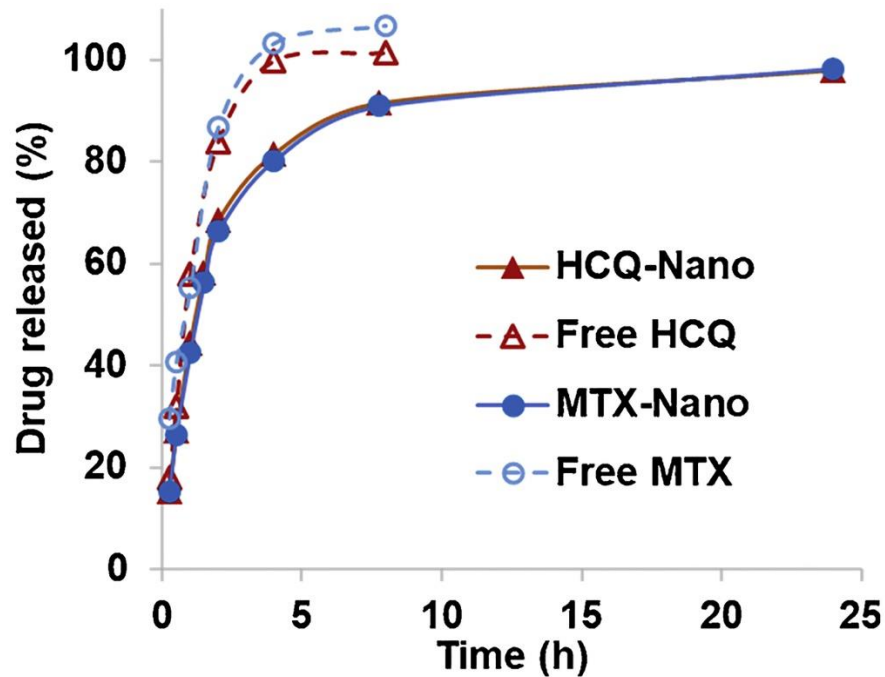
has higher adhesion force values, and the polymer has lower adhesion values. This is interesting because loaded micelles have a greater adhesion strength, improving adhesion in the drug delivery target.



**Fig. 1.** Topography images (Peak Force Error – Figures A and D), Young's modulus maps (Figures B and E) and adhesion force maps (Figures C and F) of individual 127-Pluronic-HCQ-MTX-nanomicelles.

### 3.3 *In vitro* drug release

The *in vitro* drug release profile is showed in Fig. 2.

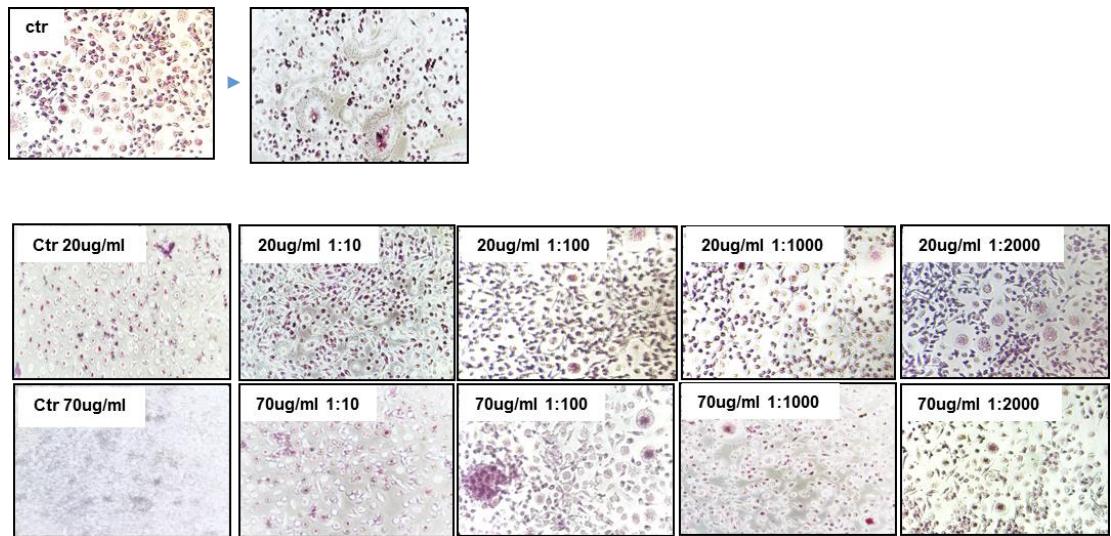


**Fig. 2.** *In vitro* accumulative drug release from the Pluronic–HCQ–MTX–nanomicelles. The samples were dialyzed (MWCO 12,000–14,000 Da) against PBS containing 0.1% Tween 80 at 37°C, to simulate the “sink condition”.

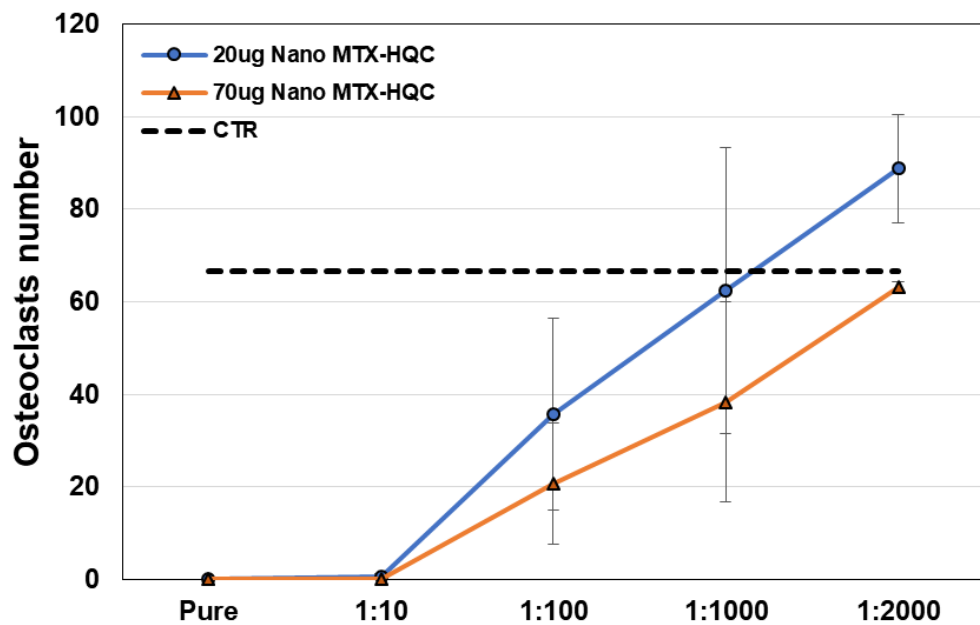
#### 4.4 Osteoclastogenesis assay

In this study, osteoclastogenesis assay was conducted exposing monocyte from human peripheral blood to nanomicelles formed by combination of Methotrexate and Hydroxychloroquine (127-Pluronic–HCQ–MTX nanomicelles) in two different concentrations, 20 ug/mL HCQ with 074 ng/mL MTX and 70 ug/mL HCQ with 2,6 ng/mL MTX. Four nanomicelles dilutions were tested (1:10, 1:100, 1:1000 and 1:2000) with the purpose of studying the more effective concentration to use in RA treatment. Our results showed a dose dependent decrease of osteoclastogenesis in both concentrations tested compared to control (Fig. 3 A and B).

A



B



**Fig. 3.** Evaluation of osteoclastogenesis after *in vitro* treatment with HCQ + MTX-loaded nanomicelles in two concentrations: 20 ug/mL HCQ + 0.74 ng/mL MTX and 70 ug/mL HCQ + 2.6 ng/mL MTX), in different dilutions. 3B: Representative graph of the number of osteoclasts after *in vitro* treatment with HCQ + MTX-loaded nanomicelles in two concentrations: 20 ug/mL HCQ + 0.74 ng/mL MTX and 70 ug/mL HCQ + 2.6 ng/mL MTX), in different dilutions.



#### 4.5 MRP1 efflux transporter protein activity

Our results showed approximately 40–50% MRP1 inhibition, meaning the nanomicelle can improve the drug accumulation in the cell further supporting our overall findings. We tested four different concentrations (0.1%, 0.25%, 0.5% and 1%) and interestingly 0.1% (the lowest of the tested concentrations) produced the highest MRP1 inhibition (Fig. 4).

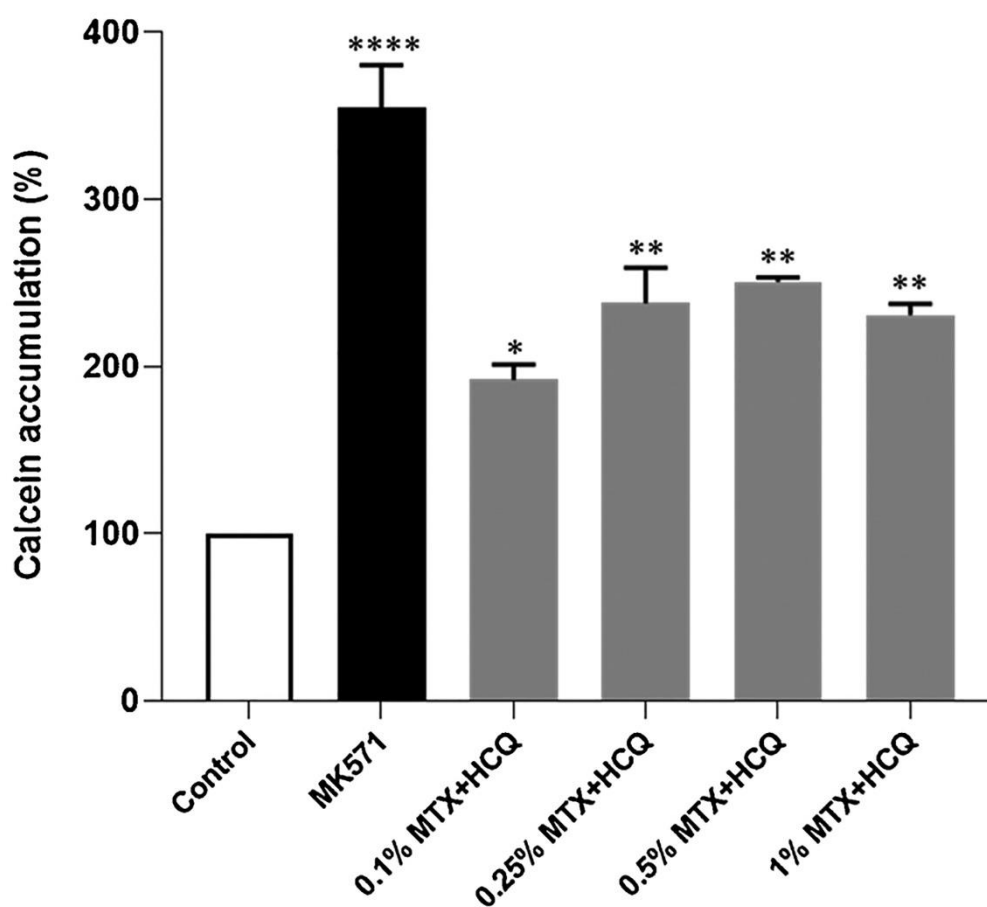


Fig. 4. Effect of 127-Pluronic–HCQ–MTX Nanomicelle on MRP1 mediated efflux activity. HEK293/MRP1 cells were treated with various concentration (0.1%, 0.25%, 0.5% and 1% all % w/v) of the test compound, and 50 $\mu$ M of MK571 (positive control) for 10 min at 37 °C before treatment with 0.25  $\mu$ M calcein-AM for 30 min. Flow cytometric measurements of intracellular calcein-AM was conducted at 488 nm and 533/30 nm for excitation and emission wavelengths, respectively. Experiments were done as triplicates in two independent experiments and presented as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001 compared to control.

## 4.6 Rheumatoid arthritis model

### 4.6.1 Body weight assessment

In order to make sure that the treatment under study does not change body weight, the animals were weighed at the beginning and at the end of the treatment. As seen in Fig. 5, treatments with HCQ + MTX, 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles 1 and 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles 2 did not promote weight loss (Fig. 5A).

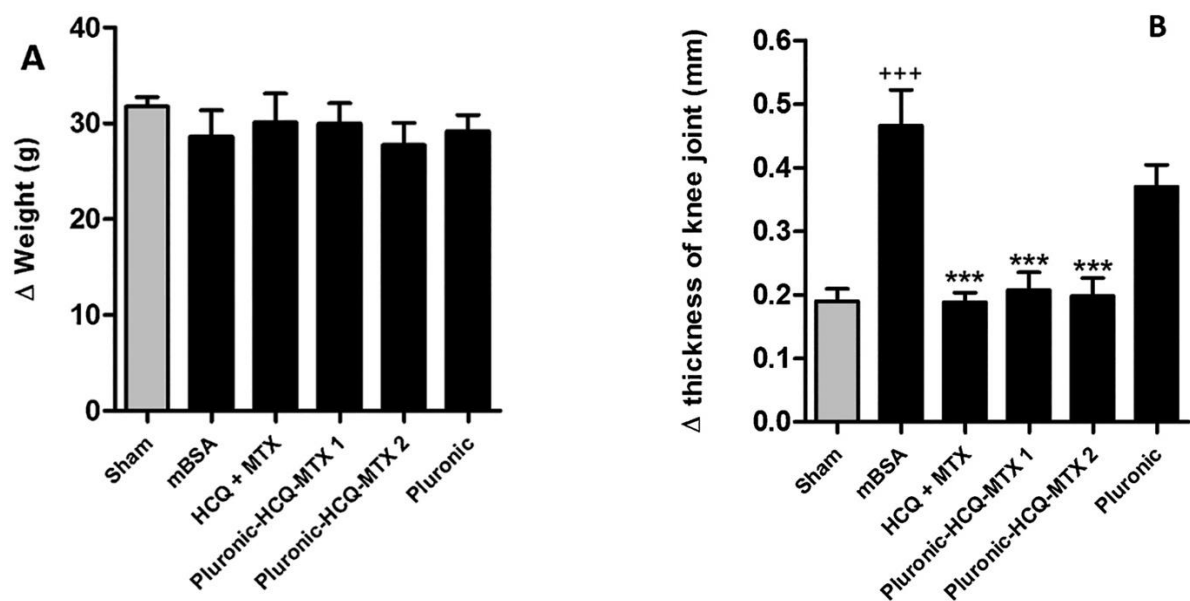


Fig. 5. A: Body weight assessment. Twenty-one days after antigen induction of RA, the animals were treated daily with HCQ + MTX, 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles 1 or 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles 2 via i.p. for seven days. The animals in the control group (sham) and in the immunized group (mBSA) were administered intraperitoneally with sterile saline. The animals in the vehicle group were administered intraperitoneally with Pluronic 10%. The results are presented as the mean of the differences between pre-treatment and post-treatment weight ( $\Delta$ )  $\pm$  SEM of five mice per group. 5B:127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles reduces antigen-induced edema. Knee joint edema was assessed by measuring the transverse diameter of the femur-tibial joint with the aid of a digital caliper (Digimatic caliper, Mitutoyo Corp. Kanagawa, Japan). The edema values were expressed by the difference ( $\Delta$ ) between the diameters measured before (baseline) and after  $\pm$  SEM treatment and were represented in millimeters (mm). +++  $p < 0.001$  compared to sham group; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to mBSA group.

