



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS



**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA EFICÁCIA ANTIMALÁRICA, TOXICIDADE  
CARDIOVASCULAR E NEUROCOMPORTAMENTAL DO ARTEMÉTER  
POR VIA ORAL VEICULADO EM NANOCÁPSULAS**

Ana Carolina Moreira Souza

OURO PRETO - MG

2017

Ana Carolina Moreira Souza

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA EFICÁCIA ANTIMALÁRICA, TOXICIDADE  
CARDIOVASCULAR E NEUROCOMPORTAMENTAL DO ARTEMÉTER  
POR VIA ORAL VEICULADO EM NANOCÁPSULAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma) da Universidade Federal de Ouro Preto, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dra. Andrea Grabe Guimarães

Coorientadores: Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Dr. Sylvain Richard

Ouro Preto-MG

2017



Sessão de defesa da 13ª tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas a ANA CAROLINA MOREIRA SOUZA com a defesa da tese intitulada: "AVALIAÇÃO IN VIVO DA EFICÁCIA ANTIMALÁRICA, TOXICIDADE CARDIOVASCULAR E NEUROCOMPORTAMENTAL DO ARTEMÊTER POR VIA ORAL VEICULADO EM NANOCÁPSULAS", avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 20 de dezembro de 2017.

Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes  
UFMG

Profa. Dra. Elaine Amaral Leite  
UFMG

Profa. Dra. Maria Terezinha Bahia  
UFOP

Prof. Dr. Mauro César Isoldi  
UFOP

Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães  
UFOP

S729a

Souza, Ana Carolina Moreira.

Avaliação in vivo da eficácia antimalárica, toxicidade cardiovascular e neurocomportamental do arteméter por via oral veiculado em nanocápsulas [manuscrito] / Ana Carolina Moreira Souza. - 2017.

142f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr Andrea Grabe Guimarães.

Coorientador: Prof. Dr. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Nanocápsulas. 2. Arteméter. 3. Malária. 4. Cardiotoxicidade. 5. Neurotoxicidade. I. Grabe Guimarães, Andrea. II. Furtado Mosqueira, Vanessa Carla. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.936

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)

## Equipe

Dra. Andrea Grabe Guimarães, Laboratório de Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma), Escola de Farmácia, UFOP, Ouro Preto, MG

Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira, Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, (CiPharma), Escola de Farmácia, UFOP, Ouro Preto, MG

Dr. Sylvain Richard, Fisiologia e Medicina Experimental do Coração e Músculos - PHYMEDEXP, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Universidade de Montpellier - Montpellier, França

Colaboradores: Dr. Jader dos Santos Cruz, Departamento de Imunologia e Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

MSc. Artur Santos Miranda. Departamento de Imunologia e Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Dr.Charotte Farah, PHYMEDEXP, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Universidade de Montpellier - Montpellier, França.

Dr. Frank Aimond, PHYMEDEXP, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Universidade de Montpellier - Montpellier, França

Discentes de Farmácia: Ana Paula Amariz Silveira (PIBIC/UFOP); Lidiane Rodrigues Antunes (PIP/UFOP)

**Apoio Financeiro:** Este trabalho recebeu financiamento do programa CAPES-COFECUB em projeto de colaboração coordenado pela Profa. Vanessa C. F. Mosqueira (Brasil) e pelo Dr. Sylvain Richard (França) (nº768/13); Rede NANOBIOIMG (# 0007-14 e #40/11), Projetos FAPEMIG (APQ 01510-14; PPM# 00432-13; # CDS-PPM-00481-13); Bolsa doutorado CAPES, Brasil. A UFOP forneceu toda a infraestrutura e condições básicas para a realização do trabalho e as bolsas de iniciação científica.

*Mas graças a Deus, que sempre nos conduz vitoriosamente em Cristo e por nosso intermédio exala em todo lugar a fragrância do seu conhecimento*

*2 Coríntios 2:14*

*Ao meu marido, Luiz Rafael e aos meus pais,  
Neide e Celso, pelo amor e apoio incondicionais.*

*Vocês acreditaram mesmo quando parecia  
impossível!*

## **Agradecimentos**

À Deus, por me dar forças para seguir em frente. Por iluminar a minha vida e colocar em meus caminhos pessoas abençoadas que estavam dispostas a dividir comigo seus conhecimentos, tempo e amizade.

À Andrea que há uma década me orienta e compartilha comigo todo seu conhecimento. Obrigada por sua amizade e pela agradável convivência ao longo destes anos. Você é a grande responsável pela concretização desta etapa. Obrigada pela oportunidade, confiança e incentivo.

Aos meus coorientadores, Vanessa e Sylvain, pelos ensinamentos. Obrigada pela paciência e pelo tempo dedicado com estudos e pesquisas.

Ao meu marido, Luiz Rafael, por sua cumplicidade e por colocar meus sonhos como prioridade em nossas vidas. Obrigada por todo seu apoio e por me dar forças quando a distância causava saudade. Você é a essência da minha vida.

À minha família por compreender a minha ausência, por se alegrarem com minhas conquistas, por se orgulharem de mim e confiarem em meu trabalho. Aos meus pais, Celso e Neide, meus maiores incentivadores, por sempre acreditarem em meu potencial e que tudo daria certo. Vocês são meu alicerce e a força que me impulsionou para chegar até aqui! Às minhas afilhadas Marina e Maria Eduarda que mudaram a minha vida me ensinando uma nova maneira de amar e por encherem meus dias de alegria. Aos meus irmãos, Camilo e Mariana, e aos meus cunhados Daniel e Thalita, por me darem o maior e melhor presente que irmãos e cunhados podem dar, minhas afilhadas. Amo vocês!

Aos meus sogros, Vilma e Marcinho e à minha cunhada Ana Luiza por sempre terem uma palavra de incentivo e conforto. Obrigada pelo carinho!

Às queridas amigas, Liliam e Marcela, por dividirem comigo a experiência de viver em outro país, vocês me deram força para superar as adversidades. Obrigada pelo carinho, cumplicidade, conselhos, sorrisos e abraços fraternais. Liliam, obrigada pela valiosa contribuição nos experimentos de eletrofisiologia. Agradeço também a Joana, Tati e Nour pelos momentos de alegria vividos na França.



Aos professores e colegas do laboratório de farmacologia experimental pela troca de experiências e conhecimento. Agradeço, em especial, às minhas grandes amigas Quênia e Dani, por estarem presentes sempre que precisei. Obrigada por todo apoio, cumplicidade e incentivo.

Aos meus eternos alunos de IC, Ana Paula, Lidiane e Rafael, pelos inúmeros finais de semana de experimentação, por toda dedicação e comprometimento. Vocês foram essenciais na concretização desta etapa.

Aos colegas do laboratório de desenvolvimento galênico e nanotecnologia pelo suporte no preparo das nanocápsulas e em especial à Giani pela valiosa contribuição nos testes de liberação e estabilidade.

Ao professor Jader e ao Artur pela disponibilidade, por compartilharem seus conhecimentos e pela valiosa contribuição com testes de patch-clamp.

Ao professor Homero pelo sistema de aquisição de dados e pelo auxílio na resolução de problemas.

Aos professores do CiPharma pelos ensinamentos e aos funcionários pela dedicação e carinho com o qual sempre desenvolveram seus trabalhos.

À UFOP pelas oportunidades, pelo conhecimento e por ter me proporcionado tantos bons momentos.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária do Ministério da Saúde pela doação das ampolas de Artesiane ®.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas .....	i
Lista de tabelas .....	ii
Lista de figuras .....	iii
Resumo .....	vi
Abstract.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	5
2.1 Malária.....	5
2.1.1 Aspectos gerais .....	5
2.1.2 Terapêutica Antimalárica.....	7
2.1.3 Toxicidade dos antimaláricos .....	11
2.2 Nanotecnologia na terapêutica da malária.....	12
3 OBJETIVOS .....	16
Objetivo Geral .....	16
<i>CAPÍTULO 1</i> .....	17
FORMULAÇÃO DE ARTEMÉTER.....	17
1.1 Introdução.....	17
1.2 Objetivo específico .....	18
1.3 Metodologia.....	18
1.3.1 Materiais .....	18
1.3.2 Preparação das formulações de ATM.....	18
1.3.4 Análise de tamanho e potencial zeta.....	19
1.3.5 Solubilidade do ATM .....	19
1.3.6 Cinética de liberação <i>in vitro</i> .....	20
1.3.7 Análise estatística .....	20
1.4 Resultados e Discussão.....	21
1.4.1 Análise de tamanho e potencial zeta.....	21

1.4.2 Solubilidade do ATM e Cinética de dissolução/liberação <i>in vitro</i> .....	22
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	25
<b>AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMALÁRICA DO ARTEMÉTER <i>IN VIVO</i></b> .....	25
2.1 Introdução.....	25
2.2 Objetivo específico .....	25
2.3 Metodologia.....	25
2.3.1 Animais.....	25
2.3.2 Protocolo de tratamento .....	26
2.3.3 Eficácia antimalárica .....	26
2.3.4 Sobrevida de camundongos não infectados .....	27
2.3.5 Análise estatística .....	28
2.4 Resultados e Discussão.....	28
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	32
<b>AVALIAÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE DO ARTEMÉTER</b> .....	32
3.1 Introdução.....	32
3.2 Objetivos específicos .....	36
3.3 Metodologia.....	37
3.3.1 Avaliação da atividade citotóxica do ATM.....	37
3.3.2 Isolamento dos cardiomiócitos .....	37
3.3.4 Contração e medidas de Ca <sup>2+</sup> intracelular dos cardiomiócitos .....	38
3.3.5 Eletrofisiologia: Potencial de ação e canais de Ca <sup>2+</sup> do tipo L.....	39
3.3.6 Ecocardiograma .....	40
3.3.7 Eletrocardiograma .....	41
3.4 Resultados e Discussão.....	42
3.4.1 Avaliação da atividade citotóxica do ATM.....	42
3.4.2 Contração e medidas de Ca <sup>2+</sup> intracelular em cardiomiócitos .....	43
3.4.3 Eletrofisiologia: Potencial de ação e canais de Ca <sup>2+</sup> do tipo L.....	50

3.4.4	Ecocardiograma .....	53
3.4.5	Eletrocardiograma.....	54
<i>CAPÍTULO 4</i> .....		66
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NEUROCOMPORTAMENTAL DO ARTEMÉTER .....		66
4.1	Introdução .....	66
4.2	Objetivo específico .....	67
4.3	Metodologia.....	67
4.3.1	Labirinto de cruz elevado .....	67
4.3.2	Campo aberto (Open Field) .....	68
4.3.3	Haste Girante (Rota Road) .....	68
4.3.4	Barra de Tração .....	68
4.4	Resultados e Discussão.....	70
4.4.1	Labirinto em cruz elevado .....	70
4.4.2	Campo aberto .....	73
4.4.3	Haste girante .....	76
4.4.4	Barra de Tração.....	76
4	DISCUSSÃO GERAL.....	79
5	CONCLUSÕES .....	84
6	PERSPECTIVAS .....	85
6	REFERÊNCIAS .....	86
7	ANEXOS .....	111

## Lista de abreviaturas

AEC	Acoplamento excitação contração
ATC	Terapia de combinação a base de artemisinina e seus derivados
ATM	Arteméter
ATM-NC	Nanocápsulas contendo arteméter
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Carboximetilcelulose sódica
DP	Desvio padrão
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
NC	Nanocápsulas
PA	Potencial de ação
PCL	Poli-ε-caprolactona
PCR	Reação em cadeia polimerase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
TdP	<i>Torsades de Pointes</i>
TDR	Teste de diagnóstico rápido
TNF	Fator de necrose tumoral

## Lista de tabelas

Tabela 1: Antimaláricos veiculados em nanocarreadores	15
Tabela 1.1: Características físico-químicas das nanocápsulas de arteméter.....	23
Tabela 1.2: Dissolução/libração de ATM livre e ATM-NC.....	25
Tabela 3.1: Parâmetros do ecocardiograma (média $\pm$ EPM) dos camundongos tratados com ATM livre e nanocápsulas de ATM na dose de 120 mg/kg (n = 6).....	54
Tabela 8.1. Avaliação do percentual de parasitemia e sobrevida de camundongos tratados com NC-branca; veículo; ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, nos dias 3, 6, 11, 14, 21 e 30 dias após a infecção.....	109
Tabela 8.2.1: Análise da coordenação motora e equilíbrio de camundongos não infectados e tratados com NC-branca; veículo; ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, nos tempos de 6 e 24 horas após a última administração oral.....	110
Tabela 8.2.2: análise da coordenação motora e equilíbrio de camundongos infectados e tratados com NC-branca; veículo; ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, nos tempos de 6 e 24 horas após a última administração oral.....	110
Tabela 8.3.1: Análise do tônus muscular de camundongos não infectados e tratados com NC-branca; veículo; ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, nos tempos de 6 e 24 horas após a última administração oral.....	111
Tabela 8.3.2: Análise do tônus muscular de camundongos infectados e tratados com NC-branca; veículo; ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, nos tempos de 6 e 24 horas após a última administração oral.....	111

## Lista de figuras

Figura 1: Estrutura química da artemisinina e seus derivados (1) artemisinina; (2) dihidroartemisinina; (3) arteméter; (4) arteéter; (5) artesunato (KRISHNA; UHLEMANN; HAYNES, 2004).....	10
Figura 1.1: Potencial zeta e índice de polidispersão das nanocápsulas contendo ATM (ATM-NC) no decorrer de três meses.....	23
Figure 1.2: Dissolução/Liberação de ATM de PCL-NC em solução salina tampão fosfato. <i>Insert</i> : perfil de liberação em 24 horas. Os dados são a média de três experimentos independentes $\pm$ DP (n = 3).....	25
Figura 2.1: Esfregaço sanguíneo de camundongos infectados com <i>P. berghei</i> . As setas mostram as hemácias infectadas com o parasita em diferentes estágios de amadurecimento intraeritrocitário. (A) Trofozoítos jovens; (B) Esquizontes maduros, formas assexuadas do parasita; (C) Gametócitos, formas sexuadas do parasita.....	28
Figura 2.2: Percentual de parasitas em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> após o tratamento por via oral com veículo, NC-branca, ATM livre ou ATM-NC. A: 40 mg/kg de ATM; B: 80 mg/kg de ATM; C: 120 mg/kg de ATM. A linha vertical pontilhada indica o primeiro dia de tratamento.....	31
Figura 2.3: Percentual de sobrevivência de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> após o tratamento por via oral com veículo, NC-branca, ATM livre ou ATM-NC. A: 40 mg/kg de ATM; B: 80 mg/kg de ATM; C: 120 mg/kg de ATM. A linha vertical pontilhada indica o primeiro dia de tratamento.....	32
Figura 3.1: Transporte de $Ca^{2+}$ em miócitos ventriculares, ativação dos miofilamentos e representação do potencial de ação causado pelo aumento transitório das concentrações do íon $Ca^{2+}$ (BERS, 2002).....	34
Figura 3.2: Traçado eletrocardiográfico de homem adulto sadio (FELDMAN; GOLDWASSER, 2004).....	35
Figura 3.3: Efeito de concentrações crescentes do ATM livre sobre o crescimento de células isoladas de aorta de rato (média $\pm$ EPM).....	44
Figura 3.4: Exposição aguda dos cardiomiócitos isolados de camundongos sem tratamento ao ATM livre nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 $\mu$ M.....	46
Figura 3.5: Registros representativos de ondas de $Ca^{2+}$ durante os períodos de estimulação (1 Hz) e repouso de cardiomiócitos isolados de camundongos não tratados após exposição aguda ao ATM livre (0,1, 1,0 e 10 $\mu$ M).....	47
Figura 3.6: Parâmetros da contratilidade e dos níveis intracelulares de $Ca^{2+}$ em cardiomiócitos de camundongos previamente tratados com veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC, dose 120 mg/kg (média $\pm$ EPM).....	49
Figura 3.7: Registros representativos de ondas de $Ca^{2+}$ durante os períodos de estimulação (1 Hz) e repouso de cardiomiócitos isolados de camundongos tratados	