### 4.6.2 Antigen-Induced Arthritis (AIA)

In the antigen-induced arthritis (AIA) model, mice were previously immunized and challenged with mBSA via i.a. The antigen injected i.a. binds to cartilage and activates the local immune response, causing edema and progressive synovitis. In the present study, after RA induction and intraperitoneal treatment, the measurements of the transverse diameter of the femur-tibial joint of the animals were evaluated. The results obtained demonstrate that the challenge with mBSA induced a strong joint edema in animals previously immunized and untreated (mBSA) compared to the group of false-immunized (sham). The animals treated with HCQ + MTX, 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles 1 and 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles 2 for seven days showed significant inhibition of the formation of joint edema induced by the antigen compared to the mBSA group. In addition, animals administered with a vehicle (Pluronic) did not show a significant reduction in edema compared to the mBSA group (Fig. 5B).

#### 4.6.3 Analysis of the influx of cells to the joint and number of circulating leukocytes

The activation of the local immune response due to the binding of the antigen to the cartilage, promotes increased vascular permeability and cell migration. We observed that animals immunized and challenged with mBSA (mBSA group) showed a significant increase in the number of leukocytes in the synovial cavity compared to the control group (saline). The animals treated with HCQ + MTX, 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles 1 and 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles 2 showed significant inhibition of cell migration to the joint cavity. It was also observed that the administration of mBSA in false immunized animals (sham) was not able to promote a significant migration of cells to the joint cavity and that the administration of the vehicle (pluronic) was not able to significantly reduce the number of leukocytes in the synovial cavity compared to the mBSA group (Fig. 6A). However, as shown in Fig. 6B, AR induction by antigen and treatments did not change the number of total circulating leukocytes.

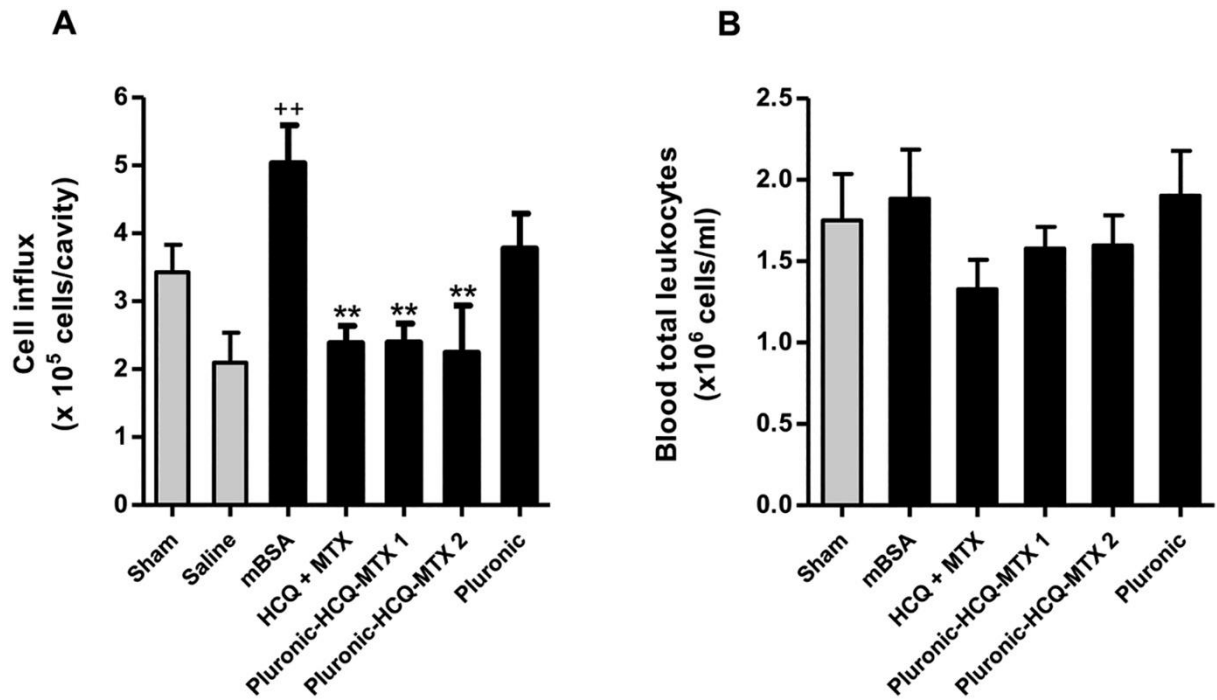


Fig. 6. 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles inhibits inflow of cells into the joint cavity. (A) The number of leukocytes present in the femurtibial joint was assessed by counting the total number of leukocytes present in the synovial lavage and the analysis performed using an automatic microparticle counter (Z1; Beckman-Coulter, USA). The results were presented as number of cells  $\times 10^5 \pm \text{SEM}$ . ++  $p < 0.01$  compared to saline group. \*\*  $p < 0.01$  compared to mBSA group. (B) The number of total circulating leukocytes was evaluated in the blood supernatant after centrifugation and the analysis was carried out using the automatic microparticle counter. The results were presented as number of cells  $\times 10^6 \pm \text{SEM}$ .

## 5 Discussion

The size of 48,323 nm is the expected range. For instance, Rollet et al. [17] used folic acid-functionalized nanocapsules with a size range of 443 nm for the treatment of RA, with success. The size of micellar nanosystems can vary substantially. For instance, Zhang et al. [18] developed Pluronic F127 nanomicelles with sizes varying from 45 and 160 nm. Additionally, Zhang et al. [19] developed nanomicelles using Pluronic F68 with a size of  $94.38 \pm 2.68$  nm. Chen et al. [20] developed Pluronic P123 nanomicelles with size lower than 200 nm. Finally, Ahmad et al. [21] stated that nanomicelles can be formed of particles with size varying from 10 nm to 200 nm.

Also, is important to consider that Pluronic nanomicelles, developed in this study were prepared at lower temperatures. Recent advances in nanomicelle delivery systems have observed that pluronic F127 nanomicelles can increase in size according to the physical

properties of the medium, such as pH and temperature [22]. Basak et al. [23] demonstrated that the hydrodynamic radii of nanomicelles increase with decreasing temperature. According to the authors, the increase in micellar sizes due to the decrease in temperature is accompanied by an increase in the hydration of the micellar core, while the increase in temperature results in more compact micelles by excluding the solvent from the micellar core due to the hydrophobic characteristics of the core.

Regarding the entrapment efficacy, we assumed a 100 % encapsulation since we have used the bulk of nanomicelle without any further treatment [24–27]. It is important to notice however, that several techniques can be used to purify as dry the solely nanomicelle as a powder ready-to-use. For example: Masoumi et al. [28]; Arbain et al. [29]; Feng et al. [30] and Jyotshna et al. [31], centrifuged the nanomicelle in order to obtain the powder. On the other hand, several studies have used the bulk of nanomicelle, considering the encapsulation as 100 %. For instance, Carvalho et al. [24], Raval et al. [25], Meng et al. [26] and Jaiswal et al. [27] assumed that nanomicelles have 100 % of encapsulation, when the nanomicelle in solution without any further step, as a bulk. Finally, it is important to notice that nanomicellar dispersions are kinetically stable and homogeneous and there is a technical limitation to separate the nanomicelles from aqueous external medium or dispersing medium. Regarding the PDI, according to Danaei et al. [32] demonstrated that a dispersion with polydispersity index (PDI) value varying from 0.1 to 0.5, for pharmaceutical products, may be considered a monodisperse system. Also, according to Han and Jiang [33] a PDI value higher than 0.1 but lower than 0.3, can be defined as monodisperse. Thus, we considered a monodisperse nanosystem. The nanoparticle presented a zeta potential of 059 mV. According to Frohlich [34] the charge is essential for the nanosystem penetration. Positively charged nanosystems seem to have a facilitate traffic into the cell while negatively charged nanosystem shows a more difficult cell-trafficking. Thus, the charge seems adequate for the purposed use of the nanosystem developed.

The 127-Pluronic nanomicelles (127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles) prolonged the release of both HCQ and MTX, compared to the free drugs. The results corroborated the functionality of pluronic nanomicelles as controlled release nanosystems for drug delivery [35–39]. The Pluronic–HCQ-MTX-nanomicelles showed the initial “burst drug” release, probably due to the untrapped drugs in the micelle suspension [40].

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease defined by bone and cartilage degradation, caused by a continuous inflammation of the synovium, which leads to the

swelling of the joints. Depending on the gravity of this disease, it may evolve and develop cardiovascular, skeletal and pulmonary disorders [41].

Our results show a reduction in osteoclasts formation directly proportional with Methotrexate-Hydroxychloroquine nanomicelle concentration. Concentration of 20 ug/mL HCQ with 074 ng/mL MTX and 70 ug/mL HCQ with 2,6 ng/mL MTX. And its dilution of 1:10 didn't allow the formation of osteoclasts at all, while following dilution of 1:100, 1:1000 and 1:2000 showed a dose response reduction in osteoclasts number. This supposedly will prevent this cell to degrade the bone tissue, providing a delay in RA evolution.

Methotrexate is considered a first line drug used for treating this disease, being used in adults, children or elderly patients, having its dose balanced according to the age, weight and particularities of each individual [41]. It was developed by Yellapregada Subbarao for the treatment of cancer, being used since 1947 [41] at high doses for leukemia, from 15 to 30 mg. Years later, it was found that when prescribed in lower doses, from 7,5 to 10 mg, it was efficient in patients with Rheumatoid Arthritis [42]. It is usually prescribed in an early diagnosis, but according to published papers, the effects of this medication should be supervised because the optimal dose of 25 mg [43], may cause some severe side effects in some patients such as hair loss, hepatotoxicity and nausea [44]. For a dual therapy, Methotrexate is often combined with some biological agents that work as second-line drugs, such as tumor necrosis factor inhibitors.

Literatures show that Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARDs) are more effective than the Methotrexate when used alone, despite this medication still being largely used by many rheumatologists [45]. Hydroxychloroquine is an antimalarial drug that was accidentally found to be effective against rheumatic diseases. Despite not undergoing the conventional method of drug development, it has become a common treatment for various diseases, one of them being RA [46]. However, more recent studies have explored the combination of Methotrexate with Hydroxychloroquine (MTX + HCQ), which have proven to be more effective than a monotherapy by Methotrexate alone. There's a lack of studies being carried about the efficiency of this mix of medications and to elucidate its mechanism of action. However, a study showed that 25 mg/week MTX, plus HCQ 400 mg/day, reaching maximum dose within 4–8 weeks improved RA prognostics in human patients [47]. Our results showed how a significant lower dose *in vitro* is sufficient to inhibit osteoclastogenesis, when the two drugs are combined in nanomicelle. These results open new prospective to reduce drugs concentration with this new nanomicelle formulation, enhancing curative efficiency with lower rate adverse effects.

Interestingly, we observed that the lowest of the tested concentrations of 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles (0.1 %) was the one that promoted the greatest inhibition of protein 1 related to multiple drug resistance (MRP)-1. MRP-1 is a well-established member of the super-family of ATP Binding Cassette (ABC) transporters that function as efflux pumps responsible for the MDR (multidrug resistance) phenotype [48]. According to their broad substrate specificity, these carriers can interfere with the absorption and distribution of many therapeutic agents, influencing serum concentration and changing the efficiency of different treatments.

MTX enters cells through the reduced folate transporter (RFC) and is effluxed by several transmembrane proteins, including MRPs [49]. It is hypothesized that the overexpression of these transporters may be a cause of suboptimal response to MTX, since the clinical efficacy depends, in part, on the intracellular retention of the drug. From the results obtained, we believe that this new formulation of 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles, in addition to enabling the reduction of the treatment dose, may also favor the inhibition of drug resistance mechanisms, via inhibition of MRP-1, increasing efficiency therapy.

Considering the complexity of the pathophysiological process of RA, we investigated the effects of 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles in an *in vivo* model of antigen-induced arthritis (AIA). The experimental model consists of immunizing mice with mBSA in potent adjuvants, followed by intra-articular injection of mBSA in saline. First, we investigated the effect of 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles on the animals' body weight, since studies indicate that anti-rheumatic treatments promote unwanted weight loss [50,51]. The results obtained demonstrate that the mice with induced arthritis and treated for seven days with nanomicelles loaded with HCQ and MTX did not present a reduction in body weight in the evaluated concentrations.

Then, we evaluated the effects of 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles on the inflammatory process of induced arthritis. AIA is a well-established and reproducible model that exhibits several characteristics similar to those seen in human RA, including edema and infiltration of immune cells into the joint [52]. The regulation of factors such as vascular permeability and cell migration in the rheumatic process is extremely important, as persistent inflammation in the joint cavity leads to the formation of pannus, along with erosion of cartilage and bone [2].

We demonstrated that nanomicelles loaded with MTX + HCQ (127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles) are able to reduce the inflammatory process present in induced arthritis, significantly inhibiting edema and the influx of cells to the joint. The most interesting finding

is that nanomicelles loaded with 50 % of the reference dose used in the clinic promoted the same inhibitory effects. From these results, we propose that the new formulation of MTX + HCQ in nanomicelles has similar effects to therapy with free MTX + HCQ, with the possibility of significantly reducing the dose used. It is worth mentioning that the treatment with 127-Pluronic–HCQ-MTX nanomicelles did not change the number of total circulating leukocytes, suggesting that its effects are local.

In addition to local effects, uncontrolled inflammation can lead to increased immune cells in the circulation [53]. These activated immune cells determine inflammatory mediators, including chemokines and cytokines, which further induce immune cell activation and proliferation and a subsequent synthesis of more inflammatory mediators that cause various inflammatory responses in target cells and tissues. In RA, this persistent inflammatory signaling perpetuates disease progression [54].

## 6 Conclusion

Our data showed the potential use of 127-Pluronic nanomicelles composed of HCQ and MTX for the treatment of RA. The results corroborated the drug release profile as a dose-response behavior. Also, the results showed that lower doses of the nanosystem showed superior anti-inflammatory results than the traditional HCQ and MTX associated as current drug, corroborating the higher efficacy of the nanosystem. Finally, the data showed a higher inhibition on MPR1 substrate avoiding drug resistance mechanism and improving the use for longer time of the nanomicelle when compared with the current treatment.

## Acknowledgments

The work was partially supported by the National Cancer Institute of the National Institutes of Health (R15CA213103) and Texas A&M University T3 grant (247099) to Dr. Lin Zhu. Also, the work received financial support from CNPq (301069/2018-2), FAPERJ (Rede Nano-Saude) and CAPES (PROEXT-PPGB-UERJ) to Dr Ralph Santos-Oliveira. To FAPERJ for Research Support to Luana Barbosa Correa (E-26/201.946/2020).

## CRediT authorship contribution statement:

Tais Monteiro Magne: Conceptualization, Methodology, formal analysis. Edward Helal-Neto: methodology, validation, formal analysis. Luana Barbosa Correa: formal analysis, validation. Luciana Magalhães Rebelo Alencar: formal analysis, investigation. Sara Gemini Piperni: Methodology, formal analysis, writing and review.



Surtaj H Iram: Methodology, formal analysis, writing and review, data curation. Prapanna Bhattarai: methodology, validation, formal analysis. Lin Zhu: Methodology formal analysis, investigation, supervision, project administration, funding acquisition and write. Eduardo Ricci-Junior: Methodology, validation. Maria Das Graças Muller de Oliveira Henriques: methodology, validation, formal analysis. Elaine Cruz Rosas: investigation, resources, validation and conceptualization. Ralph Santos-Oliveira: Conceptualization, Methodology formal analysis, investigation, supervision, project administration, funding acquisition, write and review.

## REFERENCES

- [1] Nogueira E, Gomes AC, Preto A, Cavaco-Paulo A, Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy, *Nanomed. Nanotechnol., Biol. Med* 12 (2016) 1113–1126, 10.1016/j.nano.2015.12.365.
- [2] Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS, Experimental animal models for rheumatoid arthritis, *Immunopharmacol. Immunotoxicol* 40 (2018) 193–200, 10.1080/08923973.2018.1434793.
- [3] Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, Kavanaugh A, McInnes IB, Solomon DH, Strand V, Yamamoto K, Rheumatoid arthritis, *Nat Rev Dis Prim.* 4 (2018) 18001, 10.1038/nrdp.2018.1
- [4] He Y, Xin Y, Rosas EC, Alencar LMR, Santos-Oliveira R, Peng X, Yu H, Fu J, Zhang W, Engineered high-loaded mixed-monoclonal antibodies (adalimumab, rituximab and trastuzumab) polymeric nanoparticle for rheumatoid arthritis treatment: a proof of concept, *J. Biomed. Nanotechnol* 16 (2021) 1254–1266, 10.1166/jbn.2020.2966.
- [5] Silvagni E, Di Battista M, Bonifacio AF, Zucchi D, Governato G, Scirè CA, One year in review 2019: novelties in the treatment of rheumatoid arthritis, *Clin. Exp. Rheumatol* 37 (2019) 519–534 (Accessed June 9, 2021), <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28956527/>.
- [6] Chuang SY, Lin CH, Huang TH, Fang JY, Lipid-based nanoparticles as a potential delivery approach in the treatment of rheumatoid arthritis, *Nanomaterials.* 8 (2018), 10.3390/nano8010042.
- [7] Lorscheider M, Tsapis N, ur-Rehman M, Gaudin F, Stolfa I, Abreu S, Mura S, Chaminade P, Espeli M, Fattal E, Dexamethasone palmitate nanoparticles: an efficient treatment for rheumatoid arthritis, *J. Control. Release* 296 (2019) 179–189, 10.1016/j.jconrel.2019.01.015.
- [8] Ni R, Song G, Fu X, Song R, Li L, Pu W, Gao J, Hu J, Liu Q, He F, Zhang D, Huang G, Reactive oxygen species-responsive dexamethasone-loaded nanoparticles for targeted

treatment of rheumatoid arthritis via suppressing the iRhom2/TNF- $\alpha$ /BAFF signaling pathway, *Biomaterials*. 232 (2020), 10.1016/j.biomaterials.2019.119730.

[9] Moia VM, Leal Portilho F, Almeida Pádua T, Barbosa Corrêa L, Ricci-Junior E, Cruz Rosas E, Magalhaes Rebelo Alencar L, Savio Mendes Sinfronio F, Sampson A, Hussain Iram S, Alexis F, de OliveiraHenriques MD, Santos-Oliveira R, Lycopene used as anti-inflammatory nanodrug for the treatment of rheumatoid arthritis: animal assay, pharmacokinetics, ABC transporter and tissue deposition, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 188 (2020), 10.1016/j.colsurfb.2020.110814.

[10] dos Santos Matos AP, Lopes DCDXP, Peixoto MLH, da Silva Cardoso V, Vermelho AB, Santos-Oliveira R, Viçosa AL, Holandino C, Ricci-Júnior E, Development, characterization, and anti-leishmanial activity of topical amphotericin B nanoemulsions, *Drug Deliv. Transl. Res* 10 (2020) 1552–1570, 10.1007/s13346-020-00821-5.

[11] Schuenck-Rodrigues RA, de Oliveira de Siqueira LB, dos Santos Matos AP, da Costa SP, da Silva Cardoso V, Vermelho AB, Colombo APV, Oliveira CA, Santos-Oliveira R, Ricci-Júnior E, Development, characterization and photobiological activity of nanoemulsion containing zinc phthalocyanine for oral infections treatment, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol* 211 (2020), 112010, 10.1016/j.jphotobiol.2020.112010.

[12] Singh JA, Saag KG, Bridges SL, Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, Vaysbrot E, McNaughton C, Osani M, Shmerling RH, Curtis JR, Furst DE, Parks D, Kavanaugh A, O'Dell J, King C, Leong A, Matteson EL, Schousboe JT, Drevlow B, Ginsberg S, Grober J, St Clair EW, Tindall E, Miller AS, McAlindon T, American college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheumatol.* 68 (2016) (2015) 1–26, 10.1002/art.39480.

[13] Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, McInnes IB, Sepriano A, Van Vollenhoven RF, De Wit M, Aletaha D, Aringer M, Askling J, Balsa A, Boers M, Den Broeder AA, Buch MH, Buttgerit F, Caporali R, Cardiel MH, De Cock D, Codreanu C, Cutolo M, Edwards CJ, Van Eijk-Hustings Y, Emery P, Finckh A, Gossec L, Gottenberg JE, Hetland ML, Huizinga TWJ, Koloumas M, Li Z, Mariette X, Müller-Ladner U, Mysler EF, Da Silva JAP, Poór G, Pope JE, Rubbert-Roth A, Ruysse-Witrand A, Saag KG, Strangfeld A, Takeuchi T, Voshaar M, Westhovens R, Van Der Heijde D, EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update, *Ann. Rheum. Dis* 79 (2020) S685–S699, 10.1136/annrheumdis-2019-216655.

- [14] Carmichael SJ, Beal J, Day RO, Tett SE, Combination therapy with methotrexate and hydroxychloroquine for rheumatoid arthritis increases exposure to methotrexate, *J. Rheumatol* 29 (2002) 2077–2083 (Accessed June 9, 2021), <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12375315/>.
- [15] Yao Q, Choi JH, Dai Z, Wang J, Kim D, Tang X, Zhu L, Improving tumor specificity and anticancer activity of dasatinib by dual-targeted polymeric micelles, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 36642–36654, 10.1021/acsami.7b12233.
- [16] Yao Q, Liu Y, Kou L, Tu Y, Tang X, Zhu L, Tumor-targeted drug delivery and sensitization by MMP2-responsive polymeric micelles, *Nanomed. Nanotechnol., Biol. Med* 19 (2019) 71–80, 10.1016/j.nano.2019.03.012.
- [17] Rollett A, Reiter T, Nogueira P, Cardinale M, Loureiro A, Gomes A, Cavaco-Paulo A, Moreira A, Carmo AM, Guebitz GM, Folic acid-functionalized human serum albumin nanocapsules for targeted drug delivery to chronically activated macrophages, *Int. J. Pharm* 427 (2012) 460–466, 10.1016/j.ijpharm.2012.02.028.
- [18] Zhang Y, Song W, Geng J, Chitgupi U, Unsal H, Federizon J, Rzayev J, Sukumaran DK, Alexandridis P, Lovell JF, Therapeutic surfactant-stripped frozen micelles, *Nat. Commun* 7 (2016) 1–9, 10.1038/ncomms11649.
- [19] Zhang J, Fang X, Li Z, Chan HF, Lin ZX, Wang Y, Chen M, Redox-sensitive micelles composed of disulfide-linked pluronic-linoleic acid for enhanced anticancer efficiency of brusatol, *Int. J. Nanomedicine* 13 (2018) 939–956, 10.2147/IJN.S130696.
- [20] Chen LC, Chen YC, Su CY, Wong WP, Sheu MT, Ho HO, Development and characterization of lecithin-based self-assembling mixed polymeric micellar (saMPMs) drug delivery systems for curcumin, *Sci. Rep* 6 (2016) 1–11, 10.1038/srep37122.
- [21] Ahmad Z, Shah A, Siddiq M, Kraatz HB, Polymeric micelles as drug delivery vehicles, *RSC Adv.* 4 (2014) 17028–17038, 10.1039/c3ra47370h.
- [22] Tawfik SM, Azizov S, Elmasry MR, Sharipov M, Lee YI, Recent advances in nanomicelles delivery systems, *Nanomaterials* 11 (2021) 1–36, 10.3390/nano11010070.
- [23] Basak R, Bandyopadhyay R, Encapsulation of hydrophobic drugs in pluronic F127 micelles: effects of drug hydrophobicity, solution temperature, and pH, *Langmuir.* 29 (2013) 4350–4356, 10.1021/la304836e.
- [24] Carvalho VFM, Salata GC, de Matos JKR, Costa-Fernandez S, Chorilli M, Steiner AA, de Araujo GLB, Silveira ER, Costa-Lotufo LV, Lopes LB, Optimization of composition and obtainment parameters of biocompatible nanoemulsions intended for intraductal administration of piperlongumine (piperlongumine) and mammary tissue targeting, *Int. J. Pharm* 567 (2019), 10.1016/j.ijpharm.2019.118460.

- [25] Raval A, Pillai SA, Bahadur A, Bahadur P, Systematic characterization of Pluronic® micelles and their application for solubilization and *in vitro* release of some hydrophobic anticancer drugs, *J. Mol. Liq* 230 (2017) 473–481, 10.1016/j.molliq.2017.01.065.
- [26] ying Meng X, jia Li J, junhong Ni T, Xiao-tong L, He T, ning Men Z, sheng Liu J, Shen T, Electro-responsive brain-targeting mixed micelles based on Pluronic F127 and D- $\alpha$ -tocopherol polyethylene glycol succinate–ferrocene, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp* 601 (2020), 124986, 10.1016/j.colsurfa.2020.124986.
- [27] Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK, Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system, *3 Biotech* 5 (2015) 123–127, 10.1007/s13205-014-0214-0.
- [28] Masoumi HRF, Basri M, Samiun WS, Izadiyan Z, Lim CJ, Enhancement of encapsulation efficiency of nanoemulsion-containing aripiprazole for the treatment of schizophrenia using mixture experimental design, *Int. J. Nanomed* 10 (2015) 6469–6471, 10.2147/IJN.S89364.
- [29] Arbain NH, Basri M, Salim N, Wui WT, Abdul Rahman MB, Development and characterization of aerosol nanoemulsion system encapsulating low water soluble quercetin for lung cancer treatment, *Mater. Today Proc* (2018) S137–S142, 10.1016/j.matpr.2018.08.055. Elsevier Ltd.
- [30] Feng Z, Wang Z, Yang Y, Du Y, Cui S, Zhang Y, Tong Y, Song Z, Zeng H, Zou Q, Peng L, Sun H, Development of a safety and efficacy nanoemulsion delivery system encapsulated gambogic acid for acute myeloid leukemia *in vitro* and *in vivo*, *Eur. J. Pharm. Sci* 125 (2018) 172–180, 10.1016/j.ejps.2018.10.001.
- [31] Chand Gupta Jyotshna A, Bawankule DU, Verma AK, Shanker K, Nanoemulsion preconcentrate of a pentacyclic triterpene for improved oral efficacy: Formulation design and in-vivo antimalarial activity, *J. Drug Deliv. Sci. Technol* 57 (2020), 101734, 10.1016/j.jddst.2020.101734.
- [32] Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari MR, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, *Pharmaceutics*. 10 (2018), 10.3390/pharmaceutics10020057.
- [33] Jiang X, Bai C, Liu M, *Nanotechnology for microfluidics*, wiley; (2019), 10.1002/9783527818341.
- [34] Fröhlich E, The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int. J. Nanomed* 7 (2012) 5577–5591, 10.2147/IJN.S36111.

- [35] Trivedi R, Kompella UB, Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles, *Nanomedicine* 5 (2010) 485–505, 10.2217/nnm.10.10.
- [36] Gorain B, Choudhury H, Patro Sisinthy S, Kesharwani P, Polymeric micellebased drug delivery systems for tuberculosis treatment, *Nanotechnol. Based Approaches Tuberc. Treat* (2020) 175–191, 10.1016/b978-0-12-819811-7.00011-4. Elsevier.
- [37] Patel M, Kaneko T, Matsumura K, Switchable release nano-reservoirs for codelivery of drugs via a facile micelle-hydrogel composite, *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 3488–3497, 10.1039/c7tb00701a.
- [38] Wang G, Wang JJ, Li F, To SST, Development and evaluation of a novel drug delivery: Pluronic/SDS mixed micelle loaded with myricetin *in vitro* and *in vivo*, *J. Pharm. Sci* 105 (2016) 1535–1543, 10.1016/j.xphs.2016.01.016.
- [39] Kulthe SS, Inamdar NN, Choudhari YM, Shirolkar SM, Borde LC, Mourya VK, Mixed micelle formation with hydrophobic and hydrophilic pluronic block copolymers: Implications for controlled and targeted drug delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 88 (2011) 691–696, 10.1016/j.colsurfb.2011.08.002.
- [40] Corrigan OI, Li X, Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates, *Eur. J. Pharm. Sci* 37 (2009) 477–485, 10.1016/j.ejps.2009.04.004.
- [41] Rajitha P, Biswas R, Sabitha M, Jayakumar R, Methotrexate in the treatment of psoriasis and rheumatoid arthritis: mechanistic insights, current issues and novel delivery approaches, *Curr. Pharm. Des* 23 (2017), 10.2174/1381612823666170601105439.
- [42] Friedman B, Cronstein B, Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis, *Jt. Bone Spine* 86 (2019) 301–307, 10.1016/j.jbspin.2018.07.004.
- [43] Van Ede AE, Laan RFJM, Rood MJ, Huizinga TWJ, Van De Laar MAFJ, Van Denderen CJ, Westgeest TAA, Romme TC, De Rooij DJRAM, Jacobs MJM, De Boo TM, Van Der Wilt GJ, Severens JL, Hartman M, Krabbe PFM, Dijkmans BAC, Breedveld FC, Van De Putte LBA, Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: A forty-eight-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Arthritis Rheum.* 44 (2001) 1515–1524, 10.1002/1529-0131(200107)44:7<1515::AID-ART273>3.0.CO;2-7.
- [44] Aletaha D, Smolen JS, Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review, *JAMA.* 320 (2018) 1360–1372, 10.1001/jama.2018.13103.
- [45] Wang W, Zhou H, Liu L, Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review, *Eur. J. Med. Chem* 158 (2018) 502–516, 10.1016/j.ejmech.2018.09.027.

- [46] Schrezenmeier E, Dörner T, Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology, *Nat. Rev. Rheumatol* 16 (2020) 155–166, 10.1038/s41584-020-0372-x.
- [47] Schapink L, Van Den Ende CHM, Gevers LAHA, Van Ede AE, Den Broeder AA, The effects of methotrexate and hydroxychloroquine combination therapy vs methotrexate monotherapy in early rheumatoid arthritis patients, *Rheumatol. (United Kingdom)* 58 (2019) 131–134, 10.1093/rheumatology/key275.
- [48] Micsik T, Lorincz A, Gál J, Schwab R, Peták I, MDR-1 and MRP-1 activity in peripheral blood leukocytes of rheumatoid arthritis patients, *Diagn. Pathol* 10 (2015), 10.1186/s13000-015-0447-1.
- [49] Hider SL, Owen A, Hartkoorn R, Khoo S, Back D, Silman AJ, Bruce IN, Down regulation of multidrug resistance protein-1 expression in patients with early rheumatoid arthritis exposed to methotrexate as a first disease-modifying antirheumatic drug, *Ann. Rheum. Dis* 65 (2006) 1390–1393, 10.1136/ard.2005.049189.
- [50] Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Kelmer-Bracht AM, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, The metabolic changes caused by dexamethasone in the adjuvant-induced arthritic rat, *Mol. Cell. Biochem* 302 (2007) 87–98, 10.1007/s11010-007-9430-9.
- [51] Mahmoud AM, Hozayen WG, Ramadan SM, Berberine ameliorates methotrexate-induced liver injury by activating Nrf2/HO-1 pathway and PPAR $\gamma$ , and suppressing oxidative stress and apoptosis in rats, *Biomed. Pharmacother* 94 (2017) 280–291, 10.1016/j.biopha.2017.07.101.
- [52] Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR, Antigen-induced arthritis in mice, *Arthritis Rheum.* 20 (1977) 841–850, 10.1002/art.1780200314.
- [53] Beringer A, Miossec P, Systemic effects of IL-17 in inflammatory arthritis, *Nat. Rev. Rheumatol* 15 (2019) 491–501, 10.1038/s41584-019-0243-5.
- [54] Yu R, Li X, DuBois DC, Almon RR, Cao Y, Jusko WJ, Interactions of tofacitinib and dexamethasone on lymphocyte proliferation, *Pharm. Res* 37 (2020), 10.1007/s11095-020-02827-7.