com veículo; NC-branca; ATM livre; ATM-NC (A-D) Os cardiomiócitos foram isolados 2 horas após a última dose.....	50
Figura 3.8: Registro do potencial de ação dos cardiomiócitos (média ± EPM).....	52
Figura 3.9: Efeitos de ATM livre e ATM-NC em canais de cálcio de tipo L (média ± EPM).....	53
Figura 3.10: Intervalo PR (média ± EPM) do ECG de camundongos não infectados e infectados com <i>P. berghei</i> . Efeitos do ATM sobre o intervalo PR do ECG nos tempos de 2, 6 e 24 horas para animais não infectados e tempos de 6 e 24 horas para animais infectados após a última dose do tratamento com ATM livre, ATM-NC, ambos nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, ou NC-branca e veículo (controles). A, B e C: Camundongos não infectados. D, E, F: camundongos infectados.....	57
Figura 3.11: Intervalo QRS (média ± EPM) do ECG de camundongos não infectados e infectados com <i>P. berghei</i> . Efeitos do ATM sobre o intervalo QRS do ECG nos tempos de 2, 6 e 24 horas para animais não infectados e tempos de 6 e 24 horas para animais infectados após a última dose do tratamento com ATM livre, ATM-NC, ambos nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, ou NC-branca e veículo (controles). A, B e C: Camundongos não infectados. D, E, F: camundongos infectados.....	58
Figura 3.12: Intervalos QT (média ± EPM) do ECG de camundongos não infectados e infectados com <i>P. berghei</i> . Efeitos do ATM sobre o intervalo QRS do ECG nos tempos de 2, 6 e 24 horas para animais não infectados e tempos de 6 e 24 horas para animais infectados após a última dose do tratamento com ATM livre, ATM-NC, ambos nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, ou NC-branca e veículo (controles). A, B e C: Camundongos não infectados. D, E, F: camundongos infectados.....	59
Figura 3.13: Intervalos QTc (média ± EPM) do ECG de camundongos não infectados e infectados com <i>P. berghei</i> . Efeitos do ATM sobre o intervalo QRS do ECG nos tempos de 2, 6 e 24 horas para animais não infectados e tempos de 6 e 24 horas para animais infectados após a última dose do tratamento com ATM livre, ATM-NC, ambos nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, ou NC-branca e veículo (controles). A, B e C: Camundongos não infectados. D, E, F: camundongos infectados.....	60
Figura 3.14: Registros ECG representativos de camundongos não infectados e com <i>P. berghei</i> . Registros de ECG mostrando os efeitos do tratamento com NC-branca (A e D), ATM livre (B e E), e ATM-NC (C e F), todos referente ao efeito da dose de 120 mg/kg sobre o intervalo QT de camundongos não infectados (A, B, C) e camundongos infectados (D, E, F). Em (A) está demonstrado as ondas P, R, S e T, enquanto (B) demonstra os intervalos RR, PR, QRS e QT.....	53
Figura 4.1: Aparatos utilizados para avaliação neurocomportamental; campo aberto (A), labirinto de cruz elevado (B), haste girante (C), tração (D).....	69
Figura 4.2: Avaliação da ansiedade e da atividade locomotora determinadas no labirinto em cruz elevado para camundongos não infectados (média ± EPM). Número	



de entradas nos braços abertos (A, B, C) e fechados (D, E, F) após o tratamento com veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC nas doses de 40 mg/kg (A, D), 80 mg/kg (B, E) e 120 mg/kg (C, F) (n = 8).....	71
Figura 4.3: Avaliação da ansiedade e da atividade locomotora determinadas no labirinto em cruz elevado para camundongos infectados (média ± EPM). Número de entradas nos braços abertos (A, B, C) e fechados (D, E, F) após o tratamento com veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC nas doses de 40 mg/kg (A, D), 80 mg/kg (B, E) e 120 mg/kg (C, F) (n =8).....	72
Figura 4.4: Avaliação da atividade locomotora determinadas no campo aberto para camundongos não infectados (média ± EPM). Número de campos visitados (A, B, C), total de <i>rearing</i> (levantamento das patas dianteiras, sustentando o corpo apenas nas patas traseiras) (D, E, F), total de <i>grooming</i> (auto limpeza) após o tratamento com veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC nas doses de 40 mg/kg (A, D, G), 80 mg/kg (B, E, H) e 120 mg/kg (C, F, I) (n =8).....	74
Figura 4.5: Avaliação da atividade locomotora determinadas no campo aberto para camundongos infectados (média ± EPM). Número de campos visitados (A, B, C), total de <i>rearing</i> (levantamento das patas dianteiras, sustentando o corpo apenas nas patas traseiras) (D, E, F), total de <i>grooming</i> (auto limpeza) após o tratamento com veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC nas doses de 40 mg/kg (A, D, G), 80 mg/kg (B, E, H) e 120 mg/kg (C, F, I) (n =8).....	75

## Resumo

O arteméter (ATM) é um antimalárico utilizado clinicamente em combinação (ATC) com outros antimaláricos (WHO, 2016). Apresenta meia vida plasmática curta, baixa biodisponibilidade por via oral e toxicidade cardiovascular e neurológica, entre outros efeitos adversos. Nanocápsulas de poly-ε-caprolactona veiculando ATM (ATM-NC) foram desenvolvidas e caracterizadas anteriormente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia antimalárica *in vivo* e os efeitos cardiovasculares e neurocomportamentais de ATM-NC administrado por via oral em comparação ao ATM em sua forma livre. Foram utilizados camundongos C57BL6 fêmeas previamente infectados por *Plasmodium berghei* para a avaliação da eficácia antimalárica e machos para a avaliação dos efeitos cardiovasculares e neurocomportamentais. Os animais foram tratados por via oral, duas vezes ao dia por 4 dias com veículo (sorbitol/carboximetilcelulose) ou NC branca, ATM livre ou ATM-NC, nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg. ATM-NC (120 mg/kg) aboliram a parasitemia e promoveram a sobrevida de 100 %. Para avaliar a cardiotoxicidade foram realizados: 1) eletrocardiograma (ECG) na derivação periférica II antes e após o tratamento em camundongos anestesiados, não infectados e infectados. O ATM livre induziu cardiotoxicidade evidenciado pelo prolongamento dos intervalos QT e QTc. Para a maior dose estudada (120 mg/kg), em camundongos não infectados, ATM-NC impediu estes prolongamentos em 34 % e 30 %, respectivamente, comparado ao ATM livre. Nos camundongos infectados, ATM-NC também reduziu o prolongamento dos intervalos QT e QTc em 28 % e 27 %, respectivamente. 2) Ecocardiograma (ECO) foi realizado em camundongos não infectados e tratados com ATM livre e ATM-NC na dose de 120 mg/kg. Para este estudo não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos avaliados. Os cardiomiócitos de camundongos previamente tratados com a dose de 120 mg/kg foram isolados e avaliados *in vitro* 3) sob estimulação em campo (1 Hz) em sistema Ionoptix para o transiente de  $Ca^{2+}$  e contratilidade do sarcômero, 4) em sistema patch-clamp para o potencial de ação (PA) e a corrente nos canais de  $Ca^{2+}$ . O ATM livre reduziu o transiente de  $Ca^{2+}$  em 41 %, o  $Ca^{2+}$  diastólico em 12 % e a porcentagem de encurtamento do sarcômero de 4,6 % (controle) para 3,1 %. Além disso, o ATM livre causou o prolongamento do PA comparado ao veículo ( $350,0 \pm 49,3$  ms e  $137,7 \pm 20,5$  ms, respectivamente). 5) Cardiomiócitos de camundongos não tratados foram isolados e incubados com ATM livre nas concentrações 0,1; 1 e 10  $\mu$ M. ATM livre 10  $\mu$ M reproduziu os efeitos sobre  $Ca^{2+}$  observados nos cardiomiócitos dos camundongos tratados, assim indicando efeitos cardiotoxícos. Por outro lado, ATM-NC não causou nenhuma alteração significativa em nenhum dos parâmetros avaliados. A avaliação da neurotoxicidade foi realizada em camundongos não infectados e infectados. Para os camundongos não infectados o ATM livre (120 mg/kg) reduziu significativamente a capacidade de exploração nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, indicando transtorno neurocomportamental como a ansiedade. Para animais infectados o tratamento com ATM livre (120 mg/kg) desencadeou comportamentos similares a ansiedade e diminuiu a capacidade locomotora dos camundongos, pois reduziu em 65 % e 67 % a capacidade exploratória dos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado. ATM-NC impediu a manifestação dos efeitos neurocomportamentais em camundongos não infectados e reduziu os efeitos sobre os camundongos infectados. Concluímos que o ATM em NC apresentou eficácia por via oral e que NC são capazes de impedir ou minimizar os efeitos cardiotoxícos e neurocomportamentais causados pelo ATM em sua forma livre.

**Palavras-chave:** malária; arteméter; nanocápsulas; eficácia; cardiotoxicidade; neurotoxicidade.

## Abstract

Artemether (ATM) is an antimalarial drug used clinically in combination with other antimalarials (ACT) (WHO, 2016). It presents short plasma half-life, low oral bioavailability and cardiovascular and neurological toxicity, among other adverse effects. Nanocapsules of poly- $\epsilon$ -caprolactone (NC-PCL) loading ATM (ATM-NC) have been developed and characterized previously. The aim of this study was to evaluate the antimalarial efficacy *in vivo* and cardiovascular and neurological effects of orally administered ATM-NC. Female C57BL6 mice were used for evaluation of antimalarial efficacy and males for the evaluation of cardiovascular and neurobehavioral effects. The mice were orally treated twice daily for 4 days with vehicle (sorbitol / carboxymethylcellulose) or free ATM; blank NC or ATM-NC, at doses 40, 80 and 120 mg/kg. Antimalarial efficacy was evaluated in infected mice with *Plasmodium berghei*. ATM-NC (120 mg/kg) reduced the number of parasites and increased survival to 100 %. Cardiotoxicity evaluations were performed: 1) electrocardiogram (ECG) (limb lead II) before and after treatment in anaesthetized male mice, uninfected and infected. At the highest dose (120 mg/kg) in uninfected mice, ATM-NC prevented these prolongations by 34% and 30%, respectively, compared to free ATM. In the infected mice, ATM-NC reduced the prolongation of the QT and QTc intervals by 28% and 27%, respectively. 2) Echocardiogram (ECO) was performed only in uninfected mice and treated with free ATM and ATM-NC at dose 120 mg/kg, for this study no significant differences were found between the groups. Cardiomyocytes were isolated from mice treated with vehicle, blank NC, free ATM and ATM-NC at 120 mg/kg and evaluated 3) under field stimulation (1 Hz) in Ionoptix system for  $\text{Ca}^{2+}$  transient and sarcomere contractility, 4) patch-clamp system for the action potential (PA) and current in  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Free ATM reduced  $\text{Ca}^{2+}$  transient at 41 %, diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  at 12 % and percentage sarcomere shortening of 4,6 % (control) to 3,1 %. In addition, the free ATM was caused the prolongation of action potential when compared to the vehicle ( $350,0 \pm 49,3$  and  $137,7 \pm 20,5$ , respectively). Cardiomyocytes from untreated mice were isolated and incubated with free ATM at different concentrations 0,1; 1 and 10  $\mu\text{M}$ . 10  $\mu\text{M}$  free ATM reproduced the effects on  $\text{Ca}^{2+}$  observed in cardiomyocytes of treated mice, thus indicating cardiotoxic effects. On the other hand, ATM-NC did not cause any significant changes in any of the evaluated parameters. Neurotoxicity was evaluated in uninfected and infected mice. For uninfected mice, free ATM at 120 mg/kg significantly reduced the open arms capacity of the high cross maze, indicating neurobehavioral disorder such as anxiety. For uninfected mice, free ATM (120 mg/kg) significantly reduced the ability to explore the open arms of the high cross maze, indicating neurobehavioral-like anxiety. For infected mice, the treatment with free ATM (120 mg/kg) caused neurobehavioral-like anxiety and altered the locomotor capacity of the mice, because it reduced the exploratory capacity in open and closed arms in 65 % and 67 %. ATM-NC prevented the development of neurotoxic effects in uninfected mice and reduced the effects on infected mice. Thus, ATM-NC showed oral efficacy reducing cardiotoxicity and neurotoxicity.

**Key words:** malaria; artemether; nanocapsules, efficacy, cardiotoxicity; neurotoxicity

## 1 INTRODUÇÃO

A malária, uma das principais doenças parasitárias no mundo, é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium sp* e transmitida pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). A malária é uma doença grave e, somente no ano de 2016, causou 429.000 mortes, sendo a maioria na África, em crianças menores de 5 anos (WHO, 2016a).

O controle da malária exige abordagem integrada, incluindo a prevenção, principalmente no controle de vetores, e tratamento dos doentes por meio de antimaláricos eficazes (WHO, 2016a). Recentemente, foi demonstrado o aumento da resistência do *Plasmodium falciparum* a diferentes fármacos como a cloroquina, amodiaquina, sulfadoxina e pirimetamina (CHENG; KYLE; GATTON, 2012; LEHANE et al., 2012). Os derivados de artemisinina, como o arteméter (ATM), são uma alternativa de tratamento para combater o *Plasmodium falciparum*, assim como os esquemas terapêuticos combinados que os contém (ATC) (WHO, 2016b).

A artemisinina, extraída principalmente de folhas de *Artemisia annua*, é uma lactona sesquiterpênica, um composto orgânico biologicamente ativo que, assim como os seus derivados semissintéticos, possui eficácia contra as estirpes resistentes de espécies de *Plasmodium falciparum* causadores da malária (KLAYMAN, 1985). Este grupo de fármacos possui ação esquizotocida e gametocida (BROSSI et al., 1988). No entanto, eles apresentam algumas características que reduzem sua eficácia e comodidade, alta lipofilicidade, baixa biodisponibilidade por via oral, tempo de meia-vida curto e considerável toxicidade (KARBWANG et al., 1997; YIN et al., 2014).

A neurotoxicidade e a cardiotoxicidade são efeitos tóxicos graves desencadeados pelo uso da artemisinina e seus derivados (BREWER et al., 1994; CLASSEN et al., 1999; YIN et al., 2014). Foram observados danos ao sistema nervoso central (SNC) tais como lesões no tronco cerebral e núcleo trapezoidal (BREWER et al., 1994; CLASSEN et al., 1999) e alterações indicativas de cardiotoxicidade como o prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma (ECG) (BREWER et al., 1994; CLASSEN et al., 1999; YIN et al., 2014), entre outros.