## 4 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, uma maior compreensão da fisiopatologia de doenças inflamatórias crônicas, como a AR, possibilitou o desenvolvimento de novas terapias-alvo e regimes terapêuticos. No entanto, a resposta inadequada às terapias atuais em uma proporção de pacientes, a toxicidade sistêmica acompanhada de administração a longo prazo ou distribuição em locais não-alvo e a eficácia reduzida causada por biodisponibilidade indesejável, ainda são problemas não resolvidos que permeiam a remissão completa da AR (171,172).

As limitações existentes nas terapias atuais da doença, inspiraram estudos sobre a aplicabilidade da nanomedicina para o tratamento da AR. Uma variedade de nanopartículas carreadoras de agentes terapêuticos, com propriedades físico-químicas controláveis, padrão de liberação de drogas adaptável e/ou capacidade de direcionamento ativo foram desenvolvidas na tentativa de trazer melhorias para os tratamentos antirreumáticos atuais (147,171,172).

Em microambientes inflamados, a vasculatura anormal e a drenagem linfática prejudicada facilitam a penetração passiva e o acúmulo de materiais de tamanho manométrico no local (173). Assim, os nanocarreadores aproveitam as vantagens da nanotecnologia para entregar os medicamentos de forma direcionada aos tecidos, células ou compartimentos subcelulares (138,142,143). A propriedade de nanoescala da estrutura automontada permite fácil absorção celular, enquanto a estrutura química detalhada do copolímero e a morfologia dos nanoconjuntos formados em solução definem a capacidade de carregamento de drogas e a capacidade de nanoestruturas poliméricas (173).

No presente estudo foram desenvolvidas nanomicelas poliméricas carregadas com MTX e HCQ com valores de diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, morfologia e topografia dentro de parâmetros adequados e funcionais. As caracterizações por dispersão de luz dinâmica (DLS) e microscopia de força atômica (AFM) demonstram que as nanomicelas apresentam morfologia esférica de revestimento íntegro e baixa polidispersidade, de tamanho médio de 48 nm. De fato, em meio aquoso, os copolímeros de bloco anfifílico se auto-montam, para formar estruturas e morfologias micelares núcleo-coroa, com uma faixa de tamanho na ordem de 10-100 nm (174).

Os sistemas de entrega de nanomicelas de Pluronic F127 podem aumentar de tamanho de acordo com as propriedades físicas do meio, como pH e temperatura (175). Rahdar e colaboradores (2021) desenvolveram nanomicelas funcionais de Pluronic F127 carregadas de

quercetina de diâmetro hidrodinâmico médio de 8,5 nm (176). Enquanto o grupo de pesquisa de Wang (2022) desenvolveram nanomicelas de Pluronic F127 carregadas com crisofanol com tamanho médio de 152,8 nm (177). Nasehi e colaboradores (2018) desenvolveram partículas de Pluronic F127 conjugado com ácido litocólico e carregadas com sorafenibe ainda maiores, apresentando diâmetro médio de 319.36 nm. Por fim, Noshi e colaboradores (2022) desenvolveram nanomicelas mistas de Pluronic F127, Pluronic P123 e Soluplus® como uma plataforma de entrega estável e bem-sucedida para o medicamento antifúngico miconazol com diâmetro médio similar ao encontrado nesse estudo,  $44,39 \text{ nm} \pm 2,68 \text{ nm}$  (178).

Em relação à eficácia do aprisionamento, assumimos um encapsulamento de 100%, pois utilizamos as nanomicelas de Pluronic-F127-HCQ-MTX sem nenhum tratamento adicional. Diversos estudos utilizaram o bulk de nanomicelas, considerando o encapsulamento como 100%. Por exemplo, Carvalho e colaboradores (179), Raval e colaboradores (180), Meng e colaboradores (181) e Jaiswal e colaboradores (182) assumiram que as nanomicelas têm 100% de encapsulamento, quando estão em solução sem nenhuma etapa adicional, como um bulk. Finalmente, é importante notar que as dispersões nanomicelares são cineticamente estáveis e homogêneas e há uma limitação técnica para separar as nanomicelas do meio aquoso externo ou meio dispersante. Como as nanomicelas de Pluronic-F127-HCQ-MTX apresentaram PDI de 0,256 (SD 0,196), considerados o nanossistema desenvolvido como monodisperso (183,184).

Durante o desenvolvimento de nanossistemas de liberação de fármacos, a carga da superfície exerce um fator importante. A interação nanomateriais-célula, a absorção celular e os efeitos resultantes são influenciados pela carga de superfície das nanoformulações (185,186). A carga superficial de nanopartículas é, geralmente, expressa como valores de potencial zeta (187). De acordo com os resultados aqui apresentados, a nanomicelas de Pluronic-F127-HCQ-MTX apresentou potencial zeta de +059 mV. Nanossistemas carregados positivamente parecem facilitar a internalização celular (186). Essa internalização preferencial pode ser devida a interações eletrostáticas positivas-negativas favoráveis, pois as membranas celulares são carregadas negativamente (188).

Em um estudo muito interessante, Hühn e colaboradores (2013) avaliaram a influência das cargas superficiais nas interações de nanopartículas com componentes de meios biológicos e subsequente internalização celular. Nanopartículas de ouro coloidal foram modificadas com polímeros anfifílicos para obtenção de nanopartículas com propriedades físicas idênticas, exceto pela carga superficial (negativa/positiva). O grupo observou que as



nanopartículas carregadas positivamente foram incorporadas pelas células em maior extensão do que as carregadas negativamente. Além disso, os ensaios de citotoxicidade revelaram uma maior citotoxicidade para as nanopartículas carregadas positivamente, associada à sua captação aumentada (189).

É sabido que, ao entrar em contato com as células, os nanomateriais podem causar a deformação das membranas lipídicas resultando na sua internalização, desorganizar a bicamada fosfolipídica e/ou gerar “buracos” nas membranas celulares (186). Os nanomateriais com carga líquida positiva são muito mais propensos a criar tais distorções de membrana do que aqueles com cargas líquidas negativas e neutras (190,191). No entanto, existem vários outros fatores, como tamanho, forma e agregação, que também podem desempenhar um papel significativo na absorção de nanopartículas carregadas, e isso pode ser uma das razões para resultados contrastantes em relação ao efeito da carga na absorção celular (192).

Os nanoveículos que encapsulam os agentes terapêuticos os protegem contra a biodegradação, levando a liberação sustentada de medicamentos e cinética de circulação prolongada (144). De fato, observamos que as nanomicelas de Pluronic-F127-HCQ-MTX prolongaram o tempo de liberação de HCQ e MTX, em comparação com as drogas livres. Os resultados corroboraram a funcionalidade de nanomicelas plurônicas como nanossistemas de liberação controlada para entrega de fármacos (193–196). Prasanthan & Kishore (2021) avaliaram os efeitos de micelas plurônicas na entrega dos fármacos antitumorais citarabina, gemcitabina e hidroxuureia. Os autores observaram perfis de ligação bem definidos e prolongamento da liberação dos fármacos quando administradas a partir de micelas de Pluronic-F127 ou Pluronic-F68 (151). Shaikh e colaboradores (2021) desenvolveram nanomicelas de Pluronic-P123 carregadas com Curcumina, quercetina e lamotrigina e observaram aumento do tempo de liberação e maior biodisponibilidade após administração oral em comparação com os fármacos livres (197). Mais recentemente, Kaur e colaboradores (2022) desenvolveram micelas de Pluronic-P84 carregadas com curcumina ou quercetina e observaram, *in vitro*, o mesmo perfil de liberação sustentado (198).

Aumentar o tempo de liberação de fármacos é uma estratégia interessante para manter o efeito terapêutico por um período prolongado. Tal fato, possibilita a simplificação dos regimes de dosagem, a redução da dose administrada e a redução das flutuações das concentrações séricas do fármaco, com conseqüente redução do risco de efeitos adversos (199). É importante destacar que o MTX é rapidamente eliminado do corpo humano através da via renal. Os valores médios geralmente relatados para a meia-vida de eliminação e a depuração corporal total são de 5 a 8 horas e 4,8 a 7,8 L/h, respectivamente (200,201).

É bem estabelecida na literatura o papel crítico desempenhado pelos osteoclastos na patogênese da AR (3,32,33). No entanto, ainda pouco se sabe sobre os efeitos do MTX e da HCQ na osteoclastogênese durante o curso da doença. Interessantemente, as nanomicelas de Pluronic-F127-HCQ-MTX reduziram, *in vitro*, o número de osteoclastos. Alguns estudos elucidam possíveis mecanismos de ação envolvidos com o evento observado. Por exemplo, Kanagawa e colaboradores (2016) demonstraram que a formação de osteoclastos, e a expressão de genes osteoclásticos como NFATc1 e DC-STAMP, que são induzidos pela citocina RANKL, são significativamente inibidos pelo MTX (202).

Por sua vez, Perpétuo e colaboradores (2017) demonstraram que baixas doses de MTX e prednisolona regulam negativamente a diferenciação de osteoclastos, diminuindo a expressão de RANK em monócitos de pacientes com AR inicial (203). Sun e colaboradores (2014) observaram, *in vivo*, que a terapia combinada de MTX e Sinomenine diminuiu a inflamação e os danos articulares na artrite induzida por colágeno modulando citocinas relacionadas à diferenciação de osteoclastos e a expressão de RANKL e osteoprotegerina em SSF (204). Ainda, o envolvimento HCQ na osteoclastogênese foi relatado por Both e colaboradores (2018). O grupo observou que a HCQ inibe a formação de osteoclastos multinucleares e, conseqüentemente, reduz a reabsorção óssea (205).

Durante o desenvolvimento de sistemas de entregas de fármacos, diversos fatores biológicos devem ser considerados para garantir a sua eficácia terapêutica. Recentemente, a resistência aos medicamentos para a AR com tratamento convencional tornou-se um problema. Mutações no gene supressor tumoral p53 e superexpressão de transportadores ABCB1/MDR-1/P-gp podem contribuir para a resistência a medicamentos antirreumáticos na AR (113). O MRP-1 é um membro bem estabelecido da superfamília de transportadores *ATP Binding Cassette (ABC)* que funcionam como bombas de efluxo responsáveis pelo fenótipo MDR (resistência a múltiplas drogas) (109). De acordo com sua ampla especificidade de substrato, esses carreadores podem interferir na absorção e distribuição de muitos agentes terapêuticos, incluindo o MTX (108,109,206) e a HCQ (207–209).

Hipotetiza-se que a superexpressão de MRP-1 possa ser uma causa de resposta subótima aos DMARDs, uma vez que a eficácia clínica depende, em parte, da retenção intracelular dos fármacos (210). Em 2015, Micsik e colaboradores observaram que a atividade funcional de MRP1 parece não afetar a taxa de resposta à terapia com MTX de pacientes com AR, mas pode ser útil na predição de efeitos colaterais ao fármaco. Mais recentemente, Toldi e colaboradores (2019), demonstraram que pacientes com AR que apresentam maior atividade funcional de MRP1 em linfócitos periféricos CD3+ no início da terapia com DMARD

provavelmente não demonstrará resposta terapêutica suficiente (206). No entanto, há poucos estudos na literatura sobre MRP1, MTX e HCQ na AR, e os resultados observados ainda são inconsistentes.

Aqui, observamos que as nanomicelas de Pluronic-F127-HCQ-MTX inibiram a atividade funcional de MRP-1. Curiosamente, a menor das concentrações testadas (0,1% de nanomicelas Pluronic-127-MTX-HCQ) foi a que promoveu a maior inibição de MRP-1. De fato, estudos apontam que copolímeros de Pluronic são capazes de modular diversos mecanismos envolvidos na resistência a múltiplos medicamentos (MDR), como: (1) a depleção intracelular de ATP e (2) a inibição da atividade da ATPase de proteínas de efluxo de drogas. (211,212).

Em 1999, Miller e colaboradores demonstraram pela primeira vez que os copolímeros em bloco Pluronic inibem MRP. Os estudos examinaram o acúmulo e efluxo de fluoresceína (FLU) em monocamadas de células de adenocarcinoma pancreático humano (Panc-1) com e sem Pluronic P85 (P85), Pluronic L81 (L81) e Pluronic F108 (F108). Os resultados obtidos pelo grupo demonstram que a inibição do transporte de FLU mediado por MRP dependia da composição do Pluronic: o copolímero mais hidrofóbico apresentou o maior efeito na captação de FLU nas monocamadas de Panc-1 (L81 > P85 > F108) (213).

Mais recentemente, a nanotecnologia plurônica para superar a resistência a medicamentos vem sendo amplamente estudada para a eficácia terapêutica no tratamento clínico de tumores. Cheng e colaboradores (2020) desenvolveram micelas poliméricas híbridas de pluronic F127 e pluronic P123 enxertado com éster fenilborônico (PHE) para fornecer eficientemente doxorrubicina (DOX) e reverter MDR. Como resultado, as micelas F127/PHE-DOX apresentaram maior capacidade de induzir a apoptose de células MDR por aumento da concentração intracelular do fármaco. *In vivo*, a avaliação indicou que F127/PHE-DOX acumula em regiões tumorais e apresenta a mais forte inibição do crescimento tumoral, em comparação com os outros grupos avaliados, acompanhada de baixos efeitos colaterais (214).

Considerando a complexidade do processo fisiopatológico da AR, investigamos os efeitos das nanomicelas de Pluronic-127-MTX-HCQ em um modelo *in vivo* de artrite induzida por antígeno (AIA). Comumente, tratamentos antirreumáticos promovem perda de peso indesejada aos pacientes (215). De acordo com os nossos resultados, o tratamento com o nanossistema desenvolvido não reduziu o peso corporal dos animais nas doses avaliadas.

AIA é um modelo bem estabelecido e reprodutível que exhibe várias características semelhantes às observadas na AR humana, incluindo edema e infiltração de células imunes na

articulação (216). A regulação de fatores como permeabilidade vascular e migração celular no processo reumático é extremamente importante, pois a inflamação persistente na cavidade articular leva à formação de *pannus*, juntamente com a erosão da cartilagem e do osso (217).

O MTX é a terapia predominante para AR há mais de 20 anos e, após o diagnóstico, é a primeira linha de terapia recomendada. A eficácia do MTX na AR é o resultado de múltiplos mecanismos farmacológicos, incluindo: o antagonismo do folato, a promoção do acúmulo de adenosina, a regulação das vias de sinalização inflamatória, a proteção óssea e a manutenção da função do sistema imunológico. Exercendo, por meio desses, efeitos antiproliferativos, anti-metabólicos e anti-inflamatórios únicos, sendo capaz de reduzir significativamente o nível de citocinas pró-inflamatórias através da modulação da infiltração de uma grande quantidade de células imunes e inflamatórias na sinóvia da AR (218).

Por sua vez, a HCQ também apresenta efeitos terapêuticos antirreumáticas. Suas propriedades anti-inflamatórias foram demonstradas via inibição da degradação lisossomal do antígeno, com consequente diminuição da apresentação de complexos peptídeo–MHC II na superfície de APCs (ABARIANTOS e colab., 2011; FOX, 1993). Ademais, a HCQ também inibe a produção de anticorpos RF, reagentes de fase aguda e enzimas envolvidas na degradação da cartilagem (ABARIANTOS e colab., 2011; KIM, Man Lyang e colab., 2021; NAZIR e colab., 2021).

Fundamentando os mecanismos farmacológicos no MTX e HCQ, observamos redução de parâmetros inflamatórios como, edema e influxo de células para a articulação, após o tratamento com as nanomicelas de Pluronic-127-MTX-HCQ. O achado mais interessante é que as nanomicelas carregadas com 50% da dose de referência utilizada na clínica promoveram os mesmos efeitos inibitórios. De fato, aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos é uma das grandes vantagens das nanoformulações poliméricas (145–147).

Visando melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade do agente terapêutico insolúvel apigenina (AP), o grupo de pesquisa de Zhang (2017) desenvolveu um nanossistema de micelas mistas composto por dois copolímeros biocompatíveis: Soluplus e Pluronic F127. Foi demonstrado, *in vivo*, um aumento da biodisponibilidade oral de 4,03 vezes da AP em nanoformulação quando comparada à AP livre. Corroborando com esses achados, Fares e colaboradores (2018) desenvolveram micelas poliméricas mistas de Pluronic P123/F127 carregadas com lacidipina e observaram, *in vivo*, melhorias na solubilidade e biodisponibilidade oral. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, a avaliação em coelhos albinos machos saudáveis, revelou um aumento de 6,85 vezes na biodisponibilidade

das micelas poliméricas de lacidipina em comparação com a suspensão oral de lacidipina livre (219).

Efeitos semelhantes foram apresentadas por Shaker e colaboradores (2020), ao desenvolverem um nanossistema de entrega atorvastatina (TA) Pluronic F127 e Pluronic F68. A partir das investigações *in vitro* e *in vivo*, os autores concluíram que a formulação de TA com Pluronic melhora consideravelmente o comportamento de solubilização e absorção de TA e pode ser uma ferramenta útil para melhorar a sua eficácia terapêutica e clínica (220).

Acreditamos que os efeitos inibitórios observados com metade da dose de referência utilizada na clínica, decorrem por meio de diferentes mecanismos como: melhora da solubilidade, aumento da biodisponibilidade e inibição de MRP-1. A redução da dose utilizada, em especial, do MTX, é um parâmetro extremamente importante para a terapêutica da AR. Uma vez que, os efeitos colaterais observados estão, em grande parte, associados à dose e ao tempo de tratamento (101,106,108). Por fim, vale ressaltar que o tratamento com nanomicelas Pluronic-127-MTX-HCQ não alterou o número de leucócitos circulantes totais, sugerindo que seus efeitos são locais.

## CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados demonstram efeitos positivos das nanopartículas de Pluronic® F-127 carregadas com MTX e HCQ no modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos. O nanossistema de entrega de fármacos desenvolvidos no presente estudo, mostra propriedades físico-químicas interessantes. O tamanho, a eficácia de encapsulamento das drogas, a dispersão estável e homogênea e a carga das nanopartículas estão de acordo com os padrões esperados e favorecem sua aplicabilidade como produtos farmacêuticos.

A funcionalidade das nanopartículas é observada pelo aumento do tempo de liberação do MTX e HCQ. Os nanossistemas de entrega de drogas possibilitam um melhor aproveitamento do fármaco pelo organismo devido à liberação prolongada, quando comparados às formas farmacêuticas convencionais. Tais sistemas são bastante interessantes uma vez que são capazes de influenciar o perfil farmacocinético, a velocidade de liberação, o local e a duração de ação do fármaco, exercendo, inclusive, influência sobre os efeitos adversos decorrentes de seu uso.

Os resultados obtidos mostram a capacidade das nanopartículas carregadas com os fármacos antirreumáticos de reduzir a formação de osteoclastos – células responsáveis pela degradação da matriz óssea nas articulações. Tal fato depõe a favor do uso do sistema de nanopartículas carregadas com MTX e HCQ, uma vez que a degradação do tecido ósseo é uma manifestação presente que impacta significativamente a qualidade de vida do pacientes.

Uma das vantagens do emprego dos nanossistemas de entrega de drogas é a possibilidade de utilização de doses mais baixas do agente terapêutico devido ao aumento da sua biodisponibilidade. De fato, observamos que uma dose significativamente menor é suficiente para inibir a osteoclastogênese, quando o MTX e a HCQ foram combinadas em nanopartículas de Pluronic. Ainda, a utilização de doses reduzidas promoveu maior inibição de MRP-1, o que favorece maior absorção, distribuição e retenção intracelular do fármaco.

O resultado mencionado acima fundamenta os achados subsequentes de efeitos inibitórios similares na modulação da inflamação com doses significativamente reduzidas. Interessantemente, demonstramos que as nanopartículas carregadas com MTX e HCQ são capazes de inibir localmente o edema e o influxo de células imunes para a articulação com metade da dose de referência utilizada na clínica, sem alterar os leucócitos totais circulantes.

Em suma, os resultados apresentados abrem novas perspectivas para redução da concentração dos fármacos antirreumáticos MTX e HCQ com o nanossistema de entrega de drogas desenvolvido. Acreditamos que essa nova nanoformulação possibilita a eficácia atual observada na terapia com MTX e HCQ livres, porém com menores taxas de efeitos adversos devido à redução da dose administrada, contornando uma das maiores problemáticas atual dos tratamentos para AR. No entanto, mais estudos são necessários para avaliação da eficácia e segurança terapêutica.

## REFERÊNCIAS

1. Charukevič G, Miltinienė D, Dadonienė J. Mortality in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Retrospective Cohort Study and Systematic Review. **Med Sci Forum.** 2021, Vol 6, Page 5. 2021 Jun 21;6(1):5.
2. Sparks JA. Rheumatoid Arthritis. **Ann Intern Med.** 2019 Jan 1;170(1):ITC1–15.
3. Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. **Cells.** 2020 Apr 3;9(4).
4. Germano JL, Reis-Pardal J, Tonin FS, Pontarolo R, Melchior AC, Fernandez-Llimos F. Prevalence of rheumatoid arthritis in South America: a systematic review and meta-analysis. **Cien Saude Colet.** 2021 Nov 15;26:5371–82.
5. Finckh A, Gilbert B, Hodkinson B, Bae SC, Thomas R, Deane KD, et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol.** 2022 1810. 2022 Sep 6;18(10):591–602.
6. Rudan I, Sidhu S, Papan A, Meng SJ, Xin-Wei Y, Wang W, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: A systematic review and analysis. **J Glob Health.** 2015;5(1).
7. Scublinsky D, Gonzalez CD. Quantifying Disease in Challenging Conditions: Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis. **J Rheumatol.** 2016 Jul 1;43(7):1263–4.
8. Brunier L, Bleterry M, Merle S, Derancourt C, Polomat K, Dehlinger V, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in the French West Indies: Results of the EPPRA study in Martinique. **Jt bone spine.** 2017 Jul 1;84(4):455–61.
9. Peláez-Ballesteros I, Granados Y, Quintana R, Loyola-Sánchez A, Julián-Santiago F, Rosillo C, et al. Epidemiology and socioeconomic impact of the rheumatic diseases on indigenous people: an invisible syndemic public health problem. **Ann Rheum Dis.** 2018 Jul 14;77(10).
10. Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. **Rheumatology (Oxford).** 2002;41(1):88–95.
11. Almutairi KB, Nossent JC, Preen DB, Keen HI, Inderjeeth CA. The Prevalence of Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review of Population-based Studies. **J Rheumatol.** 2021 May 1;48(5):669–76.



12. Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. Rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**. 2010 Dec;24(6):733–45.
13. Cobb S, Anderson F, Bauer W. Length of life and cause of death in rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**. 1953 Oct;249(14):553–6.
14. Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, Elhai M, Rozenberg S, Gossec L, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis. **Jt bone spine**. 2013 Jan;80(1):29–33.
15. Widdifield J, Paterson JM, Huang A, Bernatsky S. Causes of Death in Rheumatoid Arthritis: How Do They Compare to the General Population? **Arthritis Care Res**. 2018 Dec 1;70(12):1748–55.
16. Ometto F, Fedeli U, Schievano E, Botsios C, Punzi L, Corti MC. Cause-specific mortality in a large population-based cohort of patients with rheumatoid arthritis in Italy. **Clin Exp Rheumatol**. 2018 Mar 2;36(4):636–42.
17. van den Hoek J, Boshuizen HC, Roorda LD, Tijhuis GJ, Nurmohamed MT, van den Bos GAM, et al. Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study. **Rheumatol Int**. 2017 Apr 1;37(4):487–93.
18. Houge IS, Hoff M, Thomas R, Videm V. Mortality is increased in patients with rheumatoid arthritis or diabetes compared to the general population – the Nord-Trøndelag Health Study. **Sci Reports**. 2020 101. 2020 Feb 27;10(1):1–10.
19. Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. **J Autoimmun**. 2020 Jun 1;110.
20. Romão VC, Fonseca JE. Etiology and Risk Factors for Rheumatoid Arthritis: A State-of-the-Art Review. **Front Med**. 2021 Nov 26;8:2383.
21. Gioia C, Lucchino B, Tarsitano MG, Iannuccelli C, Di Franco M. Dietary Habits and Nutrition in Rheumatoid Arthritis: Can Diet Influence Disease Development and Clinical Manifestations? **Nutrients**. 2020 May 1;12(5).
22. Petrovská N, Prajzlerová K, Vencovský J, Šenolt L, Filková M. The pre-clinical phase of rheumatoid arthritis: From risk factors to prevention of arthritis. **Autoimmun Rev**. 2021 May 1;20(5).
23. Croia C, Bursi R, Sutera D, Petrelli F, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis - PubMed. **Clin Exp Rheumatol**. 2019;37(3):347–57.
24. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. **Nat Rev Dis Prim**. 2018 41. 2018 Feb 8;4(1):1–23.

25. Chaudhary A, Vinay P. Rheumatoid Arthritis: Etiology, Treatment and Animal Models. **J Drug Deliv Ther**. 2020 Oct 15;10(5-s):290–8.
26. Levick JR, McDonald JN. Fluid movement across synovium in healthy joints: role of synovial fluid macromolecules. **Ann Rheum Dis**. 1995;54(5):417–23.
27. Steenvoorden MMC, Tolboom TCA, van der Pluijm G, Löwik C, Visser CPJ, DeGroot J, et al. Transition of healthy to diseased synovial tissue in rheumatoid arthritis is associated with gain of mesenchymal/fibrotic characteristics. **Arthritis Res Ther**. 2006 Oct 31;8(6).
28. Castor CW. The microscopic structure of normal human synovial tissue. **Arthritis Rheum**. 1960;3(2):140–51.
29. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**. 2011 Dec 8;365(23):2205–19.
30. Petrelli F, Mariani FM, Alunno A, Puxeddu I. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: one year in review 2022. **Clin Exp Rheumatol**. 2022;40(3):475–82.
31. Radu AF, Bungau SG. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. **Cells**. 2021 Nov 1;10(11).
32. Kim GM, Park H, Lee SY. Roles of osteoclast-associated receptor in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Jt Bone Spine**. 2022 Oct 1;89(5):105400.
33. Kim JH, Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. **Chonnam Med J**. 2016;52(1):12.
34. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **Nat Rev Drug Discov**. 2003 26. 2003 Jun;2(6):473–88.
35. Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine Networks in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Int J Mol Sci**. 2021 Oct 1;22(20).
36. Mueller AL, Payandeh Z, Mohammadkhani N, Mubarak SMH, Zakeri A, Bahrami AA, et al. Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: New Treatment Strategies. **Cells**. 2021, Vol 10, Page 3017. 2021 Nov 4;10(11):3017.
37. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunol Rev**. 2010 Jan;233(1):233.
38. Cecchi I, Arias de la Rosa I, Menegatti E, Roccatello D, Collantes-Estevez E, Lopez-Pedreira C, et al. Neutrophils: Novel key players in Rheumatoid Arthritis. Current and future therapeutic targets. **Autoimmun Rev**. 2018 Nov 1;17(11):1138–49.
39. Wright HL, Lyon M, Chapman EA, Moots RJ, Edwards SW. Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid Neutrophils Drive Inflammation Through Production of Chemokines,

- Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Traps. **Front Immunol.** 2021 Jan 5;11.
40. Fresneda Alarcon M, McLaren Z, Wright HL. Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O. **Front Immunol.** 2021 Mar 4;12.
  41. Spengler J, Lugonja B, Jimmy Ytterberg A, Zubarev RA, Creese AJ, Pearson MJ, et al. Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid. **Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ).** 2015 Dec 1;67(12):3135–45.
  42. Zhou Y, An LL, Chaerkady R, Mittereder N, Clarke L, Cohen TS, et al. Evidence for a direct link between PAD4-mediated citrullination and the oxidative burst in human neutrophils. **Sci Rep.** 2018 Dec 1;8(1).
  43. Karmakar U, Vermeren S. Crosstalk between B cells and neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunology.** 2021 Dec 1;164(4):689–700.
  44. An Q, Yan W, Zhao Y, Yu K. Enhanced neutrophil autophagy and increased concentrations of IL-6, IL-8, IL-10 and MCP-1 in rheumatoid arthritis. **Int Immunopharmacol.** 2018 Dec 1;65:119–28.
  45. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. **Sci Transl Med.** 2013 Mar 27;5(178).
  46. Liu X, Arfman T, Wichapong K, Reutelingsperger CPM, Voorberg J, Nicolaes GAF. PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease. **J Thromb Haemost.** 2021 Jul 1;19(7):1607–17.
  47. Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol.** 2016 Aug 1;12(8):472–85.
  48. Siouti E, Andreacos E. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. **Biochem Pharmacol.** 2019 Jul 1;165:152–69.
  49. Edilova MI, Akram A, Abdul-Sater AA. Innate immunity drives pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Biomed J.** 2021 Apr 1;44(2):172–82.
  50. Elshabrawy HA, Chen Z, Volin M V., Ravella S, Virupannavar S, Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Angiogenesis.** 2015 Oct 1;18(4):433–48.
  51. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate

- Lymphoid Cells: 10 Years On. **Cell**. 2018 Aug 23;174(5):1054–66.
52. Lin SJ, Hsu CY, Kuo ML, Lee PT, Hsiao HS, Chen JY. Phenotypic and functional characterization of natural killer cells in rheumatoid arthritis-regulation with interleukin-15. **Sci Rep**. 2020 Dec 1;10(1).
  53. Goldbach-Mansky R, Suson S, Wesley R, Hack CE, El-Gabalawy HS, Tak PP. Raised granzyme B levels are associated with erosions in patients with early rheumatoid factor positive rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. 2005 May;64(5):715–21.
  54. Dalbeth N, Gundle R, Davies RJO, Lee YCG, McMichael AJ, Callan MFC. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. **J Immunol**. 2004 Nov 15;173(10):6418–26.
  55. Rodríguez-Carrio J, Hähnlein JS, Ramwadhoebe TH, Semmelink JF, Choi IY, van Lienden KP, et al. Brief Report: Altered Innate Lymphoid Cell Subsets in Human Lymph Node Biopsy Specimens Obtained During the At-Risk and Earliest Phases of Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)**. 2017 Jan 1;69(1):70–6.
  56. Takaki-Kuwahara A, Arinobu Y, Miyawaki K, Yamada H, Tsuzuki H, Irino K, et al. CCR6+ group 3 innate lymphoid cells accumulate in inflamed joints in rheumatoid arthritis and produce Th17 cytokines. **Arthritis Res Ther**. 2019 Aug 30;21(1).
  57. Rauber S, Lubber M, Weber S, Maul L, Soare A, Wohlfahrt T, et al. Resolution of inflammation by interleukin-9-producing type 2 innate lymphoid cells. **Nat Med**. 2017 Aug 1;23(8):938–44.
  58. Yu MB, Langridge WHR. The function of myeloid dendritic cells in rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**. 2017 Jul 1;37(7):1043–51.
  59. Saferding V, Blüml S. Innate immunity as the trigger of systemic autoimmune diseases. **J Autoimmun**. 2020 Jun 1;110.
  60. Steffen U, Schett G, Bozec A. How autoantibodies regulate osteoclast induced bone loss in rheumatoid arthritis. **Front Immunol**. 2019 Jul 3;10(JULY):1483.
  61. Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. **Bone Res**. 2022 101. 2022 Jul 18;10(1):1–19.
  62. Jung YK, Kang YM, Han S. Osteoclasts in the Inflammatory Arthritis: Implications for Pathologic Osteolysis. **Immune Netw**. 2019 Feb 13;19(1).
  63. Kim J, Jeong W-J, Kim H-J. Osteoclasts: Crucial in Rheumatoid Arthritis. **J Rheum Dis**. 2016 Oct 31;23(3):141–7.