A fim de contornar a resistência dos parasitas aos medicamentos antimaláricos e reduzir seus efeitos adversos, a utilização de diferentes nanocarreadores como nanocápsulas, lipossomas e nanoesferas têm se mostrado alternativas promissoras, como já mostrado em trabalhos anteriores (ADITYA et al., 2010; BRANQUINHO et al., 2017a; CHIMANUKA et al., 2002; LEITE et al., 2007; MOSQUEIRA et al., 2004; SANTOS-MAGALHÃES E MOSQUEIRA, 2010). Os nanocarreadores permitem: (i) entrega de quantidades suficientemente elevadas aos locais de ação para evitar o desenvolvimento de estirpes de parasitas resistentes (ii) melhoria da eficácia, (iii) inovação na terapia antimalárica, pois permitem estudar fármacos que ainda não foram avaliados devido, por exemplo, à elevada toxicidade e não especificidade, e (iv) aumento de respostas imunitárias em formulações de vacinas (MOVELLAN et al., 2014; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010).

Nanoestruturas podem proteger uma molécula ativa contra a degradação por via oral, modificar o seu perfil farmacocinético e aumentar a biodisponibilidade (DE MELO et al., 2016; BRANQUINHO et al., 2017b). Assim, no presente estudo as nanocápsulas poliméricas (NC) contendo ATM (ATM-NC) foram utilizados a fim de mostrar seu potencial em reduzir a cardiotoxicidade *in vivo* e *in vitro* e neurotoxicidade *in vivo*. As NC utilizadas neste trabalho foram anteriormente desenvolvidas e padronizadas em nosso laboratório (VIDAL-DINIZ, 2014).

A utilização de nanocápsulas contendo ATM (ATM-NC) é uma alternativa para reduzir os efeitos colaterais, além de ser biodegradável e possuir bom controle de liberação. VIDAL-DINIZ, 2014, desenvolveu e caracterizou ATM-NC e demonstrou que o uso de ATM-NC em diferentes doses por via intravenosa (IV), em ratos Wistar, foi capaz de reduzir o prolongamento do intervalo QT do ECG, causado pela administração do ATM livre. Neste trabalho, a fim de completar os resultados prévios, foram realizadas análises de estabilidade e perfil de liberação *in vitro* de ATM-NC. Além disso, propõe o uso de ATM-NC, por via oral, cuja comodidade e conforto ao paciente são maiores, acarretando em benefícios na terapêutica da malária. O uso oral de ATM-NC possibilita um prolongamento do tempo de ação do fármaco em relação a IV e facilita a administração e tratamento principalmente em crianças, cuja mortalidade por malária é extremamente elevada.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Malária

#### 2.1.1 Aspectos gerais

A malária é uma doença grave causada por parasitas do gênero *Plasmodium sp.* Existem mais de 100 espécies de *Plasmodium*, dentre as quais apenas cinco causam a malária em humanos, *Plasmodium malariae*; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (ver PHILLIPS et al., 2017; WHITE et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2016), a malária é endêmica em 91 países, com 212 milhões de casos somente no ano de 2015. O *P. vivax* é a principal espécie causadora da malária na região das Américas, sendo 72 % dos casos em 2015, com aproximadamente 451.000 casos. No Brasil, aproximadamente 26 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para malária e, em 2015, foram confirmados 143.162 casos (PAHO, 2016).

Conforme os dados do Programa Nacional de Controle de Malária (PNCM) do Ministério da Saúde do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015) o *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae* são as principais espécies causadoras de malária no país. Os casos de *Plasmodium vivax* são predominantes (84 %) seguidos de *Plasmodium falciparum* (16 %) dos casos notificados em 2014. Atualmente, os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins concentram a maioria dos casos.

A malária tem início quando o esporozoítio do *Plasmodium sp* é introduzido em vertebrados pela picada do mosquito *Anopheles sp* fêmea durante sua alimentação sanguínea. Os esporozoítos se direcionam para o fígado e infectam os hepatócitos. Para as espécies de *P. vivax* e *P. ovale* alguns esporozoítos dão origem a formas evolutivas denominadas hipnozoítos, que podem permanecer em estado de latência no fígado. No interior do hepatócito, por um processo de esquizogonia os esporozoítos se desenvolvem em esquizontes, os quais se proliferam maciçamente dando origem aos merozoítos que irão infectar os eritrócitos. Estágios eritrocitários cíclicos subsequentes

são responsáveis pelos sintomas, complicações e mortalidade associadas à malária. Merozoítos lançados na corrente sanguínea podem invadir novos eritrócitos e continuar a replicar, ou em alguns casos, diferenciar-se em gametócitos machos e fêmeas. Os gametócitos, uma vez ingeridos pelo mosquito através do sangue, passam por uma fase de fertilização e formaram os oocistos. Os oocistos passaram por algumas fases de amadurecimento até a formação de novos esporozoítos (ver PHILLIPS et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O quadro clínico típico é caracterizado por febre decorrente da fase eritrocitária do parasita. A ruptura das células vermelhas e liberação dos esquizontes induzem os monócitos e macrófagos a liberarem citocinas pró-inflamatórias causando a febre (AYIMBA et al., 2011). Em geral o quadro febril, vem acompanhado de cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos, sendo este quadro denominado paroxismo, que pode ser passageiro à intermitente (KARUNAWEEERA et al., 1992). O quadro clínico pode variar de leve a grave, dependendo do número de parasitas infectantes, do estado imunológico e da idade do paciente (WHO, 2016a).

O *P. falciparum* é a espécie responsável pela ocorrência dos sintomas de maior gravidade com altas taxas de mortalidade (WHO, 2016a). A infecção por *P. falciparum* pode desencadear anemia grave, insuficiência renal, disfunção pulmonar e hepática, acidose metabólica, hipoglicemia e danos no sistema nervoso central, conhecida como malária cerebral (ver TRAMPUZ et al., 2003).

A manifestação da malária cerebral está diretamente relacionada a alta mortalidade em pacientes com malária grave, principalmente crianças (GUPTA et al., 2017). A malária cerebral está associada a perda de consciência e coma, tanto em indivíduos adultos quanto em crianças (IDRO et al., 2010). Enquanto a encefalopatia é uma característica predominante em crianças, a malária cerebral em adultos está associada a desordens múltiplas no organismo, como insuficiência renal e edema pulmonar (DUNST; KAMENA; MATUSCHEWSKI, 2017; GUPTA et al., 2017). A encefalopatia e as convulsões geralmente se resolvem dentro de 2 a 3 dias após o início do tratamento com antimalárico e cuidados de suporte, mas 25% dos pacientes pediátricos que sobrevivem à malária cerebral desenvolvem sequelas neurológicas, como a epilepsia (IDRO et al., 2010).

Para o diagnóstico da malária é levado em consideração a febre e a presença de parasitas (WHO, 2016c). Os parasitas podem ser detectados microscopicamente a partir da leitura do esfregaço sanguíneo do paciente ou a partir de testes de diagnóstico rápido (TDRs). Pacientes com malária não complicada geralmente possuem 1.000 a 50.000 parasitas por microlitro de sangue. Contudo em indivíduos não imunizados e crianças que têm número de parasitas < 1000, também podem ser observados sintomas como na malária não grave (JOANNY et al., 2014). O aumento no número de parasitas pode estar associado a malária grave (ver PHILLIPS et al., 2017). Os testes de diagnóstico rápido, validados pela WHO, podem detectar 50 a 1.000 parasitas por microlitro de sangue com alta especificidade. Contudo, estes testes de diagnóstico rápido são menos sensíveis que os métodos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (AZIKIWE et al., 2012).

As medidas atuais de controle e erradicação da malária incluem a realização do controle dos vetores por meio de inseticidas e redes inseticidas de longa duração que impedem o contato do anofelino com o humano e quando necessário, a utilização de pulverização residual interna. A prevenção individual da doença se dá por meio do uso de repelentes e da quimioprofilaxia, principalmente a partir do uso de combinação baseada no protocolo contendo artemisinina (WHO, 2016a). Assim, o diagnóstico precoce e o tratamento correto e oportuno são os meios mais adequados para reduzir a gravidade e a letalidade ocasionada pela malária, desta forma demonstrando a necessidade de conhecimento consolidado sobre os antimaláricos.

### **2.1.2 Terapêutica Antimalárica**

Para o tratamento da malária não existe um fármaco que seja ideal contra todas as espécies de *Plasmodium spp.*, e a escolha do fármaco é geralmente conduzida pela frequência de desenvolvimento de resistência aos medicamentos e não por diferenças de espécies em si. O tratamento também é variável de acordo com as manifestações da doença que ocorrem em diferentes populações de pacientes (ver PHILLIPS et al., 2017; WHITE et al., 2013). O tratamento da malária não complicada é distinto do tratamento da malária grave. Na malária não complicada, o tratamento de escolha é um medicamento oral com alta eficácia e um perfil de baixo efeito adverso. No entanto, a terapêutica para malária grave requer início rápido e inclui a administração parenteral



do artesunato e, em sua ausência, é utilizado o ATM. Assim, o tratamento da malária deve ser adequadamente adaptado a cada situação (WHO, 2015).

Os fármacos antimaláricos possuem diferentes mecanismos de ação sobre o parasita. Podem atuar sobre esquizontes eritrocitários, como a quinina, cloroquina, mefloquina, amodiaquina, halofantrino, lumefantrina e derivados da artemisinina; sobre os gametócitos como a quinina, cloroquina, amodiaquina, primaquina, lumefantrina e derivados da artemisinina e também sobre os hipnozoítos como a primaquina (JAIN; SOOD; GOWTHAMARAJAN, 2014; MURAMBIWA et al., 2011).

De acordo com a WHO (2016b) para a malária não complicada causada pelo *P. falciparum* a terapia combinada à base de artemisinina (ATC) e seus derivados é indicada como tratamento de primeira linha. Assim, é preconizado o uso oral da associação de derivados da artemisinina com outros antimaláricos, como arteméter-lumefantrina, artesunato-amodiaquina, artesunato-sulfadoxina-pirimetamina, artesunato-mefloquina ou diidroartemisinina-piperaquina. Essas associações apresentam a finalidade de combinar os mecanismos de ação e assim, reduzir a capacidade das cepas em adquirir resistência e ainda prolongar o efeito terapêutico dos fármacos (WHO, 2016b)

Em extensa revisão da literatura realizada por SINCLAIR e DONEGAN (2011), foi comparada a eficácia dos fármacos artesunato e quinina por diferentes vias de administração para o tratamento da malária grave. Foi demonstrado que o artesunato administrado IV é eficaz em mais de 90 % dos pacientes já em estágio de inconsciência sendo superior ao tratamento com quinina. O ATM por via intramuscular (IM) também é uma escolha para o tratamento da malária grave, demonstrando ser mais eficaz que a cloroquina na prevenção de danos cerebrais e mortes em crianças africanas (ESU et al., 2014).

A cloroquina é um fármaco utilizado no combate ao *P. vivax* (BERLINER et al., 1948). Contudo, nas últimas décadas tem sido demonstrado o desenvolvimento de resistência do *P. vivax* à cloroquina (DUAL; KARL; SHARMA, 1996; GARAVELLI; CORTI, 1992; GONÇALVES; CRAVO; FERREIRA, 2014). São vários os fatores que podem ter contribuído para o desenvolvimento de resistência do *P. vivax* à cloroquina, dentre eles o uso de altas doses do fármaco para alcançar o efeito antimalárico (WHITE, 2011). Assim, devido ao desenvolvimento de resistência à cloroquina tem crescido o

uso de *ATC* para o tratamento da malária causada pelo *P. vivax* (LEANG et al., 2013; YOHANNES et al., 2011). Além da *ATC*, a primaquina (8-aminoquinolina) é um importante fármaco utilizado no combate deste parasita, pois sua ação sobre os hipnozoítos previne as recidivas e o retorno dos sintomas da malária.

No Brasil é preconizado para o tratamento da malária por *P. vivax*, protocolo de 3 dias de tratamento com cloroquina seguidos de 14 dias de tratamento com primaquina. Já para o tratamento da malária por *P. falciparum* existem 3 diferentes esquemas terapêuticos indicados: I) combinação fixa de artemeter-lumefantrina por 3 dias; II) artesunato-mefloquina por 3 dias seguido de uma dose única de primaquina; III) quinina por 3 dias mais doxiciclina por 5 dias e primaquina no 6º dia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

De acordo com o exposto acima, os derivados da artemisinina como ATM, artesunato, dihidroartemisinina e arteeter (figura 1) são os fármacos de escolha para o tratamento da malária, principalmente quando utilizados em associação. Em relação ao mecanismo de ação dos derivados de artemisinina, o ferro é um determinante fundamental da atividade deste grupo de fármacos, na malária. Este metal está presente em grande excesso ligado à hemoglobina em eritrócitos e, então, os derivados da artemisinina promovem a clivagem do endoperóxido a partir de uma reação química do tipo Fenton, onde há a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais induzem a morte do plasmódios (HAYNES; CHEU, 2013).

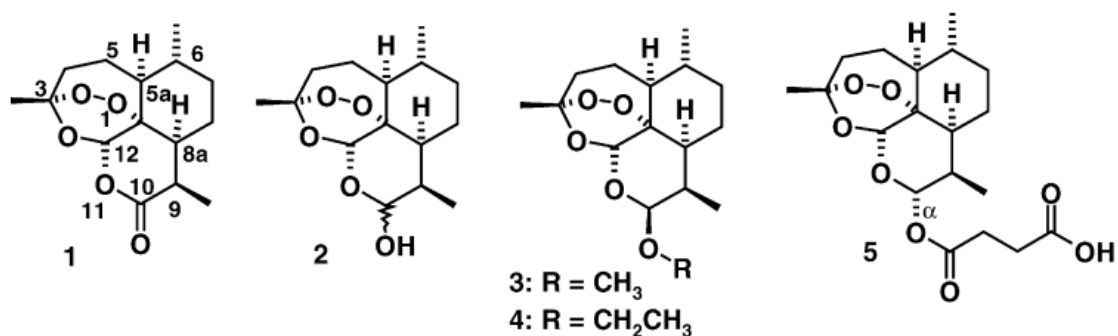


Figura 1: Estrutura química da artemisinina e seus derivados (1) artemisinina; (2) dihidroartemisinina; (3) arteméter; (4) arteéter; (5) artesunato (KRISHNA; UHLEMANN; HAYNES, 2004).

O ATM é um fármaco que possui ação esquizonticida e gametocida, e quando metabolizado no fígado produz o derivado dihidroartemisinina, que é um metabolito

também ativo. O ATM é bastante eficaz no tratamento da malária não complicada e malária grave, sendo reportada sua eficácia também na malária cerebral (WHO, 2016b). Dentre os prováveis mecanismos de ação estão a geração de espécies reativas de oxigênio e moléculas com carbonos altamente reativos capazes de alterar as proteínas do parasita (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003; KRISHNA et al., 2006). Alguns estudos sugerem que esta classe de fármacos pode inibir a expressão da enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarco-endoplasmático (SERCA) do parasita (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003). A SERCA é a enzima responsável por restaurar e manter as reservas internas de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo endoplasmático, contribuindo para controle dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (ver BERS, 2002). Outro mecanismo já descrito é a perturbação do potencial de membrana mitocondrial, conforme sugerido a partir de dados em um modelo de levedura (LI et al., 2005).

Quando administrado por via oral, o ATM possui baixa biodisponibilidade (40 %) (KARBWANG et al., 1997) e tempo de meia-vida plasmática curto (~4 horas quando administrado por via oral) (LAXMI et al., 2015), com possível redução do efeito terapêutico, e consequente recrudescência da malária quando utilizado em monoterapia (MENARD et al., 2005). Segundo a WHO (2016a), o tratamento por via oral utilizando a artemisinina como monoterapia propicia a resistência. Estudo realizado por MAUDE et al. (2009) na fronteira entre Tailândia e Camboja, sugere que se não houver intervenções contra a utilização da monoterapia, haverá aumento do número de infecções por malária devido à resistência a esse medicamento, justificando a necessidade da terapia combinada. Por outro lado, alguns pesquisadores acreditam que o uso da terapia combinada pode permitir que o parasita desenvolva resistências à ambos os fármacos escolhidos na terapêutica (DUFFY; MUTABINGWA, 2006). Ainda mais grave, há algumas evidências recentes de resistência do parasita ao tratamento de combinação entre artemeter–lumefantrino em partes da África Oriental (DOKOMAJILAR et al., 2006; SISOWATH et al., 2005).

A resistência aos antimaláricos por espécies de plasmódio ainda é um obstáculo na terapêutica da malária, bem como os seus efeitos adversos. Sua ocorrência desencadeia decréscimo da qualidade de vida do paciente. Sendo assim, o seu conhecimento é importante para que a terapia antimalárica seja eficaz e segura.

### 2.1.3 Toxicidade dos antimaláricos

Como demonstrado anteriormente, atualmente, a terapêutica da malária é embasada na ATC. Os derivados da artemisinina apresentam inúmeros efeitos adversos, desde os mais brandos, como náusea, vômito e diarreia (PRICE et al., 1999) até efeitos mais graves. Dentre os principais efeitos adversos da artemisinina e seus derivados foram descritos a embriotoxicidade (NOSTEN et al., 2006), genotoxicidade (EFFERTH et al., 1996), hemotoxicidade (YIN et al., 2014), imunotoxicidade (GU et al., 1989), cardiotoxicidade (BREWER et al., 1994; CLASSEN et al., 1999; YIN et al., 2014) e neurotoxicidade (BECKMAN; YOURENEFF; BUTT, 2013; BREWER et al., 1994; CLASSEN et al., 1999).

Em relação a neurotoxicidade, em modelos animais, o tratamento por via IM com ATM e arteéter em altas doses, produziu danos aos núcleos do tronco cerebral (BREWER et al., 1994). Também foram observadas alterações no núcleo trapezoidal com anormalidades no equilíbrio e coordenação (AKINLOLU; SHOKUNBI, 2010). Estudo realizado por NONTPRASERT et al. (2000) mostrou que, por via oral, o ATM foi neurotóxico e causou morte em 50 % de camundongos Swiss. Em humanos, MANNING et al. (2011) a partir da análise do fluido cerebrospinal de 32 crianças, observaram aumento de 4 a 6 vezes de inflamação meningial após a administração do ATM por via IM.

WHITE (2007) escreveu sobre os fármacos antimaláricos e seus diferentes efeitos cardiotóxicos, demonstrando a gravidade dos mesmos, principalmente aqueles relacionados ao prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma (ECG). O intervalo QT corresponde à despolarização e repolarização ventriculares e seu prolongamento se caracteriza pelo aumento do tempo da duração do potencial de ação (WITCHEL; HANCOX, 2000). O prolongamento do intervalo QT e do índice QTc é um fator de risco para a morte súbita e, além disso, está associado com *torsades de pointes* (TdP), insuficiência cardíaca e cardiomiopatia hipertrófica (CHAN et al., 2007; DAY; MCCOMB; CAMPBELL, 1990; ISBISTER; PAGE, 2013). De acordo com FRAGASSO et al., (2009) a cloroquina pode desencadear insuficiência cardíaca e disfunção cardíaca biventricular. O halofantrino foi introduzido como nova possibilidade terapêutica em 1988, mais eficaz e seguro para a terapia da malária

causada por *P. falciparum* resistente à cloroquina (BOUDREAU et al., 1988). Entretanto, estudos mostram que o seu uso promove o prolongamento do intervalo QT, em pacientes com síndromes do QT longo congênita e, além disso, promove o prolongamento do intervalo PR, podendo causar o bloqueio cardíaco transitório (NOSTEN et al., 1993; WESCHE et al., 2000). A primaquina, assim como outros fármacos antimaláricos, também apresenta efeitos cardiotóxicos. Todavia, este fármaco apresenta toxicidade cardiovascular menos importante, e sua ação desencadeia prolongamento do potencial de ação (PA) dos cardiomiócitos a partir da inibição de canais de Na<sup>+</sup> (ORTA-SALAZAR et al., 2002).

O ATM e demais derivados da artemisinina fazem parte do grupo dos antimaláricos que desencadeiam efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular. AI et al. (2001), em estudos em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de coração de cobaias, demonstraram aumento nos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> após incubação com artemisinina na concentração de 100 µmol/L, durante 10 minutos. O aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular pode estar relacionado a diferentes fatores que envolvem a maquinaria de acoplamento excitação-contração do cardiomiócito. Branquinho et al. (2017) demonstraram que uma lactona sesquiterpênica, assim com a artemisinina, causou aumento nas concentrações intracelulares de Ca<sup>2+</sup> por ação sobre os receptores de rianodina do retículo sarcoplasmático, estimulando sua abertura. Tal efeito está relacionado a processos arritmogênicos (FERNÁNDEZ-VELASCO et al., 2009). Além disso, em estudos *in vivo*, foi observado por YIN et al. (2014), que a administração IM de ATM na dose de 6 mg/kg induziu redução no número de células vermelhas, alterações no SNC e prolongamento do intervalo QT.

Assim, de acordo com acima exposto, podemos inferir que é necessário que novas opções farmacológicas sejam desenvolvidas para o tratamento da malária, tanto do ponto de vista da tentativa em reduzir a resistência, quanto para a redução da toxicidade. Neste intuito, os nanocarreadores surgem como uma ferramenta útil para o desenvolvimento de novas formulações que sejam eficazes e seguras.

## **2.2 Nanotecnologia na terapêutica da malária**

A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar que abrange biologia, química, matemática, física, engenharia, farmácia e medicina. São vários os sistemas

nanoparticulados utilizados na área farmacêutica, dentre eles lipossomas, nanoesferas, nanoemulsões, nanosuspensões, nanocápsulas (NC) e apresentam um grande potencial para revolucionar o diagnóstico e a terapia de vários tipos de doenças como: fibrose pulmonar (TANG et al., 2017), hipertensão e angina (SHAH; JOSHI; SAWANT, 2014), glaucoma (KOUCHAK et al., 2017), câncer (BORRAJO et al., 2016), Alzheimer (DO et al., 2016), Parkinson (HERRÁN et al., 2014), Doença de Chagas (SPÓSITO et al., 2017), Leishmaniose (SOUSA-BATISTA et al., 2017), malária (LEITE et al., 2007; MOSQUEIRA et al., 2004) entre outras.

Diferentes antimaláricos estão sendo veiculados em nanopartículas, a fim de aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade destes fármacos. Na tabela abaixo estão demonstrados alguns antimaláricos e o respectivo nanocarreador utilizado (tabela 1).

Tabela 1: Antimaláricos veiculados em nanocarreadores

<b>Antimalárico</b>	<b>Nanocarreador</b>	<b>Referência</b>
Arteeter	Lipossomas	(BAYOMI et al., 1998)
Arteméter	Lipossomas	(CHIMANUKA et al., 2002)
	Microemulsão	(NAGARSENKER; TAYADE, 2010)
	Nanopartículas lipídicas	(ADITYA et al., 2010)
	Nanoemulsão	(LAXMI et al., 2015)
	Nanocristais	(SHAH et al., 2016)
Arteméter-lumefantrina	Nanopartículas lipídicas	(PRABHU et al., 2016)
Artemisinina	Lipossomas de Curcumina	(ISACCHI et al., 2011)
Artesunato	Lipossomas	(GABRIELS; PLAIZIER-VERCAMMEN, 2003).
Cloroquina	Lipossomas furtivos	(IBRAHIM et al., 2017)
Halofantrino	Nanocápsulas de PLA	(MOSQUEIRA et al., 2004)
	Nanocápsulas de PCL	(LEITE et al, 2007)
Lumefantrina	Nanopartículas lipídicas sólidas	(GARG et al., 2017)
Quinina	Nanocápsulas de PCL	(HAAS et al., 2009)

As NC são sistemas coloidais vesiculares de tamanho nanométrico que apresentam uma cavidade preenchida por óleos onde o fármaco encontra-se geralmente dissolvido (ver LEGRAND et al., 1999). As NC são nanocarreadores geralmente empregadas na vetorização de fármacos hidrofóbicos (ver LEGRAND et al., 1999). O uso das NC como sistema de vetorização tem como objetivo promover proteção dos fármacos contra a degradação, melhorar a seletividade em relação ao alvo, reduzir a frequência de administração e duração do tratamento, modificar a liberação e o perfil farmacocinético do fármaco (DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2011; VAUTHIER; COUVREUR, 2007). Para o tratamento da malária, a propriedade mais importante de um nanocarreador é a capacidade de permanecer por um período prolongado de tempo na corrente sanguínea para melhorar a interação do fármaco com glóbulos vermelhos infectados (MOSQUEIRA et al., 2004; HAAS et al., 2009).

Neste sentido, MOSQUEIRA et al., (2004) obtiveram modificação do perfil farmacocinético do halofantrino a partir do uso de NC furtivas de ácido poli-(*D,L*)-lático-co-poli-etilenoglicol (PLA-PEG). Neste trabalho, as NC foram capazes de proporcionar o aumento do tempo na circulação sanguínea do halofantrino por até 70 horas, e foram eficazes na redução do número de *P. berghei* em camundongos. Posteriormente, LEITE et al. (2007) demonstraram que as NC de PCL, administradas por via IV, foram capazes de reduzir a cardiotoxicidade do halofantrino. Assim, foi proposta uma nova formulação farmacêutica para um antimalárico já utilizado na clínica.

Estudos realizados por HAAS et al. (2009) compararam a eficácia contra *P. berghei* da quinina e da quinina veiculada em NC de PCL por via parenteral, e mostraram aumento significativo da eficácia antimalárica em relação à forma livre. Os autores sugeriram que a nanoencapsulação aumentou a interação entre o fármaco e os eritrócitos, justificando assim o aumento da eficácia da quinina em NC em relação a quinina livre.

Assim, como para os antimaláricos citados acima, o ATM possui características físico-químicas que permitem sua veiculação em NC. Deste modo, VIDAL-DINIZ (2014) desenvolveu e caracterizou NC contendo o ATM (ATM-NC) para utilização *in vivo* a ser administrado por via endovenosa. Neste trabalho foi observado a redução da cardiotoxicidade, em ratos, avaliada utilizando os parâmetros do ECG nas doses de 40 e

80 mg/kg IV em dose única, com a manutenção da eficácia, comparado ao ATM na sua forma livre.

De modo a inovar na terapêutica antimalárica e proporcionar maior comodidade ao paciente, as NC previamente desenvolvidas foram estudadas a partir da via de administração oral em busca da melhoria na eficácia, comodidade e redução de efeitos adversos graves. Até o momento, ainda não foram comprovados estudos de um nanocarreador contendo ATM administrado por via oral que seja capaz de reduzir efeitos cardiotoxícos e neurotóxicos causados por este fármaco. Assim, o presente estudo investigou uma farmacoterapia na malária experimental para melhoria da eficácia antimalária do ATM por via oral e redução dos seus efeitos cardiotoxícos e neurotóxicos.



### **3 OBJETIVOS**

#### Objetivo Geral

Avaliar a eficácia antimalárica e a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do arteméter veiculado em nanocápsulas administrados por via oral.

# CAPÍTULO 1

## FORMULAÇÃO DE ARTEMÉTER

### 1.1 Introdução

O ATM, fármaco alvo de nosso estudo, possui baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade oral (40 %) (KARBWANG et al., 1997), características que são as principais motivações para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. Atualmente, as formas farmacêuticas comercialmente disponíveis de ATM são comprimidos, quando em associação a outros antimaláricos, ou em ampolas para administração parenteral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A formulação para administração IM é de baixa comodidade por gerar dor no paciente no momento da administração, que pode ser agravada devido à precipitação do medicamento no local da injeção. Por conseguinte, é importante que seja concebida uma forma farmacêutica que seja capaz de superar as questões de sua baixa solubilidade aquosa e possa ser administrada por via oral.

Já foram explorados diferentes nanocarreadores para a encapsulação do ATM, incluindo, lipossomas (CHIMANUKA et al., 2002); nanopartículas lipídicas (ADITYA et al., 2010), microemulsão (NAGARSENKER; TAYADE, 2010), nanoemulsão (LAXMI et al., 2015) e nanocristais (SHAH et al., 2016). Contudo, as formulações propostas anteriormente apresentaram limitações quanto à complexidade de fabricação e de estabilidade física, não sendo adequadas para a administração oral. NC são nanocarreadores que variam de tamanho entre 100 a 400 nm, possuem uma cavidade oleosa envolta por uma parede polimérica onde os fármacos hidrofóbicos podem ser dissolvidos (ver LEGRAND et al., 1999). Deste modo, VIDAL-DINIZ (2014), desenvolveu e caracterizou NC de PCL contendo ATM. Foi obtido alto teor de encapsulação do ATM nas NC previamente desenvolvidas. A fim de complementar os estudos de desenvolvimento da formulação de ATM-NC, foram realizadas as análises de estabilidade e perfil de liberação *in vitro*.

## **1.2 Objetivo específico**

Caracterizar físico-quimicamente, avaliar a estabilidade e o perfil de liberação do arteméter em nanocápsulas.

## **1.3 Metodologia**

### **1.3.1 Materiais**

Arteméter, éter metílico de dihidroartemisinina (ATM), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL); poloxamer 188, carboximetilcelulose (CMC) e acetona foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O Paluther® contendo 80 mg/ml de ATM dissolvido em óleo de gergelim, foi fornecida gratuitamente pelo Programa Nacional de Controle da Malária do Ministério da Saúde (Brasil). A lecitina de soja (EpikuronTM170) foi fornecida gratuitamente pela Cargill (Alemanha). O Miglyol® 812N foi adquirido da Sasol Germany GmbH. A água MilliQ foi purificada usando um sistema Symplicity® (Millipore, Bedford, EUA) e utilizada em experimentos. Todos os sais utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

### **1.3.2 Preparação das formulações de ATM**

Foi denominado de NC-branca aquelas produzidas na ausência de ATM e seu núcleo oleoso contém de Miglyol 812N (100  $\mu$ l). As NC-branca e as NC que veiculam o ATM (ATM-NC) foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado seguido de evaporação do solvente, como descrito anteriormente por FESSI et al. (1989). Resumidamente, para 2,0 ml de ATM-NC, foram preparadas duas fases: uma fase orgânica e uma fase aquosa. A fase orgânica continha 24 mg de PCL, 30 mg de lecitina de soja, 100  $\mu$ l de Paluther® (80 mg/ml de ATM em óleo de amendoim), 2,0 ml de acetona, enquanto a fase aquosa era constituída de 30 mg de poloxamer 188 e 8 ml de água MilliQ. Após a dissolução completa de todos os componentes em cada fase, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa com o auxílio de uma seringa. As NC se formaram instantaneamente e a suspensão coloidal foi mantida sob agitação durante 10 minutos. Em seguida, os solventes foram evaporados sob

pressão reduzida (Heildolph Rotary Evaporator Instruments, Alemanha) até um volume final de 2 ml para obter uma concentração final de 4 mg/ml de ATM na suspensão coloidal de NC.