64. Massey HM, Flanagan AM. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. **Br J Haematol**. 1999 Jul 1;106(1):167–70.
65. Mun SH, Park PSU, Park-Min KH. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. **Exp Mol Med**. 2020 528. 2020 Aug 17;52(8):1239–54.
66. Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**. 2002;4(5):281.
67. Iwamoto N, Kawakami A. The monocyte-to-osteoclast transition in rheumatoid arthritis: Recent findings. **Front Immunol**. 2022 Sep 12;13:5288.
68. Kitaura H, Zhou P, Kim HJ, Novack D V., Ross FP, Teitelbaum SL. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. **J Clin Invest**. 2005 Dec 1;115(12):3418–27.
69. Rezuş E, Macovei LA, Burlui AM, Cardoneanu A, Rezuş C. Ischemic Heart Disease and Rheumatoid Arthritis—Two Conditions, the Same Background. **Life**. 2021 Oct 1;11(10).
70. Tripolino C, Ciaffi J, Pucino V, Ruscitti P, van Leeuwen N, Borghi C, et al. Insulin Signaling in Arthritis. **Front Immunol**. 2021 Apr 30;12:1498.
71. Figus FA, Piga M, Azzolin I, McConnell R, Iagnocco A. Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities. **Autoimmun Rev**. 2021 Apr 1;20(4).
72. Dai Y, Wang W, Yu Y, Hu S. Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: an overview of epidemiology, pathogenesis and management. **Clin Rheumatol**. 2021 Apr 1;40(4):1211–20.
73. Nicolau J, Lequerré T, Bacquet H, Vittecoq O. Rheumatoid arthritis, insulin resistance, and diabetes. **Jt bone spine**. 2017 Jul 1;84(4):411–6.
74. Erum U, Ahsan T, Khowaja D. Lipid abnormalities in patients with Rheumatoid Arthritis. **Pakistan J Med Sci**. 2017 Jan 1;33(1):227.
75. Argnani L, Zanetti A, Carrara G, Silvagni E, Guerrini G, Zambon A, et al. Rheumatoid Arthritis and Cardiovascular Risk: Retrospective Matched-Cohort Analysis Based on the RECORD Study of the Italian Society for Rheumatology. **Front Med**. 2021 Oct 5;8:1747.
76. Baoqi Y, Dan M, Xingxing Z, Xueqing Z, Yajing W, Ke X, et al. Effect of Anti-Rheumatic Drugs on Cardiovascular Disease Events in Rheumatoid Arthritis. **Front Cardiovasc Med**. 2022 Feb 3;8:2239.
77. Nerurkar L, Siebert S, McInnes IB, Cavanagh J. Rheumatoid arthritis and depression: an inflammatory perspective. **The lancet Psychiatry**. 2019 Feb 1;6(2):164–73.
78. Radovanović-Dinić B, Tešić-Rajković S, Zivkovic V, Grgov S. Clinical connection

- between rheumatoid arthritis and liver damage. **Rheumatol Int.** 2018 May 1;38(5):715–24.
79. Conforti A, Di Cola I, Pavlych V, Ruscitti P, Berardicurti O, Ursini F, et al. Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev.** 2021 Feb 1;20(2).
80. Andonian BJ, Huffman KM. Skeletal muscle disease in rheumatoid arthritis: the center of cardiometabolic comorbidities? **Curr Opin Rheumatol.** 2020 May 1;32(3):297–306.
81. Takeuchi T, Yoshida H, Tanaka S. Role of interleukin-6 in bone destruction and bone repair in rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev.** 2021 Sep 1;20(9).
82. Shim Jhyuck, Stavre Z, Gravalles EM. Bone Loss in Rheumatoid Arthritis: Basic Mechanisms and Clinical Implications. **Calcif Tissue Int.** 2018 May 1;102(5):533–46.
83. Tanaka S. Emerging anti-osteoclast therapy for rheumatoid arthritis. **J Orthop Sci.** 2018 Sep 1;23(5):717–21.
84. Pundole X, Suarez-Almazor ME. Cancer and Rheumatoid Arthritis. **Rheum Dis Clin North Am.** 2020 Aug 1;46(3):445–62.
85. Chatzidionysiou K, di Giuseppe D, Soderling J, Catrina A, Askling J. Risk of lung cancer in rheumatoid arthritis and in relation to autoantibody positivity and smoking. **RMD Open.** 2022 Oct 1;8(2):e002465.
86. Kim JW, Suh CH. Systemic Manifestations and Complications in Patients with Rheumatoid Arthritis. **J Clin Med.** 2020 Jun 1;9(6):1–5.
87. D’Silva KM, Wallace ZS. COVID-19 and rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol.** 2021 May 1;33(3):255–61.
88. Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. **Lancet (London, England).** 2017 Jun 10;389(10086):2338–48.
89. Fries JF. Current treatment paradigms in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford).** 2000;39 Suppl 1(SUPPL. 1):30–5.
90. Hyndman IJ. Rheumatoid arthritis: past, present and future approaches to treating the disease. **Int J Rheum Dis.** 2017 Apr 1;20(4):417–9.
91. Upchurch KS, Kay J. Evolution of treatment for rheumatoid arthritis. **Rheumatology.** 2012 Dec 1;51(suppl\_6):vi28–36.
92. Benjamin O, Bansal P, Goyal A et al. Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARD). **StatPearls.** 2022 Jul 4;
93. Wang Y, Chen S, Du K, Liang C, Wang S, Owusu Boadi E, et al. Traditional herbal

- medicine: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis. **J Ethnopharmacol**. 2021 Oct 28;279.
94. Köhler BM, Günther J, Kaudewitz D, Lorenz HM. Current Therapeutic Options in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **J Clin Med**. 2019 Jul 1;8(7).
  95. Huang J, Fu X, Chen X, Li Z, Huang Y, Liang C. Promising Therapeutic Targets for Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Front Immunol**. 2021 Jul 9;12.
  96. Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzahi S, Alimohammadi R, Bezvan MH, Mohammadi H, et al. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. **J Cell Physiol**. 2019 Jul 1;234(7):10018–31.
  97. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. **Lancet (London, England)**. 2016 Oct 22;388(10055):2023–38.
  98. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. **JAMA**. 2018 Oct 2;320(13):1360–72.
  99. Da Saúde M. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide. 2020;1–194.
  100. Alqarni AM, Zeidler MP. How does methotrexate work? **Biochem Soc Trans**. 2020 Apr 1;48(2):559–67.
  101. Katturajan R, S V, Rasool M, Evan Prince S. Molecular toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis treatment: A novel perspective and therapeutic implications. **Toxicology**. 2021 Sep 1;461:152909.
  102. Maksimovic V, Pavlovic-Popovic Z, Vukmirovic S, Cvejic J, Mooranian A, Al-Salami H, et al. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. **Mol Biol Rep**. 2020 Jun 1;47(6):4699–708.
  103. Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. **Nat Rev Rheumatol**. 2020 Mar 1;16(3):145–54.
  104. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, et al. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. **Int J Mol Sci**. 2019 Oct 2;20(20).
  105. Rudin S, Marable M, Huang RS. The Promise of Pharmacogenomics in Reducing Toxicity During Acute Lymphoblastic Leukemia Maintenance Treatment. **Genomics Proteomics Bioinformatics**. 2017 Apr 1;15(2):82.
  106. Wang W, Zhou H, Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. **Eur J Med Chem**. 2018 Oct 5;158:502–16.
  107. Jekic B, Maksimovic N, Damnjanovic T. Methotrexate pharmacogenetics in the treatment of rheumatoid arthritis. **Pharmacogenomics**. 2019;20(17):1235–45.

108. Gao J, Wang C, Wei W. The effects of drug transporters on the efficacy of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. **Life Sci.** 2021 Mar 1;268.
109. Micsik T, Lorincz A, Gál J, Schwab R, Peták I. MDR-1 and MRP-1 activity in peripheral blood leukocytes of rheumatoid arthritis patients. **Diagn Pathol.** 2015 Dec 30;10(1):1–8.
110. Jansen G, Scheper RJ, Dijkmans BAC. Multidrug resistance proteins in rheumatoid arthritis, role in disease-modifying antirheumatic drug efficacy and inflammatory processes: an overview. **Scand J Rheumatol.** 2003;32(6):325–36.
111. Jorgensen C, Sun R, Rossi JF, Costes J, Richard D, Bologna C, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human rheumatoid synovium. **Rheumatol Int.** 1995 Jul;15(2):83–6.
112. Kato S, Ito K, Kato Y, Wakayama T, Kubo Y, Iseki S, et al. Involvement of multidrug resistance-associated protein 1 in intestinal toxicity of methotrexate. **Pharm Res.** 2009 Mar 14;26(6):1467–76.
113. Zhang KX, Ip CK, Chung SK, Lei KK, Zhang YQ, Liu L, et al. Drug-resistance in rheumatoid arthritis: the role of p53 gene mutations, ABC family transporters and personal factors. **Curr Opin Pharmacol.** 2020 Oct 1;54:59–71.
114. Browning DJ, Retinopathy C. Pharmacology of Chloroquine and Hydroxychloroquine. **Hydroxychloroquine Chloroquine Retin.** 2014;35–63.
115. Nazir AM, Koganti B, Gupta K, Memon MS, Zahid MBA, Kumar VS, et al. Evaluating the Use of Hydroxychloroquine in Treating Patients With Rheumatoid Arthritis. **Cureus.** 2021 Nov 6;13(11).
116. Morrisette T, Lodise TP, Scheetz MH, Goswami S, Pogue JM, Rybak MJ. The Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Hydroxychloroquine and Dose Selection for COVID-19: Putting the Cart Before the Horse. **Infect Dis Ther.** 2020 Sep 1;9(3):561–72.
117. Browning DJ. Pharmacology of Chloroquine and Hydroxychloroquine. **Hydroxychloroquine Chloroquine Retin.** 2014;35.
118. Nicol MR, Joshi A, Rizk ML, Sabato PE, Savic RM, Wesche D, et al. Pharmacokinetics and Pharmacological Properties of Chloroquine and Hydroxychloroquine in the Context of COVID-19 Infection. **Clin Pharmacol Ther.** 2020 Dec 1;108(6):1135–49.
119. Zahr N, Urien S, Llopis B, Pourcher V, Paccoud O, Bleibtreu A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxychloroquine in hospitalized



- patients with COVID-19. **Therapies**. 2021 Jul 1;76(4):285–95.
120. Banks CN. Melanin: blackguard or red herring? Another look at chloroquine retinopathy. **Aust N Z J Ophthalmol**. 1987;15(4):365–70.
  121. Checa González A, Pérez Pérez N. Antimalarial ocular toxicity a critical appraisal. **J Clin Rheumatol**. 1998 Apr;4(2):67–8.
  122. Mackenzie AH. Dose refinements in long-term therapy of rheumatoid arthritis with antimalarials. **Am J Med**. 1983 Jul 18;75(1A):40–5.
  123. Gustafsson L, Walker O, Alvan G, Beermann B, Estevez F, Gleisner L, et al. Disposition of chloroquine in man after single intravenous and oral doses. **Br J Clin Pharmacol**. 1983;15(4):471–9.
  124. McChesney EW. Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. **Am J Med**. 1983 Jul 18;75(1A):11–8.
  125. Abarientos C, Sperber K, Shapiro DL, Aronow WS, Chao CP, Ash JY. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and its safety in pregnancy. **Expert Opin Drug Saf**. 2011 Sep;10(5):705–14.
  126. Fox RI. Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. **Semin Arthritis Rheum**. 1993;23(2 Suppl 1):82–91.
  127. Kim ML, Hardy MY, Edgington-Mitchell LE, Ramarathinam SH, Chung SZ, Russell AK, et al. Hydroxychloroquine inhibits the mitochondrial antioxidant system in activated T cells. **iScience**. 2021 Dec 17;24(12):103509.
  128. Cush JJ. Rheumatoid Arthritis: Early Diagnosis and Treatment. **Med Clin North Am**. 2021 Mar 1;105(2):355–65.
  129. Lucas CJ, Dimmitt SB, Martin JH. Optimising low-dose methotrexate for rheumatoid arthritis—A review. **Br J Clin Pharmacol**. 2019 Oct 1;85(10):2228.
  130. Peper SM, Lew R, Mikuls T, Brophy M, Rybin D, Wu H, et al. Rheumatoid Arthritis Treatment After Methotrexate: The Durability of Triple Therapy Versus Etanercept. **Arthritis Care Res (Hoboken)**. 2017 Oct 1;69(10):1467–72.
  131. Inui K, Koike T. Combination therapy with biologic agents in rheumatic diseases: current and future prospects. **Ther Adv Musculoskelet Dis**. 2016 Oct 1;8(5):192.
  132. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**. 2020;25(1):112.
  133. Dolati S, Sadreddini S, Rostamzadeh D, Ahmadi M, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M. Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment. **Biomed**

- Pharmacother.** 2016 May 1;80:30–41.
134. Yetisgin AA, Cetinel S, Zuvin M, Kosar A, Kutlu O. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. **Molecules.** 2020 May 1;25(9).
  135. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. **Nanomedicine (Lond).** 2016 Mar 1;11(6):673–92.
  136. Wang Q, Sun X. Recent advances in nanomedicines for the treatment of rheumatoid arthritis. **Biomater Sci.** 2017 Jul 26;5(8):1407–20.
  137. Welch MJ, Hawker CJ, Wooley KL. The advantages of nanoparticles for PET. **J Nucl Med.** 2009 Nov 1;50(11):1743–6.
  138. Chen L, Liang J. An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.** 2020 Jul 1;112.
  139. Li B, Wang F, Gui L, He Q, Yao Y, Chen H. The potential of biomimetic nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. **Nanomedicine (Lond).** 2018 Aug 1;13(16):2099–118.
  140. Han X, Xu K, Taratula O, Farsad K. Applications of nanoparticles in biomedical imaging. **Nanoscale.** 2019 Jan 21;11(3):799–819.
  141. Xiao S, Tang Y, Lv Z, Lin Y, Chen L. Nanomedicine - advantages for their use in rheumatoid arthritis theranostics. **J Control Release.** 2019 Dec 28;316:302–16.
  142. Wang S, Lv J, Meng S, Tang J, Nie L. Recent Advances in Nanotheranostics for Treat-to-Target of Rheumatoid Arthritis. **Adv Healthc Mater.** 2020 Mar 1;9(6).
  143. Kumari P, Ghosh B, Biswas S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. **J Drug Target.** 2016 Mar 15;24(3):179–91.
  144. Yang M, Feng X, Ding J, Chang F, Chen X. Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis. **J Control Release.** 2017 Apr 28;252:108–24.
  145. Ferreira-Silva M, Faria-Silva C, Baptista PV, Fernandes E, Fernandes AR, Corvo ML. Liposomal Nanosystems in Rheumatoid Arthritis. **Pharmaceutics.** 2021 Apr 1;13(4).
  146. Chen L, Wang Y, Sun L, Yan J, Mao HQ. Nanomedicine Strategies for Anti-Inflammatory Treatment of Noninfectious Arthritis. **Adv Healthc Mater.** 2021 Jun 1;10(11).
  147. Jeong M, Park JH. Nanomedicine for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Mol Pharm.** 2021 Feb 1;18(2):539–49.
  148. Dantas Lopes dos Santos D, Besegato JF, de Melo PBG, Oshiro Junior JA, Chorilli M, Deng D, et al. Curcumin-loaded Pluronic® F-127 Micelles as a Drug Delivery System

- for Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for Oral Application. **Photochem Photobiol.** 2021 Sep 1;97(5):1072–88.
149. Agafonov M, Ivanov S, Terekhova I. Improvement of pharmacologically relevant properties of methotrexate by solid dispersion with Pluronic F127. **Mater Sci Eng C.** 2021 May 1;124:112059.
  150. Yu J, Qiu H, Yin S, Wang H, Li Y. Polymeric Drug Delivery System Based on Pluronics for Cancer Treatment. **Molecules.** 2021 Jun 2;26(12).
  151. Prasanthan P, Kishore N. Self-assemblies of pluronic micelles in partitioning of anticancer drugs and effectiveness of this system towards target protein. **RSC Adv.** 2021 Jun 22;11(36):22057–69.
  152. Liu Y, Fu S, Lin L, Cao Y, Xie X, Yu H, et al. Redox-sensitive Pluronic F127-tocopherol micelles: synthesis, characterization, and cytotoxicity evaluation. **Int J Nanomedicine.** 2017 Apr 3;12:2635.
  153. Ghosh B, Biswas S. Polymeric micelles in cancer therapy: State of the art. **J Control Release.** 2021 Apr 10;332:127–47.
  154. Kabanov A V., Batrakova E V., Alakhov VY. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **J Control Release.** 2002 Aug 21;82(2–3):189–212.
  155. Sotoudegan F, Amini M, Faizi M, Aboofazeli R. Nimodipine-Loaded Pluronic® Block Copolymer Micelles: Preparation, Characterization, In-vitro and In-vivo Studies. **Iran J Pharm Res.** 2016 154. 2016;15(4):641–61.
  156. Feng Y, Quinnell SP, Lanzi AM, Vegas AJ. Alginate-Based Amphiphilic Block Copolymers as a Drug Codelivery Platform. **Nano Lett.** 2021 Sep 22;21(18):7495–504.
  157. Di Donato C, Iacovino R, Isernia C, Malgieri G, Varela-Garcia A, Concheiro A, et al. Polypseudorotaxanes of Pluronic® F127 with Combinations of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cyclodextrins for Topical Formulation of Acyclovir. **Nanomater.** 2020, Vol 10, Page 613. 2020 Mar 27;10(4):613.
  158. Shaker MA, Elbadawy HM, Shaker MA. Improved solubility, dissolution, and oral bioavailability for atorvastatin-Pluronic® solid dispersions. **Int J Pharm.** 2020 Jan 25;574.
  159. Jarak I, Varela CL, Tavares da Silva E, Roleira FFM, Veiga F, Figueiras A. Pluronic-based nanovehicles: Recent advances in anticancer therapeutic applications. **Eur J Med Chem.** 2020 Nov 15;206.

160. Ganguly R, Kumar S, Kunwar A, Nath S, Sarma HD, Tripathi A, et al. Structural and therapeutic properties of curcumin solubilized pluronic F127 micellar solutions and hydrogels. **J Mol Liq.** 2020 Sep 15;314:113591.
161. Cidade MT, Ramos DJ, Santos J, Carrelo H, Calero N, Borges JP. Injectable Hydrogels Based on Pluronic/Water Systems Filled with Alginate Microparticles for Biomedical Applications. **Materials (Basel).** 2019;12(7).
162. Zou S, He Q, Wang Q, Wang B, Liu G, Zhang F, et al. Injectable Nanosponge-Loaded Pluronic F127 Hydrogel for Pore-Forming Toxin Neutralization. **Int J Nanomedicine.** 2021 Jun 23;16:4239–50.
163. Xie D, Ma P, Ding X, Yang X, Duan L, Xiao B, et al. Pluronic F127-Modified Electrospun Fibrous Meshes for Synergistic Combination Chemotherapy of Colon Cancer. **Front Bioeng Biotechnol.** 2021 Feb 16;8:1535.
164. Alexandridis P, Alan Hatton T. Poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide)poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.** 1995 Mar 10;96(1–2):1–46.
165. Khimani M, Verma G, Kumar S, Hassan PA, Aswal VK, Bahadur P. pH induced tuning of size, charge and viscoelastic behavior of aqueous micellar solution of Pluronic® P104–anthranilic acid mixtures: A scattering, rheology and NMR study. **Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.** 2015 Apr 1;470:202–10.
166. Pitto-Barry A, Barry NPE. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. **Polym Chem.** 2014 Apr 15;5(10):3291–7.
167. Mazzaferro S, Bouchemal K, Ponchel G. Oral delivery of anticancer drugs III: formulation using drug delivery systems. **Drug Discov Today.** 2013 Jan;18(1–2):99–104.
168. Singla P, Garg S, McClements J, Jamieson O, Peeters M, Mahajan RK. Advances in the therapeutic delivery and applications of functionalized Pluronic: A critical review. **Adv Colloid Interface Sci.** 2022 Jan 1;299:102563.
169. Shafiq A, Madni A, Khan S, Sultana H, Sumaira, Shah H, et al. Core-shell Pluronic F127/chitosan based nanoparticles for effective delivery of methotrexate in the management of rheumatoid arthritis. **Int J Biol Macromol.** 2022 Jul 31;213:465–77.
170. Li S, Xiong Y, Zhang X. Poloxamer surface modified trimethyl chitosan nanoparticles for the effective delivery of methotrexate in osteosarcoma. **Biomed Pharmacother.**

- 2017 Jun 1;90:872–9.
171. Wang Q, Qin X, Fang J, Sun X. Nanomedicines for the treatment of rheumatoid arthritis: State of art and potential therapeutic strategies. **Acta Pharm Sin B**. 2021 May 1;11(5):1158–74.
  172. Zheng M, Jia H, Wang H, Liu L, He Z, Zhang Z, et al. Application of nanomaterials in the treatment of rheumatoid arthritis. **RSC Adv**. 2021 Feb 10;11(13):7129–37.
  173. Chen M, Daddy KA, Xiao Y, Ping Q, Zong L. Advanced nanomedicine for rheumatoid arthritis treatment: focus on active targeting. **Expert Opin Drug Deliv**. 2017 Oct 3;14(10):1141–4.
  174. Kuperkar K, Patel D, Atanase LI, Bahadur P. Amphiphilic Block Copolymers: Their Structures, and Self-Assembly to Polymeric Micelles and Polymersomes as Drug Delivery Vehicles. **Polym**. 2022, Vol 14, Page 4702. 2022 Nov 3;14(21):4702.
  175. Tawfik SM, Azizov S, Elmasry MR, Sharipov M, Lee YI. Recent Advances in Nanomicelles Delivery Systems. **Nanomater**. 2021, Vol 11, Page 70. 2020 Dec 30;11(1):70.
  176. Rahdar A, Hasanein P, Bilal M, Beyzaei H, Kyzas GZ. Quercetin-loaded F127 nanomicelles: Antioxidant activity and protection against renal injury induced by gentamicin in rats. **Life Sci**. 2021 Jul 1;276:119420.
  177. Wang M, Wang Y, Qiao C, Wang S. Study on Central Composite Design Method to Optimize the Preparation Process of Chrysophanol-Pluronic F127 Nanomicelles and Pharmacokinetics. **J Nanomater**. 2022;2022.
  178. Noshi SH, Basha M, Awad GEA, Elsayyad NME. Miconazole Nitrate loaded Soluplus®-Pluronic® nano-micelles as promising Drug Delivery Systems for Ocular Fungal Infections: In vitro and In vivo Considerations. **Res J Pharm Technol**. 2022 Feb 1;15(2):501–11.
  179. Carvalho VFM, Salata GC, de Matos JKR, Costa-Fernandez S, Chorilli M, Steiner AA, et al. Optimization of composition and obtainment parameters of biocompatible nanoemulsions intended for intraductal administration of piperlongumine (piperlongumine) and mammary tissue targeting. **Int J Pharm**. 2019 Jun 24;567:118460–118460.
  180. Raval A, Pillai SA, Bahadur A, Bahadur P. Systematic characterization of Pluronic® micelles and their application for solubilization and in vitro release of some hydrophobic anticancer drugs. **J Mol Liq**. 2017 Mar 1;C(230):473–81.
  181. Meng X ying, Li J jia, Ni T junhong, Xiao-tong L, He T, Men Z ning, et al. Electro-responsive brain-targeting mixed micelles based on Pluronic F127 and D- $\alpha$ -tocopherol

- polyethylene glycol succinate–ferrocene. **Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.** 2020 Sep 20;601.
182. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech.** 2015 Apr 1;5(2):123–7.
183. Jiang X, Bai C, Liu M. Nanotechnology for microfluidics. **Nanotechnol Microfluid.** 2019 Dec 31;1–429.
184. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharm.** 2018, Vol 10, Page 57. 2018 May 18;10(2):57.
185. Kevadiya BD, Ottemann BM, Thomas M Ben, Mukadam I, Nigam S, McMillan JE, et al. Neurotheranostics as personalized medicines. **Adv Drug Deliv Rev.** 2019 Aug 1;148:252–89.
186. Augustine R, Hasan A, Primavera R, Wilson RJ, Thakor AS, Kevadiya BD. Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. **Mater Today Commun.** 2020 Dec 1;25:101692.
187. Lucas IT, Durand-Vidal S, Dubois E, Chevalet J, Turq P. Surface Charge Density of Maghemite Nanoparticles: Role of Electrostatics in the Proton Exchange. **J Phys Chem C.** 2007 Dec 20;111(50):18568–76.
188. Mohanty RP, Liu X, Ghosh D. Electrostatic driven transport enhances penetration of positively charged peptide surfaces through tumor extracellular matrix. **Acta Biomater.** 2020 Sep 1;113:240–51.
189. Hühn D, Kantner K, Geidel C, Brandholt S, De Cock I, Soenen SJH, et al. Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: Focusing on the sign of the net charge. **ACS Nano.** 2013 Apr 23;7(4):3253–63.
190. Donahue ND, Acar H, Wilhelm S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. **Adv Drug Deliv Rev.** 2019 Mar 15;143:68–96.
191. Xia T, Kovoichich M, Liong M, Zink JI, Nel AE. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. **ACS Nano.** 2008 Jan;2(1):85–96.
192. Lunnoo T, Assawakhajornsak J, Puangmali T. In Silico Study of Gold Nanoparticle Uptake into a Mammalian Cell: Interplay of Size, Shape, Surface Charge, and Aggregation. **J Phys Chem C.** 2019 Feb 14;123(6):3801–10.

193. Gorain B, Choudhury H, Patro Sisinthy S, Kesharwani P. Polymeric micelle-based drug delivery systems for tuberculosis treatment. **Nanotechnol Based Approaches Tuberc Treat**. 2020 Jan 1;175–91.
194. Patel M, Kaneko T, Matsumura K. Switchable release nano-reservoirs for co-delivery of drugs via a facile micelle–hydrogel composite. **J Mater Chem B**. 2017 May 17;5(19):3488–97.
195. Wang G, Wang JJ, Li F, To SST. Development and Evaluation of a Novel Drug Delivery: Pluronics/SDS Mixed Micelle Loaded with Myricetin in Vitro and in Vivo. **J Pharm Sci**. 2016 Apr 1;105(4):1535–43.
196. Kulthe SS, Inamdar NN, Choudhari YM, Shirolkar SM, Borde LC, Mourya VK. Mixed micelle formation with hydrophobic and hydrophilic Pluronic block copolymers: Implications for controlled and targeted drug delivery. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**. 2011 Dec 1;88(2):691–6.
197. Shaikh SJ, Patel HS, Ray D, Aswal VK, Singh S, Vijayvargia R, et al. Enhanced Solubility and Oral Bioavailability of Hydrophobic Drugs Using Pluronic Nanomicelles: An In-Vitro Evaluation. **ChemistrySelect**. 2021 Jul 27;6(28):7040–8.
198. Kaur J, Singla P, Kaur I. Labrasol mediated enhanced solubilization of natural hydrophobic drugs in Pluronic micelles: Physicochemical and in vitro release studies. **J Mol Liq**. 2022 Sep 1;361:119596.
199. Wheless JW, Phelps SJ. A Clinician’s Guide to Oral Extended-Release Drug Delivery Systems in Epilepsy. **J Pediatr Pharmacol Ther**. 2018 Jul 1;23(4):277.
200. Yu WJ, Huang DX, Liu S, Sha YL, Gao FH, Liu H. Polymeric Nanoscale Drug Carriers Mediate the Delivery of Methotrexate for Developing Therapeutic Interventions Against Cancer and Rheumatoid Arthritis. **Front Oncol**. 2020 Sep 16;10:1734.
201. Bannwarth B, Péhourcq F, Schaefferbeke T, Dehais J. Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. **Clin Pharmacokinet**. 1996;30(3):194–210.
202. Kanagawa H, Masuyama R, Morita M, Sato Y, Niki Y, Kobayashi T, et al. Methotrexate inhibits osteoclastogenesis by decreasing RANKL-induced calcium influx into osteoclast progenitors. **J Bone Miner Metab**. 2016 Sep 1;34(5):526–31.
203. Perpétuo IP, Caetano-Lopes J, Rodrigues AM, Campanilho-Marques R, Ponte C, Canhão H, et al. Methotrexate and low-dose prednisolone downregulate osteoclast function by decreasing receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B expression in monocytes