Uma suspensão grosseira de ATM livre para uso oral foi preparada misturando-se 0,09 g de ATM, 0,3 g de CMC, 2,0 ml de sorbitol e água MilliQ em quantidade suficiente para 15 ml. O veículo foi preparado da mesma forma, mas sem adição de ATM. As suspensões foram preparadas no dia de início do tratamento oral dos camundongos. Todas as formulações preparadas foram mantidas em temperatura controlada 2° a 8°C e protegidas da luz direta.

#### **1.3.4 Análise de tamanho e potencial zeta**

O tamanho médio, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta das NC foram determinados a partir da técnica de dispersão de luz dinâmica através do equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Reino Unido). As medidas foram realizadas a 25°C com amostras diluídas 1000 vezes em água MilliQ. As medidas do tamanho e potencial zeta foram realizadas em água utilizando três formulações distintas. Para os testes de estabilidade as leituras de potencial zeta e tamanho foram realizadas durante três meses nos dias: 1, 2, 15, 30, 60, 90.

#### **1.3.5 Solubilidade do ATM**

A solubilidade em equilíbrio do ATM foi determinada em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em pH 7,4 a 37°C. Foi pesado um excesso de ATM (2 mg) e colocado em 1 ml de PBS sob agitação durante 24 h a 37°C. Os tubos foram centrifugados a 2000 ×g durante 10 minutos e uma alíquota de 500 µl foi retirada, filtrada em filtro 0,45µm e diluída em acetonitrila (1:1), agitada e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando o método descrito e validado por CÉSAR, PIANETTI, 2009. O sistema de CLAE utilizado foi um Waters Alliance 2695 que inclui um módulo de separação com injetor automático, forno de coluna (30°C) e detector de UV (Waters 2489) ajustado com comprimento de onda de 216 nm. A coluna C18-RP Phenomenex (150 mm x 4,6 mm, 4 µm) foi protegida por uma pré-coluna (Phenomenex C18-RP, 2 mm x 4,6 mm, 3 µm). A fase móvel foi uma mistura de

acetonitrila/água (70:30 v/v), bombeada a um fluxo de 1 ml/min e um volume de injeção de 50 µl.

### **1.3.6 Cinética de liberação *in vitro***

Os estudos de liberação *in vitro* do ATM contido nas NC foram realizados em PBS (pH 7,4) em condição *sink*, onde a quantidade de fármaco adicionado ao meio de liberação foi inferior a 20 % da concentração de saturação do fármaco no meio de liberação determinada no item anterior. O perfil de liberação foi determinado usando-se o método de diálise inversa (SPÓSITO et al., 2017), para tanto, sacos de diálise contendo 1 ml de PBS foram inseridos em 500 ml de PBS (meio externo) e equilibrados durante 3 h a 37°C sob agitação. Em seguida, foram adicionadas as NC contendo ATM (ATM-NC) (375 µl) no meio externo, respeitando a condição *sink*. Em cada intervalo de tempo predeterminado (1, 2, 6, 12 e 24 horas), foi removido um saco de diálise, coletados 500 µl da solução, diluídos em acetonitrila (1:1), determinando-se a concentração do ATM por CLAE-UV. Os cálculos de dissolução/liberação foram realizados de acordo com o descrito por COSTA E LOBO (2001).

### **1.3.7 Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste Tukey. O software Graph Pad Prism® 5.0 (Graph Pad Software, EUA) foi usado como ferramenta para análise estatística. Os dados foram expressos como média ± DP.

## 1.4 Resultados e Discussão

### 1.4.1 Análise de tamanho e potencial zeta

O teor de encapsulação determinado previamente foi superior a 90 % na concentração de 4,0 mg/mL (VIDAL-DINIZ, 2014). A tabela 1.1 apresenta o tamanho, PDI e potencial zeta de ATM-NC e NC-branca. As NC apresentaram valores negativos de potencial zeta que promove a estabilidade coloidal por repulsão eletrostática entre as nanopartículas, impedindo a agregação. As NC obtidas possuíam tamanho médio de 197,3 (NC-branca) e 254,5 (ATM-NC) e índice de polidispersão menor que 0,3, indicando que a população de NC era monodispersa. A presença do ATM nas NC reduziu significativamente a carga superficial em módulo ( $p < 0,05$ ). O tamanho das NC aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ), evidenciando-se claramente a associação do fármaco à NC (tabela 1.1), sugere-se que o ATM esteja veiculado ao núcleo oleoso das NC devido a sua característica de alta lipofilicidade e alta solubilidade em óleos. No entanto, estas modificações trouxeram poucas influências sobre o comportamento das NC, já que não foi observada precipitação até três meses após a preparação das mesmas, mantendo-se estáveis (figura 1.1). Nossos resultados estão em acordo com aqueles realizados por BRANQUINHO et al. (2017b) que demonstraram que a nanoencapsulação do lichnopholideo, também uma lactona sesquiterpênica, resultou em alta estabilidade com 90 % de eficiência de encapsulação ao longo de 180 dias. Considerando estas características físico-químicas de estabilidade coloidal, as formulações de NC foram adequadas para estudos *in vivo* no modelo de camundongos.

Tabela 1.1: Características físico-químicas das nanocápsulas de arteméter

Nanocápsulas <sup>a</sup>	Tamanho hidrodinâmico médio $\pm$ DP <sup>b</sup> (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta $\pm$ DP (mV)
NC-branca	197,3 $\pm$ 0,85	0,17 $\pm$ 0,042	-56,3 $\pm$ 1,02
ATM-NC* (4 mg/ml)	254,5 $\pm$ 3,84*	0,26 $\pm$ 0,030	-50,2 $\pm$ 0,74*

<sup>a</sup>Nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) <sup>b</sup>DP: desvio padrão. Análise após a diluição 1:1000 em água MilliQ (n = 3 lotes de NC). \*(p<0,05)

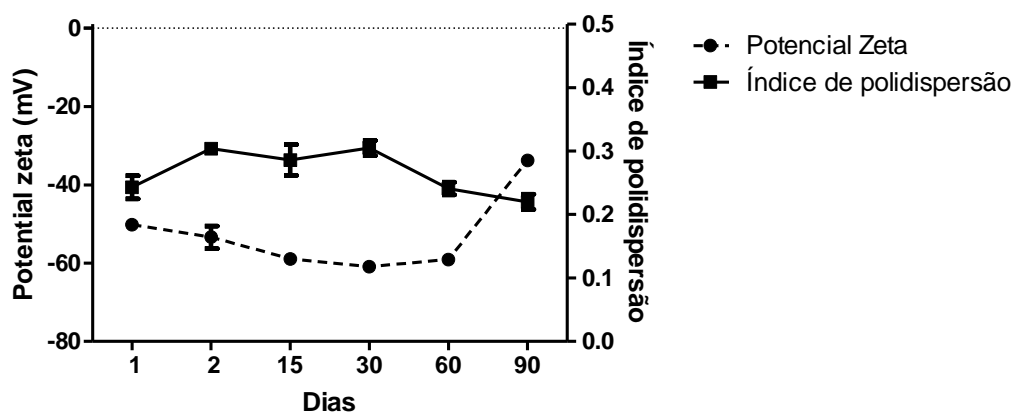


Figura 1.1: Potencial zeta e índice de polidispersão das nanocápsulas contendo ATM (ATM-NC) no decorrer de três meses. As análises foram realizadas em triplicatas nos dias 1, 2, 15, 30, 60, 90.

#### 1.4.2 Solubilidade do ATM e Cinética de dissolução/liberação *in vitro*

A solubilidade em equilíbrio do ATM em PBS (pH 7,4) a 37 °C em nossas condições experimentais foi de 14  $\mu$ g/ml. Dados anteriores obtidos por SHAH et al. (2016) indicaram valores de solubilidade maiores em meio aquoso utilizando-se método de quantificação por CLAE. O perfil de dissolução do fármaco livre é lento e atinge 100 % em 24h. Os perfis de liberação *in vitro* do ATM a partir das NC estudados em condições *sink* por um período de 24 horas, mostraram uma liberação de um *burst*

inicial de aproximadamente 29 % para a formulação ATM-NC nos primeiros 60 minutos, seguida de uma liberação de 44 % em 24 horas, sendo que dentro deste período não houve liberação total do ATM das NC. Houve uma fase de liberação/dissolução rápida em 2 horas (figura 1.2) seguida de uma fase sustentada entre 2 horas e 24 horas. A partir de 30 minutos observam-se diferenças significativas nos perfis de liberação/dissolução em PBS entre ATM-NC e ATM livre, com taxas de dissolução do ATM ( $K_d$ ) e a taxa de liberação aparente do NC ( $K_{app}$ ) diferentes (tabela 1.2). A velocidade de liberação do ATM contido nas NC foi significativamente menor que o perfil de dissolução do ATM livre ( $p < 0,05$ ). Este perfil demonstra que o ATM está fortemente associado ao núcleo das NC e com o mínimo de adsorção na superfície das NC. A espessura da parede polimérica das NC pode influenciar na taxa de difusão dos fármacos retidos no interior das NC, quanto mais espessa a parede polimérica e maior afinidade do fármaco pelo núcleo oleoso, maior o tempo de liberação do fármaco (CRUZ et al., 2006). O ATM é um fármaco altamente lipofílico desta forma possui alta afinidade pelo núcleo oleoso das NC. Além disso, o PCL é um polímero altamente hidrofóbico e se degrada lentamente. A análise desses dados indica que as NC são um sistema que efetivamente controla a velocidade de liberação do ATM em meio aquoso o que pode alterar efetivamente o perfil de dissolução do ATM ao longo do trato gastrointestinal. ADITYA et al. (2010) desenvolveram nanopartículas lipídica contendo ATM e também demonstraram um perfil de liberação bifásica com 25 % liberação do ATM nas primeiras 3 horas. Para melhor caracterizar o perfil de dissolução/liberação do ATM será importante a realização de experimentos utilizando outros meios que mimetizem os meios gástricos e sanguíneos.



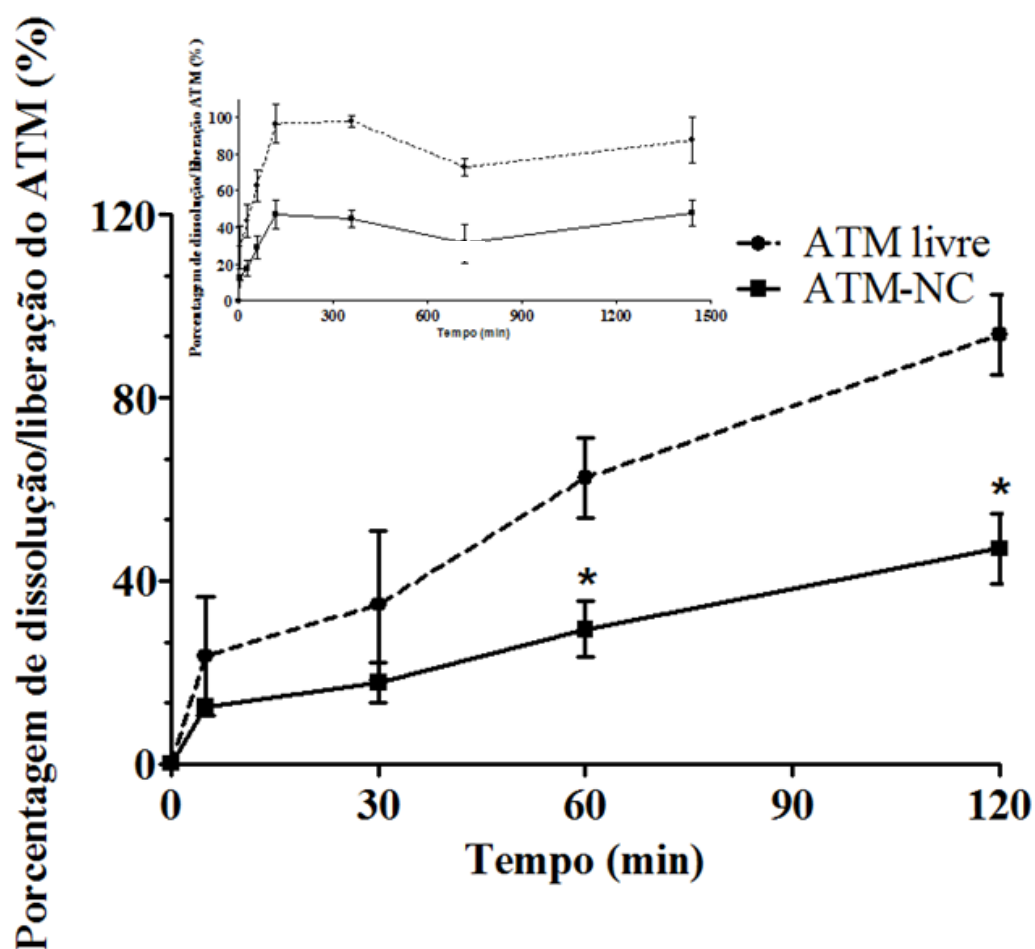


Figure 1.2: Porcentagem de Dissolução/Liberação de ATM de PCL-NC em solução salina tampão fosfato. *Insert*: perfil de liberação em 24 horas. Os dados são a média de três experimentos independentes  $\pm$  DP ( $n = 3$ ).

Tabela 1.2: Dissolução/liberação de ATM livre e ATM-NC

	ATM livre	ATM-NC
% liberação em 60 min	62,5 $\pm$ 8	29,4 $\pm$ 6
$^aK_d$ % $\text{min}^{-1}$	0,023	-
$^cK_{app}$ % $\text{min}^{-1}$	-	0,022

$^aK_d$  = constante de dissolução do ATM livre realizado em tampão PBS.  $^cK_{app}$  = constante de dissolução aparente do ATM nanoencapsulado (PCL-NC) realizado em tampão PBS. Cálculos realizados de acordo com COSTA E LOBO (2001).

# CAPÍTULO 2

## AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMALÁRICA DO ARTEMÉTER *IN VIVO*

### 2.1 Introdução

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016b), o tratamento da malária deve ser realizado com terapia combinada de medicamentos antimaláricos, incluindo derivados de artemisinina, a fim de reduzir a resistência a *P. falciparum*. Os derivados da artemisinina, como ATM, artesunato, arteéter e dihidroartemisinina, quando combinados com outros medicamentos antimaláricos reduzem significativamente a parasitemia e são indicados contra cepas resistentes de *P. falciparum* (LOBO et al., 2016; SOWUNMI et al., 2017; WHO, 2016b).

O presente trabalho investigou o emprego de novo sistema de entrega do ATM em modelo experimental da malária com o objetivo de investigar a eficácia oral do ATM nessa nova formulação de NC contra a infecção por *P. berghei* em modelo murino *in vivo*.

### 2.2 Objetivo específico

Avaliar a eficácia antimalárica *in vivo* do arteméter veiculado em nanocápsulas administradas por via oral.

### 2.3 Metodologia

#### 2.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL6 fêmeas com idade entre 6 a 8 semanas, com peso de 20 a 22 g. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto sob número 2014/14. Todos os experimentos estavam em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram mantidos

em condições ambientais, ciclo de dia/noite de 12 horas, temperatura ambiental  $22 \pm 2$  °C, dieta padrão e água *ad libitum*.