- from patients with early rheumatoid arthritis. **RMD open**. 2017 Jul 1;3(1).
204. Sun Y, Yao Y, Ding CZ. A combination of sinomenine and methotrexate reduces joint damage of collagen induced arthritis in rats by modulating osteoclast-related cytokines. **Int Immunopharmacol**. 2014 Jan;18(1):135–41.
205. Both T, Zillikens MC, Schreuders-Koedam M, Vis M, Lam WK, Weel AEAM, et al. Hydroxychloroquine affects bone resorption both in vitro and in vivo. **J Cell Physiol**. 2018 Feb 1;233(2):1424–33.
206. Toldi G, Batel P, Baráth S, Szerémy P, Apjok A, Filkor K, et al. Peripheral Lymphocyte Multidrug Resistance Activity as a Predictive Tool of Biological Therapeutic Response in Rheumatoid Arthritis. **J Rheumatol**. 2019 Jun 1;46(6):572–8.
207. Rendic S, Guengerich FP. Metabolism and Interactions of Chloroquine and Hydroxychloroquine with Human Cytochrome P450 Enzymes and Drug Transporters. **Curr Drug Metab**. 2020 Dec 9;21(14):1127–35.
208. Vezmar M, Georges E. Direct binding of chloroquine to the multidrug resistance protein (MRP): possible role for MRP in chloroquine drug transport and resistance in tumor cells. **Biochem Pharmacol**. 1998 Sep 15;56(6):733–42.
209. Oerlemans R, Van Der Heijden J, Vink J, Dijkmans BAC, Kaspers GJL, Lems WF, et al. Acquired resistance to chloroquine in human CEM T cells is mediated by multidrug resistance-associated protein 1 and provokes high levels of cross-resistance to glucocorticoids. **Arthritis Rheum**. 2006 Feb;54(2):557–68.
210. Hider SL, Owen A, Hartkoorn R, Khoo S, Back D, Silman AJ, et al. Down regulation of multidrug resistance protein-1 expression in patients with early rheumatoid arthritis exposed to methotrexate as a first disease-modifying antirheumatic drug. **Ann Rheum Dis**. 2006 Oct;65(10):1390.
211. Batrakova E V., Li S, Li Y, Alakhov VY, Kabanov A V. Effect of pluronic P85 on ATPase activity of drug efflux transporters. **Pharm Res**. 2004 Dec;21(12):2226–33.
212. Wang C, Li F, Zhang T, Yu M, Sun Y. Recent advances in anti-multidrug resistance for nano-drug delivery system. **Drug Deliv**. 2022;29(1):1684–97.
213. Miller DW, Batrakova E V., Kabanov A V. Inhibition of multidrug resistance-associated protein (MRP) functional activity with pluronic block copolymers. **Pharm Res**. 1999;16(3):396–401.
214. Cheng X, Lv X, Xu J, Zheng Y, Wang X, Tang R. Pluronic micelles with suppressing doxorubicin efflux and detoxification for efficiently reversing breast cancer resistance. **Eur J Pharm Sci**. 2020 Apr 15;146.



215. Mahmoud AM, Hozayen WG, Ramadan SM. Berberine ameliorates methotrexate-induced liver injury by activating Nrf2/HO-1 pathway and PPAR $\gamma$ , and suppressing oxidative stress and apoptosis in rats. **Biomed Pharmacother**. 2017 Oct 1;94:280–91.
216. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. **Arthritis Rheum**. 1977 Apr 1;20(3):841–50.
217. Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. 2018 May 4;40(3):193–200.
218. Zhao Z, Hua Z, Luo X, Li Y, Yu L, Li M, et al. Application and pharmacological mechanism of methotrexate in rheumatoid arthritis. **Biomed Pharmacother**. 2022 Jun 1;150:113074.
219. Fares AR, Elmehad AN, Kassem MAA. Enhancement of dissolution and oral bioavailability of lacidipine via pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: formulation, optimization using central composite design and in vivo bioavailability study. **Drug Deliv**. 2018;25(1):132.
220. Shaker MA, Elbadawy HM, Shaker MA. Improved solubility, dissolution, and oral bioavailability for atorvastatin-Pluronic® solid dispersions. **Int J Pharm**. 2020 Jan 25;574:118891.

APÊNDICE A – Resumo do artigo publicado no Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

## Journal Pre-proof

Factors affecting the biological response of Graphene

Tais Monteiro Magne, Thamires de Oliveira Vieira, Bianca Costa, Luciana Magalhães Rebelo Alencar, Eduardo Ricci-Junior, Rui Hu, Junle Qu, Camilo Zamora Ledzema, Frank Alexis, Ralph Santos-Oliveira



PII: S0927-7765(21)00211-3

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111767>

Reference: COLSUB 111767

To appear in: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*

Received Date: 3 September 2020

Revised Date: 26 March 2021

Accepted Date: 12 April 2021

Please cite this article as: Magne TM, de Oliveira Vieira T, Costa B, Alencar LMR, Ricci-Junior E, Hu R, Qu J, Ledzema CZ, Alexis F, Santos-Oliveira R, Factors affecting the biological response of Graphene, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2021), doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111767>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

## APÊNDICE B – Resumo do artigo publicado no Journal of Nanostructure in Chemistry

Journal of Nanostructure in Chemistry  
<https://doi.org/10.1007/s40097-021-00444-3>

REVIEW



### Graphene and its derivatives: understanding the main chemical and medicinal chemistry roles for biomedical applications

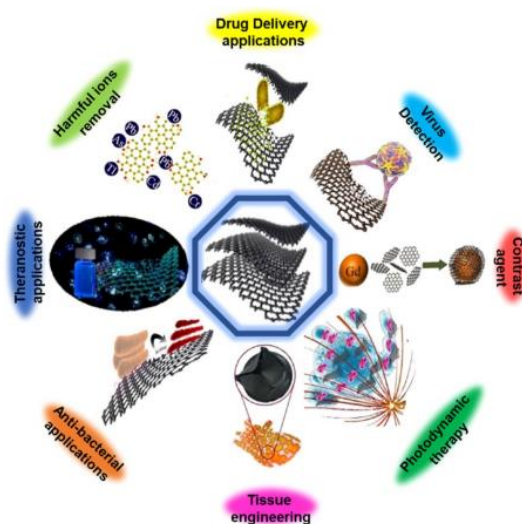
Tais Monteiro Magne<sup>1</sup> · Thamires de Oliveira Vieira<sup>1</sup> · Luciana Magalhães Rebelo Alencar<sup>2</sup> · Francisco Franciné Maia Junior<sup>3</sup> · Sara Gemini-Piperni<sup>4</sup> · Samuel V. Carneiro<sup>5</sup> · Lillian M. U. D. Fechine<sup>5</sup> · Rafael M. Freire<sup>6</sup> · Kirill Golokhvast<sup>7,8</sup> · Pierangelo Metrangolo<sup>9</sup> · Pierre B. A. Fechine<sup>5</sup> · Ralph Santos-Oliveira<sup>1,10</sup>

Received: 25 June 2021 / Accepted: 30 August 2021  
 © Islamic Azad University 2021

#### Abstract

Over the past few years, there has been a growing potential use of graphene and its derivatives in several biomedical areas, such as drug delivery systems, biosensors, and imaging systems, especially for having excellent optical, electronic, thermal, and mechanical properties. Therefore, nanomaterials in the graphene family have shown promising results in several areas of science. The different physicochemical properties of graphene and its derivatives guide its biocompatibility and toxicity. Hence, further studies to explain the interactions of these nanomaterials with biological systems are fundamental. This review has shown the applicability of the graphene family in several biomedical modalities, with particular attention for cancer therapy and diagnosis, as a potent theranostic. This ability is derivative from the considerable number of forms that the graphene family can assume. The graphene-based materials biodistribution profile, clearance, toxicity, and cytotoxicity, interacting with biological systems, are discussed here, focusing on its synthesis methodology, physicochemical properties, and production quality. Despite the growing increase in the bioavailability and toxicity studies of graphene and its derivatives, there is still much to be unveiled to develop safe and effective formulations.

#### Graphic abstract



**Keywords** Graphene · Nanomaterials · Carbon · Nanoparticles · Nanomedicine

Extended author information available on the last page of the article

Review | [Published: 07 April 2022](#)

## Lycopene as a Multifunctional Platform for the Treatment of Cancer and Inflammation

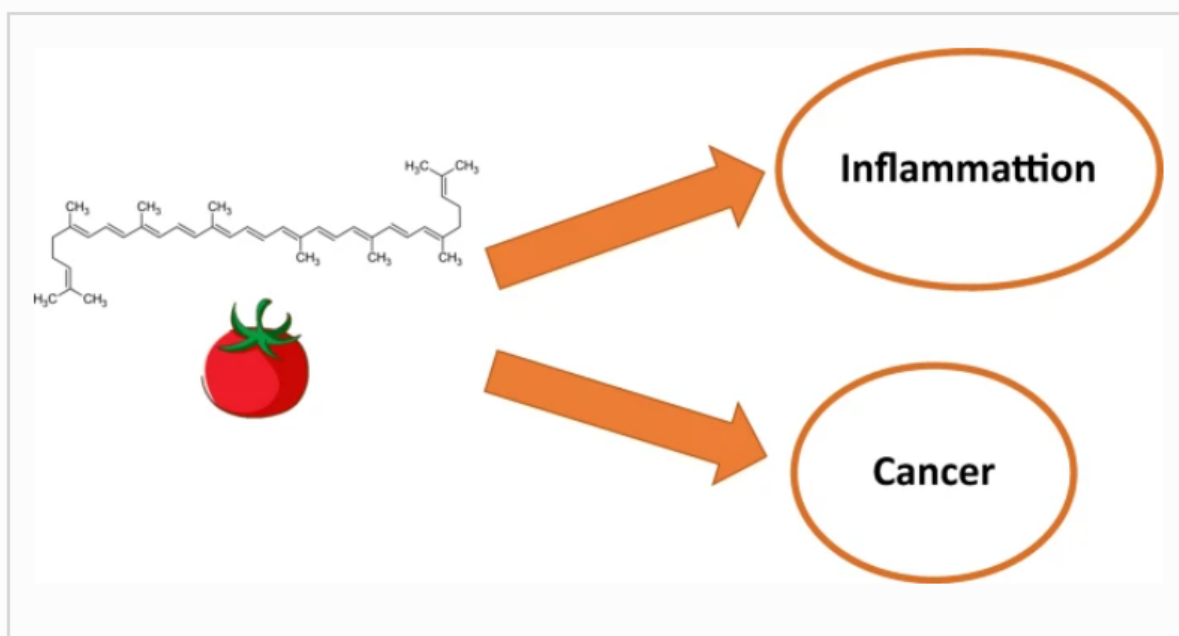
[Tais Monteiro Magne](#), [Aline Oliveira da Silva de Barros](#), [Pierre Basílio de Almeida Fachine](#), [Luciana Magalhães Rebelo Alencar](#), [Eduardo Ricci-Junior](#) & [Ralph Santos-Oliveira](#) 

*Revista Brasileira de Farmacognosia* **32**, 321–330 (2022) | [Cite this article](#)

**280** Accesses | **3** Citations | **2** Altmetric | [Metrics](#)

### Abstract

Lycopene is a carotenoid containing provitamin A, with a potent antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor effect. The use of oyster lycopene as a nutraceutical has increased in the last few years, especially due to its anti-inflammatory and antitumor properties. These properties rely on inhibiting several endogenous interleukins and the activation of several antitumor mechanisms like the inhibition of the production of nitric oxide and inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha; interleukins of the families 1, 6, and 8; and interferon gamma. In this review, the main mechanisms involved in both anti-inflammatory and antitumor properties of lycopene are summarized to consider its applications as an anticancer agent using the advantages of nanotechnology.



## APÊNDICE D – Resumo do artigo publicado no Viruses



Article

## Zika Virus (ZIKV): A New Perspective on the Nanomechanical and Structural Properties

Maria Luiza de Araujo Dorneles <sup>1</sup>, Ruana Cardoso-Lima <sup>1</sup>, Pedro Filho Noronha Souza <sup>2,3</sup>, Daniela Santoro Rosa <sup>4</sup>, Tais Monteiro Magne <sup>5</sup>, Ralph Santos-Oliveira <sup>5,6</sup> and Luciana Magalhães Rebelo Alencar <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Physics Department, Federal University of Maranhão, São Luís 65020070, Brazil

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza 60440900, Brazil

<sup>3</sup> Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza 60440900, Brazil

<sup>4</sup> Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of São Paulo, São Paulo 04023062, Brazil

<sup>5</sup> Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Rio de Janeiro 21941906, Brazil

<sup>6</sup> Laboratory of Nanoradiopharmacy, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro 23070200, Brazil

\* Correspondence: luciana.alencar@ufma.br



**Citation:** de Araujo Dorneles, M.L.; Cardoso-Lima, R.; Souza, P.F.N.; Santoro Rosa, D.; Magne, T.M.; Santos-Oliveira, R.; Alencar, L.M.R. Zika Virus (ZIKV): A New Perspective on the Nanomechanical and Structural Properties. *Viruses* **2022**, *14*, 1727. <https://doi.org/10.3390/v14081727>

**Abstract:** Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) from Flavivirus. In 2015, Brazil and other Latin American countries experienced an outbreak of ZIKV infections associated with severe neurological disorders such as Guillain–Barre syndrome (GBS), encephalopathy, and encephalitis. Here, a complete mechanical and structural analysis of the ZIKV has been performed using Atomic Force Microscopy (AFM). AFM analysis corroborated the virus mean size (~50 nm) and icosahedral geometry and revealed high mechanical resistance of both: the viral surface particle (~200 kPa) and its internal content (~800 kPa). The analysis demonstrated the detailed organization of the nucleocapsid structure (such as RNA strips). An interesting finding was the discovery that ZIKV has no surface self-assembling property. These results can contribute to the development of future treatment candidates and circumscribe the magnitude of viral transmission.

**Keywords:** ZIKV; physical virology; ultrastructure; AFM; arbovirus

## APÊNDICE E – Resumo do artigo publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia

Revista Brasileira de Farmacognosia  
<https://doi.org/10.1007/s43450-022-00338-7>

REVIEW



### Nano-Nutraceuticals for Health: Principles and Applications

Tais Monteiro Magne<sup>1</sup> · Luciana Magalhães Rebelo Alencar<sup>2</sup> · Samuel Veloso Carneiro<sup>3</sup> ·  
Lillian Maria Uchoa Dutra Fachine<sup>3</sup> · Pierre Basílio Almeida Fachine<sup>3</sup> · Pedro Filho Noronha Souza<sup>4</sup> ·  
Filipe Leal Portilho<sup>1</sup> · Aline Oliveira da Silva de Barros<sup>1</sup> · Seyed Ali Johari<sup>5</sup> · Eduardo Ricci-Junior<sup>6</sup> ·  
Ralph Santos-Oliveira<sup>1,7</sup>

Received: 13 September 2022 / Accepted: 8 November 2022  
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2022

#### Abstract

The use of nanotechnological products is increasing steadily. In this scenario, the application of nanotechnology in food science and as a technological platform is a reality. Among the several applications, the main use of this technology is for the development of foods and nutraceuticals with higher bioavailability, lower toxicity, and better sustainability. In the health field, nano-nutraceuticals are being used as supplementary products to treat an increasing number of diseases. This review summarizes the main concepts and applications of nano-nutraceuticals for health, with special focus on treating cancer and inflammation.

**Keywords** Cancer · Drug · Food science · Inflammation · Nanoparticles · Nanotechnology