### **2.3.2 Protocolo de tratamento**

Os camundongos foram distribuídos em dois grandes grupos de animais: não infectados e infectados com *P. berghei*. A infecção foi realizada IV com  $10^6$  hemácias de camundongos infectados com *P. berghei* NK 65, diluídas em 200 ml de salina 0,9 % p/v. Os camundongos foram tratados por via oral duas vezes ao dia (a cada 12 horas), durante quatro dias, perfazendo oito administrações totais de cada dose: (1) veículo (n = 6); (2) NC-branca (n = 6); (3) ATM livre nas doses 40, 80 e 120 mg/kg (n = 6 cada) e (4) ATM-NC nas doses 40, 80 e 120 mg/kg (n = 6 cada). O volume máximo administrado oralmente era de 0,2 ml, para evitar a regurgitação. Para as doses mais altas eram esperados 5 minutos entre as administrações até atingir o volume final em acordo com o peso do camundongo.

As doses de ATM utilizadas no presente trabalho foram baseadas em estudo anterior, onde foi avaliado a neurotoxicidade do ATM, em ratos juvenis, por diferentes protocolos experimentais, usando doses de 0, 20, 30, 80, 120 e 200 mg/kg/dia durante 7 dias, via oral (BECKMAN; YOURENEFF; BUTT, 2013). Foi demonstrado que doses superiores a 30 mg/kg/dia apresentavam taxas de mortalidade crescente, necrose renal e hemorragia cerebral. Assim, foram escolhidas doses de 40, 80 e 120 mg/kg de ATM para avaliação da eficácia e da cardiotoxicidade *in vivo*. Além disso a escolha da dose de 40 mg/kg partiu da equivalência da dose utilizada em humanos. De acordo WHO (2016) a dose utilizada de ATM livre em humanos para a terapêutica da malária é de 3,2 mg/kg e no presente trabalho a dose de 40 mg/kg equivale a 3,3 mg/kg em humanos, de acordo com cálculo preconizado por FREIREICH et al. (1966).

### **2.3.3 Eficácia antimalárica**

O tratamento dos camundongos infectados por *P. berghei* foi realizado como descrito anteriormente por PETERS et al. (1986) com modificações em dois tipos de protocolos distintos.

Após a infecção estabelecida com parasitemia superior a 25 %, o que aconteceu no terceiro dia após a infecção, o tratamento foi iniciado como descrito no item 1.3.3 (n = 6 por grupo). A parasitemia foi monitorada no dia 0, correspondendo ao dia antes da infecção, e 3, 6, 11, 14, 21, 30 dias após a infecção, sendo o primeiro dia como o dia da infecção. As amostras de sangue da veia da cauda de camundongos foram utilizadas para obtenção de esfregaços de sangue fresco corados pelo Giemsa e contagem direta da parasitemia. A porcentagem de parasitemia foi determinada pela contagem do percentual de glóbulos vermelhos infectados divididos pelas hemácias não infectadas, (figura 2.1) observados em microscópio óptico com aumento de 1000 x, examinando um mínimo de 3000 células por cada camundongo.

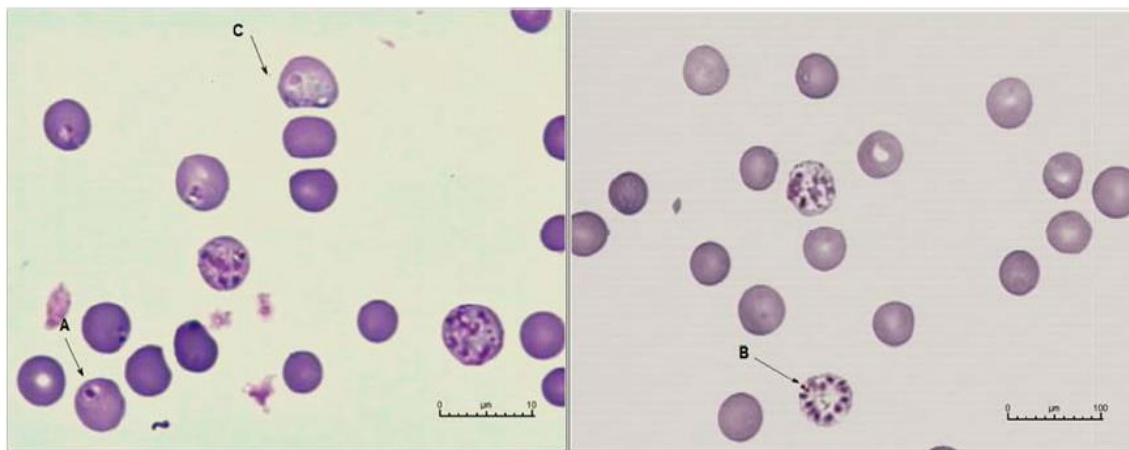


Figura 2.1: Esfregaço sanguíneo de camundongos infectados com *P. berghei*. As setas mostram as hemácias infectadas com o parasita em diferentes estágios de amadurecimento intraeritrocitário. (A) Trofozoítos jovens; (B) Esquizontes maduros, formas assexuadas do parasita; (C) Gametócitos, formas sexuadas do parasita. (VIDAL-DINIZ, 2014).

Também foi avaliado o percentual de sobrevivência, no período de 30 dias, dos camundongos infectados após o tratamento oral com NC-branca, veículo, ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg de acordo com o protocolo de tratamento descrito no item 2.3.2 (n = 6, cada).

#### 2.3.4 Sobrevivência de camundongos não infectados

Foi avaliado a taxa de sobrevivência de camundongos não infectados a fim de se determinar a toxicidade geral após o tratamento oral com a dose mais alta (120 mg/kg)

do ATM livre e ATM-NC. Os camundongos foram tratados, como descrito no protocolo de tratamento, com veículo, NC-branca, ATM livre ou ATM-NC (n = 6, cada). O número de sobreviventes foi avaliado durante 30 dias consecutivos. Apenas a dose mais alta foi utilizada para este experimento, pois, dentre as doses estudadas, é a potencialmente mais tóxica.

### 2.3.5 Análise estatística

Os dados de parasitemia foram analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste Tukey e para comparar o percentual de sobrevivida foi utilizado Kaplan-Meier e regressão Cox. O software Graph Pad Prism® 5.0 (Graph Pad Software, EUA) foi usado como ferramenta para análise estatística. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram considerados significativos quando P era menor ou igual a 0,05 ( $P < 0,05$ ).

## 2.4 Resultados e Discussão

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL6 para avaliar a eficácia antimalárica do ATM, modelo também utilizado por KHOURY et al. (2017) para demonstrar a eficácia do artesunato na redução do número de *P. berghei*. Além disso, BOPP et al. (2013), usando diferentes modelos *in vivo* de malária demonstraram que não há diferença significativa na taxa de sobrevivência entre machos e fêmeas.

Os camundongos infectados e tratados com ATM livre ou ATM-NC nas doses de 40, 80 ou 120 mg/kg (figura 2.2), tiveram redução no número de parasitas e aumento da taxa de sobrevivida (figura 2.3) quando comparado àqueles tratados com veículo e NC-branca (grupos controle). No 6º dia após a infecção o tratamento oral com ATM livre na dose de 120 mg/kg reduziu a parasitemia em 63 % e enquanto o ATM-NC na mesma dose reduziu a parasitemia em 69 %, quando comparado ao veículo e NC-branca, respectivamente (figura 2.2C). ATM-NC foi eficaz na redução do número de parasitas em todas as doses estudadas 40, 80 e 120 mg/kg, (figura 2.2A-C). Além disso, durante todo período analisado, os camundongos tratados com ATM-NC apresentaram maior taxa de sobrevivida que aqueles tratados com ATM livre (figura 2.3A-C). No 30º dia, após a dose de 120 mg/kg, a taxa de sobrevivida para camundongos tratados com ATM-NC foi de 100 % enquanto para os tratados com ATM livre foi de apenas 66 %. Todos

os animais tratados com veículo ou NC-branca morreram até o 9º dia após a infecção apresentando parasitemia superior a 26 %, indicando ausência de efeito das NC-brancas contra o parasita o que ocasiona elevada parasitemia e consequentemente elevada mortalidade.

Na avaliação da toxicidade do ATM na maior dose utilizada (120 mg/kg) e sua influência sobre a taxa de sobrevivência de animais não infectados, os camundongos tratados com veículo, NC-branca ou ATM-NC mostraram 100 % de sobrevivência, indicando ausência de efeito tóxico da formulação que possa causar mortalidade. No entanto, 50 % dos camundongos tratados com ATM livre não sobreviveram após 4 dias de tratamento, indicando toxicidade. A nanoencapsulação do ATM eliminou assim a toxicidade na dose mais alta estudada.

ATM-NC nas doses 40, 80 e 120 mg/kg aumentou a taxa de sobrevivência dos camundongos infectados e induziu a clearance completa dos parasitas do sangue quando comparado ao tratamento ATM livre nas mesmas doses. Como esperado, foi observado uma remissão completa da doença em altas doses. Esse efeito pode ser atribuído à alteração na biodisponibilidade do ATM. Nossos resultados estão de acordo com resultados anteriores que mostram NC capazes de alterar o perfil farmacocinético e a biodistribuição de moléculas lipofílicas, aumentando a exposição ao fármaco e melhorando a eficácia (BRANQUINHO et al., 2017b; GARCIA et al., 2015; MOSQUEIRA et al., 2004). O ATM livre tem uma absorção rápida, mas incompleta por via oral (KARBWANG et al., 1997). Assim, é importante destacar a eficácia ATM-NC por esta via, uma vez que a mesma é a mais conveniente e viável para uso na população, principalmente quando consideramos que a malária grave atinge particularmente as crianças. Esta formulação poderá ser facilmente administrada em forma líquida para uso pediátrico, representando uma vantagem considerável em termos de regime posológico. Além disso, estudos anteriores mostram as vantagens da mesma para uso parenteral.

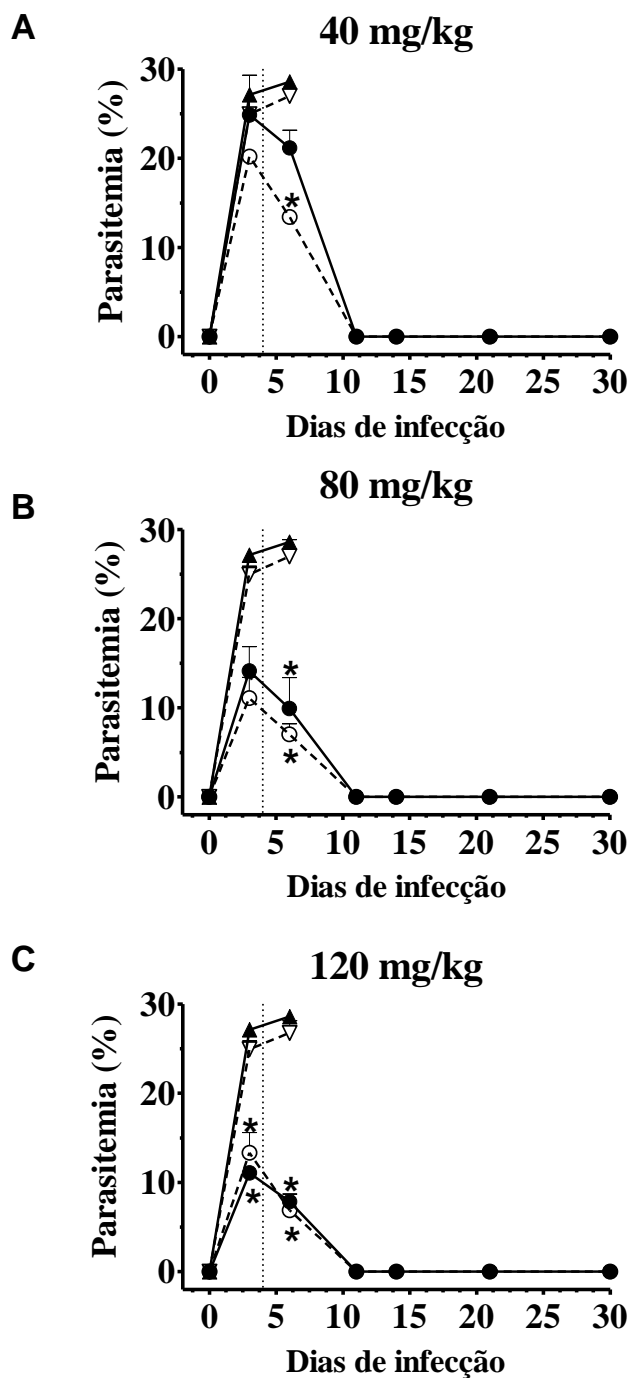


Figura 2.2: Percentual de parasitas em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* após o tratamento por via oral com veículo, NC-branca, ATM livre ou ATM-NC. A: 40 mg/kg de ATM; B: 80 mg/kg de ATM; C: 120 mg/kg de ATM. A linha vertical pontilhada indica o primeiro dia de tratamento. \* $P < 0,05$ . ANOVA seguida do pós-teste de Tukey, comparação entre grupos tratados com veículo e NC-branca e grupos tratados com ATM-NC e ATM livre (os dados numéricos estão expressos na tabela 8.1-ANEXOS).

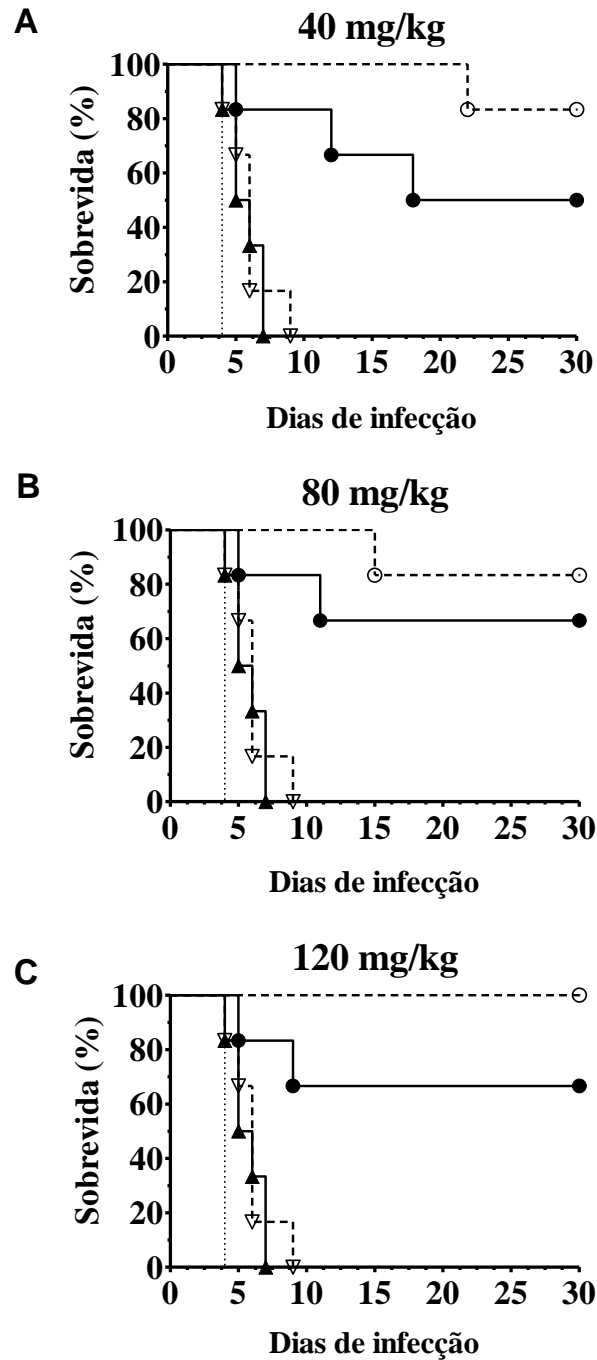


Figura 2.3: Percentual de sobrevivência de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* após o tratamento por via oral com veículo, NC-branca, ATM livre ou ATM-NC. A: 40 mg/kg de ATM; B: 80 mg/kg de ATM; C: 120 mg/kg de ATM. A linha vertical pontilhada indica o primeiro dia de tratamento. Kaplan-Meier e regressão Cox, comparação entre grupos tratados com veículo e NC-branca e grupos tratados com ATM-NC e ATM livre (os dados numéricos estão expressos na tabela 8.1-ANEXOS).



# CAPÍTULO 3

## AVALIAÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE DO ARTEMÉTER

### 3.1 Introdução

A atividade contrátil do coração é responsável pelo bombeamento sanguíneo e é dependente da despolarização de suas células musculares. A despolarização celular gera a atividade elétrica que se propaga por toda estrutura anatômica deste órgão (ver POLLOCK; MAKARYUS, 2017).

Esta atividade elétrica é dependente da troca de íons do meio extracelular e intracelular gerando o PA. A deflagração do PA é constituída por diferentes fases, as quais envolvem a participação de diferentes canais iônicos. De acordo com revisão de NERBONNE e KASS (2005), o PA pode ser subdividido nas seguintes fases:

Fase 0: Abertura dos canais de  $\text{Na}^+$  e dos canais de  $\text{K}^+$  de saída transitória rápida (Ito,f), desencadeando a despolarização da célula cardíaca.

Fase 1: Abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem do tipo L e do tipo T. Nessa fase os canais Ito,f contribuem de forma mais ativa que na fase 0.

Fase 2: platô do PA, uma vez que nesta fase é mantida a ativação da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  iniciada na fase 1. Início da repolarização celular a partir da ativação de canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem que possuem uma cinética de ativação mais lenta.

Fase 3: Repolarização celular a partir da inativação da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  e ativação da corrente de  $\text{K}^+$ .

Fase 4: Repouso celular. Participação dos canais de  $\text{K}^+$  do tipo retificadores de entrada os quais são ativados por hiperpolarização e os canais de potássio sensíveis a ATP.

A passagem do sinal elétrico pelo coração tem início no nodo sino atrial, o qual tem a função de controlar o ritmo cardíaco. O PA iniciado no nodo sino atrial se dissemina por todo o miocárdio atrial. Em segue, o impulso elétrico se converge para o

nodo atrioventricular, posteriormente atinge o feixe de His e se deflagra pelas fibras de Purkinje. Deste modo, a despolarização é distribuída ao miocárdio favorecendo aumento da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma dos cardiomiócitos permitindo assim a cascata de acoplamento excitação-contração (AEC) culminando na contração cardíaca (ver POLLOCK; MAKARYUS, 2017).

A contração cardíaca é determinada pelo processo AEC (ver BERS, 2002; GAMBARDELLA; TRIMARCO; IACCARINO, 2017). Este processo origina-se no túbulo T na membrana sarcoplasmática. Ao longo do túbulo T existem canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L e T. O  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se liga aos receptores de rianodina presentes no retículo sarcoplasmático e permitem a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  que estocado, aumentando mais a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este processo ocorre durante a sístole cardíaca. Quando ocorre o aumento das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  o processo de contração muscular é desencadeado por estimular a interação entre as fibras miosina-actina. Ao ocorrer a contração, o  $\text{Ca}^{2+}$  é recaptado pra o retículo sarcoplasmático a partir da ação da SERCA à qual é modulada pela fosfolambana. O  $\text{Ca}^{2+}$  também é transportado para o interior das mitocôndrias a partir da ação de um transportador uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e levado ao citoplasma pelo transportador antiporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX). Em consequência ao aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior das mitocôndrias há formação de ATP. Por fim, as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  voltam aos valores basais, permitindo assim o relaxamento do miócito ventricular cardíaco, promovendo a diástole (figura 3.1) (ver BERS, 2002, 2008).

O eletrocardiograma (ECG) é o registro dos fenômenos elétricos que se originam durante a atividade cardíaca (figura 3.2), sendo de simples realização, seguro, reprodutível e baixo custo (GUIMARÃES et al., 2003). Considerado padrão ouro para diagnóstico não invasivo das arritmias e distúrbios de condução cardíaca (ANDRADE et al., 2009). Dentre os parâmetros extraídos do ECG, o prolongamento do intervalo QT é um importante marcador de cardiotoxicidade desenvolvida por fármacos (DARPO; NEBOUT; SAGER, 2006). De acordo com FDA (2005) (*Food and Drug Administration*) para que novos fármacos sejam lançados no mercado é preciso que sejam realizados estudos clínicos e não clínicos que avaliem o potencial destas novas substâncias em atrasar a repolarização ventricular. Esta avaliação deve incluir os efeitos de novos agentes sob os intervalos QT e QTc, bem como a coleta de eventos adversos cardiovasculares (FDA, 2005). No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013) determina a importância do ECG em estudos não clínicos de

toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de fármacos. Para estes estudos é definido que os parâmetros a serem avaliados no ECG são intervalos QT, PR, QRS e frequência cardíaca (FC).

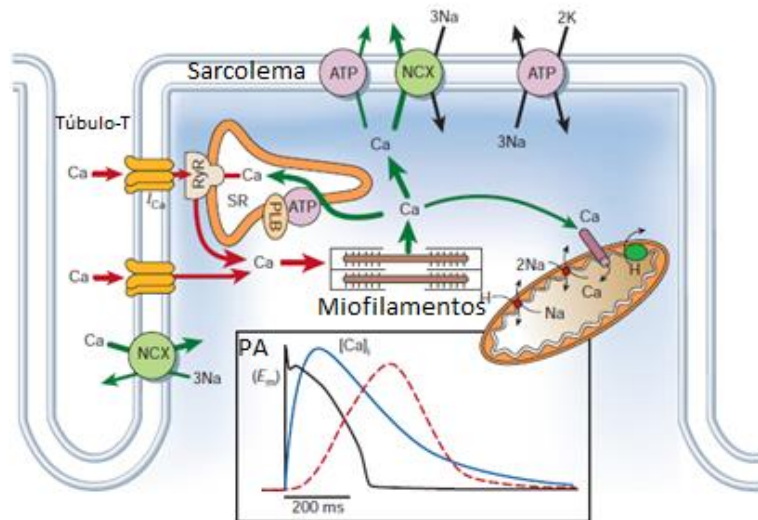


Figura 3.1: Transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos ventriculares, ativação dos miofilamentos e representação do potencial de ação causado pelo aumento transitório das concentrações do íon  $\text{Ca}^{2+}$ . NCX: transportador antiporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; PA: potencial de ação; PLB: fosfolambam; RYR: rianodina; SR: retículo sarcoplasmático. (Fonte: BERS, 2002) .

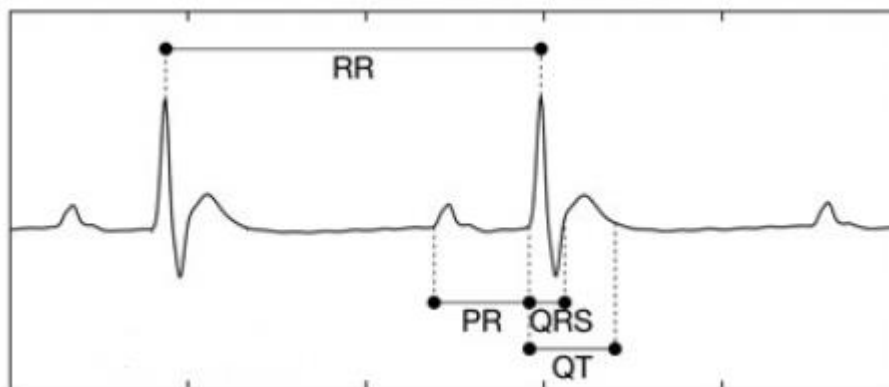


Figura 3.2: Traçado eletrocardiográfico de homem adulto sadio (SOUZA et al., 2017)

O ecocardiograma (ECO) é um método não invasivo que permite avaliar a estrutura, função e a hemodinâmica cardíaca, dados essenciais para avaliar a segurança e eficácia de medicamentos (DOUGLAS et al., 2009). Dentre os parâmetros obtidos pelo ECO, a fração de ejeção e a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo são importantes parâmetros preditores de cardiotoxicidade (BARBOSA et al., 2009). Para os quimioterápicos, por exemplo, a queda em 10 % da fração de ejeção é estabelecida como parâmetro para interrupção do tratamento, indicando cardiotoxicidade grave. Alterações no diâmetro do ventrículo esquerdo, massa ventricular e espessura de parede, são achados mais tardios no curso da terapêutica com fármacos cardiotoxícos e aparecem quando as lesões miocárdicas (ver SALGADO; COELHO FILHO; REIS, 2014).

A malária grave é responsável por ocasionar diversos danos à saúde do paciente, incluindo o surgimento de anormalidades cardíacas (WHO, 2016a). Existem diferentes mecanismos que a infecção por *P. falciparum* pode gerar distúrbios cardíacos. Os eritrócitos parasitados podem ocluir capilares do miocárdio, levando a cardiomiopatia isquêmica (MOHSEN et al., 2001; COSTENARO et al., 2011); altos níveis de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) podem desempenhar um importante papel no processo inflamatório do coração, prejudicando a função miocárdica (TORRE-AMIONE et al., 1996). A anemia grave pode levar a hipóxia que pode causar lesão isquêmica no miocárdio acarretando em prolongamento do intervalo QTc do ECG, como frequentemente observado em crianças (SADOH; UDUEBOR, 2016).

Além das complicações cardiovasculares inerentes à infecção por *P. falciparum*, os medicamentos antimaláricos atualmente disponíveis podem agravar e desencadear efeitos cardiotoxícos adicionais. A hipotensão é observada pelo uso de quinina e quinidina (MECCA et al., 1980); a cloroquina pode causar transtornos de condução cardíaca e hipotensão levando a morte súbita (LOOAREESUWAN et al., 1986). A amodiaquina induz ao prolongamento dos intervalos PR, QRS e QTc (NGOUESSE et al., 2001). A primaquina causa inibição dos canais de Na<sup>+</sup> dos cardiomiócitos (ORTA-SALAZAR et al., 2002). Halofantrino (NOSTEN et al., 1993; LEITE et al., 2007) e derivados de artemisinina (CLASSEN et al., 1999; YIN et al., 2014) causam prolongamento do intervalo QT e TdP.

A cardiotoxicidade causada pelos derivados da artemisinina foi demonstrada em estudos realizados em ratos (BREWER et al.,1994) e cães (CLASSEN et al., 1999; YIN et al., 2014) após o tratamento com ATM (CLASSEN et al., 1999; YIN et al., 2014), artesunato (YIN et al., 2014) e arteeter (BREWER et al.,1994) por via IM (BREWER et al.,1994; CLASSEN et al., 1999; YIN et al., 2014) ou oral (CLASSEN et al., 1999; YIN et al., 2014) que causaram o prolongando o intervalo QT do ECG. O prolongamento do intervalo QT é uma importante alteração eletrocardiográfica, indicativa da toxicidade do fármaco, está associada com a ocorrência de taquiarritmias ventriculares malignas e predispõe TdP, o que pode levar à morte súbita (CHAN et al., 2007; LIN; KUNG, 2009; ISBISTER; PAGE, 2013). Uma extensa revisão de HAVERKAMP et al. (2000) demonstrou que os fármacos são capazes de causar prolongamento do intervalo QT por diferentes razões, como o bloqueio dos canais  $IK_r$  e  $IK_s$ ; alteração do transiente  $Ca^{2+}$  e ativação dos canais  $I_{Na^+}$  tardios. Portanto, além de análises eletrocardiográficas, é importante realizar estudos *in vitro* para compreender a cardiotoxicidade do ATM e encontrar alternativas para reduzir esses efeitos.

As NC podem ser usadas estrategicamente para reduzir os efeitos cardiotóxicos causados por fármacos antiparasitários (LEITE et al., 2007; BRANQUINHO et al., 2017b), pois são capazes de modificar o perfil de biodistribuição dos fármacos, os quais estariam menos disponíveis a se associarem ao tecido cardíaco e causarem efeitos tóxicos. Assim, as NC são importantes ferramentas para impedir a cardiotoxicidade causada pelo ATM. Deste modo, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar os efeitos cardiotóxicos *in vitro* e *in vivo* do ATM livre e ATM-NC.

### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar a cardiotoxicidade *in vitro* em cardiomiócitos isolados de camundongos não infectados não tratados e tratados com arteméter livre ou veiculado em nanocápsulas.

Avaliar a cardiotoxicidade *in vivo* do arteméter livre ou veiculado em nanocápsulas.

### **3.3 Metodologia**

#### **3.3.1 Avaliação da atividade citotóxica do ATM**

Para a definição das concentrações de ATM livre a serem utilizadas sob cardiomiócitos isolados foi necessário a realização de estudos de citotoxicidade. A partir da técnica do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983) foi determinada a viabilidade celular em presença de diferentes concentrações de ATM livre. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelos analitos no metabolismo celular através da avaliação da atividade residual das desidrogenases mitocondriais (MACIEL et al., 2002). A atividade celular é quantificada pela redução do sal de tetrazólio, de cor amarela, em um produto insolúvel, a formazana, de cor azul, através da ação da enzima succinil desidrogenase mitocondrial presente em células viáveis (KUMAR-ROINÉ et al., 2009). Foram utilizadas 5.000 células de aorta de ratos Wistar (células imortalizadas). Essas células foram adicionadas em volume de 200 µl de meio de cultura, que já havia sido colocado em cada poço, formando uma suspensão de células. Em seguida as células foram deixadas em repouso por 24 horas em estufa a 37°C. Após 24 horas as células já estavam aderidas a placa sendo possível a retirada dos 200 µl do meio e a adição de: DMSO:Tween (7:3) diluído 2000 vezes em Tyrode (veículo); ATM nas concentrações de 0,1 µM; 0,5 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM; meio de cultura (controle positivo); DMSO sem diluição (controle negativo). Depois de 3 dias de incubação das células com ATM, foi adicionado ao meio 20 µl de MTT, na concentração de 2 mg/ml por poço. Em seguida, as células foram novamente colocadas em estufa a 37°C por um período de 4 horas. Depois de 4 horas o meio foi aspirado, em seguida foi adicionado 200 µl de DMSO e homogeneizado. Enfim, as placas foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.

#### **3.3.2 Isolamento dos cardiomiócitos**

Os cardiomiócitos foram isolados de camundongos não tratados ou tratados (como descrito no item 1.3.3) com veículo, NC-branca ou com a dose máxima (120 mg/kg) de ATM livre ou ATM-NC. Para os camundongos tratados, o procedimento de isolamento celular foi iniciado duas horas após a administração da última dose do tratamento. O coração foi perfundido usando o sistema de Langendorff

em fluxo retrógrado de 5 a 10 ml/min durante 6 a 8 min a 37°C com solução de Tyrode modificada composta por 113 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 0,6 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,2 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 12 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM de  $\text{KHCO}_3$ , 10 mM de Hepes (pH 7,4), 30 mM de taurina, 0,5 mM de glucose. Aos 3 a 4 min do início da perfusão foi adicionado a liberase 0,1 g/ml (Roche, Basileia, Suíça). Após o tratamento enzimático (4 a 6 min), o ventrículo esquerdo foi removido, as células foram obtidas após a dissociação mecânica e filtradas em malha de nylon. Os miócitos isolados foram imersos em solução de Tyrode sem enzima e a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  foi incrementada gradualmente para 1 mM por adição de  $\text{CaCl}_2$  em quatro passos sequenciais de 100, 100, 300 e 500 mM com um intervalo de 10 minutos entre os passos. Os experimentos foram realizados em cardiomiócitos recém-isolados. A solução contendo cardiomiócitos foi mantida à temperatura ambiente até o uso dentro de 1-4 horas após o isolamento. Antes da incubação, os cardiomiócitos recém isolados foram colocados em solução padrão de Tyrode (NaCl 121 mM, KCl 5,0 mM,  $\text{CaCl}_2$  a 1,8 mM,  $\text{MgCl}_2$  a 0,5 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,4 mM,  $\text{NaHCO}_3$  a 24 mM, EDTA 0,1 mM e glicose 5,5 mM) (ROY et al., 2015).

### **3.3.4 Contração e medidas de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular dos cardiomiócitos**

Os efeitos sobre o comprimento do sarcômero (SL), o qual se relaciona à contratilidade, e o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  dos cardiomiócitos foram monitorados utilizando-se o sistema IonOptix (Milton, MA, EUA) conectado ao microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha). Os cardiomiócitos em meio Tyrode foram estimulados por eletrodos de platina colocados na placa, com pulsos de voltagem de 1 ms de duração e a frequência de estimulação ajustada a 1 Hz. Para monitorar o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, os cardiomiócitos foram incubados por 15 minutos com o indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescente ratiométrico Indo-1AM (2 mM, In vitro-gen, Grand Island, NY, EUA). A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico foi determinada pela fluorescência a 405 nm e 480 nm. A proporção de emissão em 405 nm/480 nm indica a concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para observar arritmias, contrações anormais do cardiomiócito que correspondem a extra-sístoles ventriculares, os cardiomiócitos foram estimulados durante um período de 30 segundos seguido de um período de repouso de 30 segundos, como utilizado por BRANQUINHO (2017b).

Os seguintes parâmetros foram avaliados: encurtamento do sarcômero, relacionado a contratilidade celular;  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico o qual se refere a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  presente no citosol durante o relaxamento celular; pico máximo do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que quantifica a concentração máxima do  $\text{Ca}^{2+}$  durante a contração celular; tau que representa o decaimento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ao final da contração celular, ou seja, o quanto de  $\text{Ca}^{2+}$  está sendo recaptado para o retículo sarcoplasmático (IONOPTIX, 2011). Foram realizados dois protocolos distintos:

A) Cardiomiócitos foram obtidos de camundongos não infectados e não tratados. Estes cardiomiócitos foram incubados com DMSO:Tween (veículo) ou diferentes concentrações de ATM livre, 0,1; 1,0 ou 10  $\mu\text{M}$ , e em seguida as análises de contração e medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foram realizadas.

B) Cardiomiócitos foram obtidos de camundongos não infectados previamente tratados com veículo, NC-branca, ATM livre 120 mg/kg ou ATM-NC 120 mg/kg, de acordo com o descrito no item 2.3.2. O isolamento dos cardiomiócitos foi realizado duas horas após a última administração oral do tratamento, e em seguida as análises de contração e medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foram realizadas.

### **3.3.5 Eletrofisiologia: Potencial de ação e canais de $\text{Ca}^{2+}$ do tipo L**

A eletrofisiologia foi determinada a temperatura ambiente (22-24°C) em células ventriculares cardíacas isoladas dos camundongos não infectados previamente tratados de acordo com o item 2.3.2 com veículo, NC-branca, ATM livre 120 mg/kg e ATM-NC 120 mg/kg. Os cardiomiócitos foram isolados duas horas após a última administração oral. Os experimentos foram conduzidos utilizando um amplificador EPC 9.2 (HEKA, Harvard Bioscience, Inc., Holliston, MA, EUA).

Em todos os registros, antes do início da experimentação, as células que foram colocadas na placa foram mantidas em repouso durante 3 min para permitir que a solução de pipeta se equilibrasse com o ambiente intracelular. As pipetas de vidro tiveram resistências variando entre 1 e 2  $\text{M}\Omega$ . Para a medição do PA, aplicou-se um pulso de 1.000 pA com duração de 2 a 4 ms, com frequência de 1 Hz, durante 5 min. Os PA medidos durante os experimentos foram adquiridos a uma frequência de amostragem de 10 KHz. Para medir a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L ( $\text{I}_{\text{Ca}^{2+},\text{L}}$ ) foi utilizada solução interna (mM): 120 CsCl, 20 TEA-Cl, 5 NaCl, 10 Hepes, 5 EGTA, pH 7.2,



ajustado com CsOH, sendo a solução externa Tyrode. A solução de banho continha (em mM): NaCl 130; KCl 4; MgCl<sub>2</sub> 1.8; CaCl<sub>2</sub> 1.8; HEPES 10; glicose 11, (pH ajustado a 7.4). As curvas densidade de corrente voltagem foram obtidas por pulsos de 500 ms variando de - 80 mV a + 60 mV a cada 10 s, com 10 mV de incremento em cada pulso. As curvas de ativação do estado estacionário foram equipadas com a equação de Boltzmann  $G/G_{max} = 1 / \{1 + \exp [(V-V_{0.5})/k]\}$  onde  $V_{0.5}$  é a tensão na qual 50% da condutividade máxima foi atingida e  $k$  é o fator de inclinação. As curvas de inativação de estado estacionário foram obtidas por pulsos de 300 ms a 0 mV imediatamente após cada pré-pulsos usado para obter as curvas e ajustado usando a seguinte equação:  $I = G_{max} \times (E_m - E_{Ca^{2+}}) / [1 + \exp (V_{0.5} - E_m)/k]$ , onde  $G_{max}$  é a condutância máxima,  $E_m$  é o potencial de membrana de teste,  $E_{Ca^{2+}}$  é a reversão Potencial I para íons  $Ca^{2+}$ ,  $V_{0.5}$  é a tensão na qual 50 % da condutância máxima foi alcançada, e  $k$  é o fator de inclinação. Todas as correntes foram evocadas a partir de um potencial de retenção de - 80 mV e amostradas digitalmente a 10 KHz (GONDIM et al., 2017).

### 3.3.6 Ecocardiograma

Apenas animais não infectados (sem tratamento) e tratados com ATM livre (120 mg/kg) ou ATM-NC (120 mg/kg) foram submetidos à avaliação do ecocardiograma. O registro do ecocardiograma foi realizado duas horas após a última administração oral. O ecocardiograma foi realizado usando um sistema de ultra-som de alta resolução (Vevo 2100, VisualSonics, Toronto, ON, Canadá) equipado com um transdutor de 40 MHz. Os camundongos foram anestesiados com 1,5 % de isoflurano em 100 % de oxigênio e colocados em uma mesa de aquecimento em posição supina. A temperatura corporal foi monitorada através de um termômetro retal e mantida a 36-38 °C. ECGs foram registrados ao longo do procedimento ecocardiográfico com eletrodos fixados nos membros. A ejeção e as ações de encurtamento foram calculadas a partir dos diâmetros do ventrículo esquerdo nas medidas do modo M ao nível dos músculos papilares em uma visão bidimensional do eixo curto paraesternal. A ejeção também foi calculada a partir de uma visão de eixo longo paraesternal de modo B, rastreamento as áreas endocardiais diastólica e sistólica finais para estimar os volumes do ventrículo esquerdo e do endocárdio. O Doppler de onda pulsada do fluxo sanguíneo ascendente da aorta foi registrado, permitindo a medição integral do tempo e

velocidade. As sequências de vídeos foram adquiridas com ao menos três ciclos cardíacos (BRANQUINHO et al., 2017b).

Os parâmetros obtidos neste trabalho a partir do ECO foram: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; fração de ejeção do ventrículo direito; fração de encurtamento do ventrículo direito; fração de mudança de área e fluxo aórtico. A fração de ejeção e fração de encurtamento do ventrículo esquerdo referem-se a função sistólica do ventrículo esquerdo enquanto a fração de ejeção, a fração de encurtamento e a fração de mudança de área referem-se a função sistólica do ventrículo direito (BARBOSA et al., 2009). Alterações na função sistólica do ventrículo esquerdo estão associadas com hipertensão e insuficiência (GOTTDIENER et al., 2004), já as alterações da função sistólica direita estão envolvidas com dispneia e congestão pulmonar (ver SILVA; AMODEO; RAMIRES, 2002). O fluxo aórtico está relacionado a função hemodinâmica cardíaca, sendo que sua diminuição juntamente a outras alterações sistólicas ventriculares podem estar associadas a estenose aórtica (MULVAGH et al., 2008).

### **3.3.7 Eletrocardiograma**

Dezesseis grupos experimentais de camundongos machos não infectados e infectados por *P. berghei* foram tratados por via oral, conforme descrito no item de protocolo de tratamento 1.3.3, com veículo, NC-branca, ATM livre (40, 80 e 120 mg/kg) ou ATM-NC (40, 80 e 120 mg/kg). Para registro de sinal de ECG, os camundongos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilasina (14 mg/kg), intraperitonealmente. O ECG foi obtido antes do tratamento (basal) e 2, 6 e 24 horas pós-tratamento para camundongos não infectados e nos tempos 6 e 24 horas pós-tratamento para camundongos infectados. Para os camundongos infectados o tempo de 2 horas não foi avaliado devido as respostas de cardiotoxicidade para animais não infectados terem ocorrido principalmente nos tempos de 6 e 24 horas, os estudos iniciaram com camundongos não infectados e posteriormente foram realizados em camundongos infectados. O ECG foi realizado na derivação periférica II e gravado continuamente durante 5 minutos usando eletrodos de agulhas de aço inoxidável inseridas subcutaneamente e conectadas por um cabo blindado a um amplificador biopotencial com uma passagem de banda de 0,5-100 Hz. O sinal de ECG foi amostrado

à 1200 Hz com uma placa de conversão A/D de resolução de 16 bits (DaqBoard/2001, IOtech, EUA). Utilizando o software Dataq (EUA), três segmentos de 2 segundos foram extraídos de cada registro obtido para medir valores individuais das ondas do ECG. Os parâmetros medidos do ECG foram os intervalos RR, PR, QRS e QT. O intervalo RR foi medido entre duas ondas R sucessivas, determinando um ciclo cardíaco completo e usado para calcular a FC em batimentos por minuto (bpm), onde  $FC = 60/RR$ . O intervalo PR foi medido desde o início da onda P até o início do complexo QRS, significando o intervalo entre o início da despolarização atrial e o início da despolarização ventricular. O intervalo QRS foi medido entre o início da onda R e o fim da onda S e representa a despolarização ventricular. O intervalo QT foi medido entre o início do complexo QRS e o fim da onda T, que representam uma sístole ventricular completa, incluindo despolarização e repolarização (ANDRADE et al., 2009). Além dos intervalos medidos também foi calculado o intervalo QTc, que é o intervalo QT corrigido pela FC através da fórmula de FRIDERICIA, (1920) ( $QTc = QT/(RR)^{1/3}$ ). Este intervalo é um melhor marcador de riscos de arritmias cardíacas, devido a menor dependência da FC. Os intervalos ECG são expressos como valores absolutos (média  $\pm$  EPM) em segundos, exceto para a figura 4.13 que são mostrados em ms.

### **3.4 Resultados e Discussão**

#### **3.4.1 Avaliação da atividade citotóxica do ATM**

O ATM não alterou significativamente o crescimento das células de aorta de rato quanto comparado com o controle positivo (figura 3.3). A absorbância foi semelhante entre os grupos de células incubadas com ATM e a incubação apenas com o meio de cultura (controle positivo), indicando que o ATM, nas concentrações estudadas, não foi citotóxico.

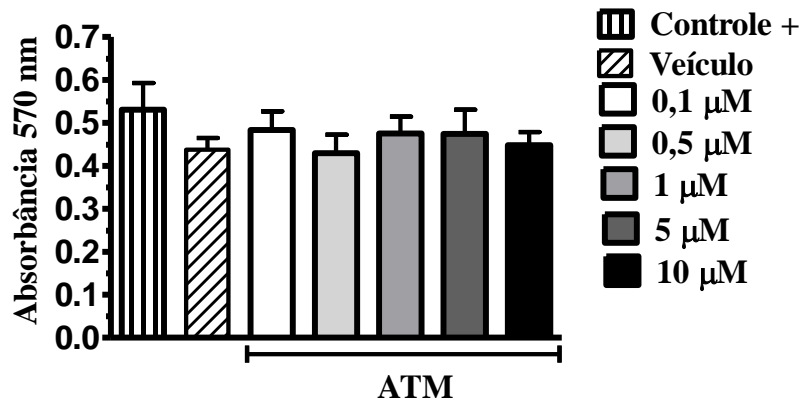


Figura 3.3: Efeito de concentrações crescentes do ATM livre sobre o crescimento de células isoladas de aorta de rato (média  $\pm$  EPM).

As concentrações de ATM utilizadas *in vitro* no presente trabalho foram baseadas em estudo anterior (HARA et al., 2007) cujo resultado demonstrava efeitos anticolinérgicos da artemisinina nas concentrações de 1, 10, 100 e 300  $\mu$ M em cardiomiócitos isolados de cobaias. Foi demonstrado que os efeitos anticolinérgicos eram dependentes da concentração de artemisinina e era mediada pela inibição do canal de  $K^+$  muscarínico ( $I_K$  ACh). Em nosso trabalho, utilizamos concentrações a partir de 0,1  $\mu$ M de ATM para avaliação do efeito agudo em cardiomiócitos e devido a dificuldades de solubilizar o ATM em concentrações de 100 e 300  $\mu$ M, estas não foram avaliadas. Assim, as concentrações de ATM estudadas em cardiomiócitos foram 0,1, 1 e 10  $\mu$ M.

### 3.4.2 Contração e medidas de $Ca^{2+}$ intracelular em cardiomiócitos

Foram avaliados os efeitos do ATM livre, nas concentrações de 0,1, 1 e 10,0  $\mu$ M, sobre o transiente de  $Ca^{2+}$  e contratilidade dos cardiomiócitos recém isolados de ventrículo esquerdo de camundongos que não receberam nenhum tipo de tratamento. O ATM livre na concentração de 10  $\mu$ M foi capaz de reduzir significativamente o  $Ca^{2+}$  diastólico (figura 3.4E). Porém, não foram observadas alterações sobre o encurtamento do sarcômero (figura 3.4C), no pico máximo do transiente de  $Ca^{2+}$  e no decaimento do  $Ca^{2+}$  (Tau) (figura 3.4D, F). Contudo, ondas espontâneas de  $Ca^{2+}$  ocorreram após a incubação com todas as concentrações de ATM durante os períodos de repouso (diástole) e/ou durante a estimulação elétrica (figura 3.5A-E) levando a arritmias (figura

3.5F). O desenvolvimento de arritmias foi máximo para as concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$ . Essas avaliações também foram realizadas com células não tratadas e células incubadas com DMSO:Tween (veículo), não houve diferença estatística entre os grupos controle para nenhum dos parâmetros avaliados. Os resultados nos demonstraram que a presença de ATM não gera grandes modificações na capacidade contrátil dos cardiomiócitos, contudo aumenta significativamente o número de arritmias. As arritmias cardíacas são disfunções na condução elétrica e podem levar a parada cardíaca e até mesmo a morte, demonstrando, assim, a gravidade deste quadro (FEITOSA et al., 2002).

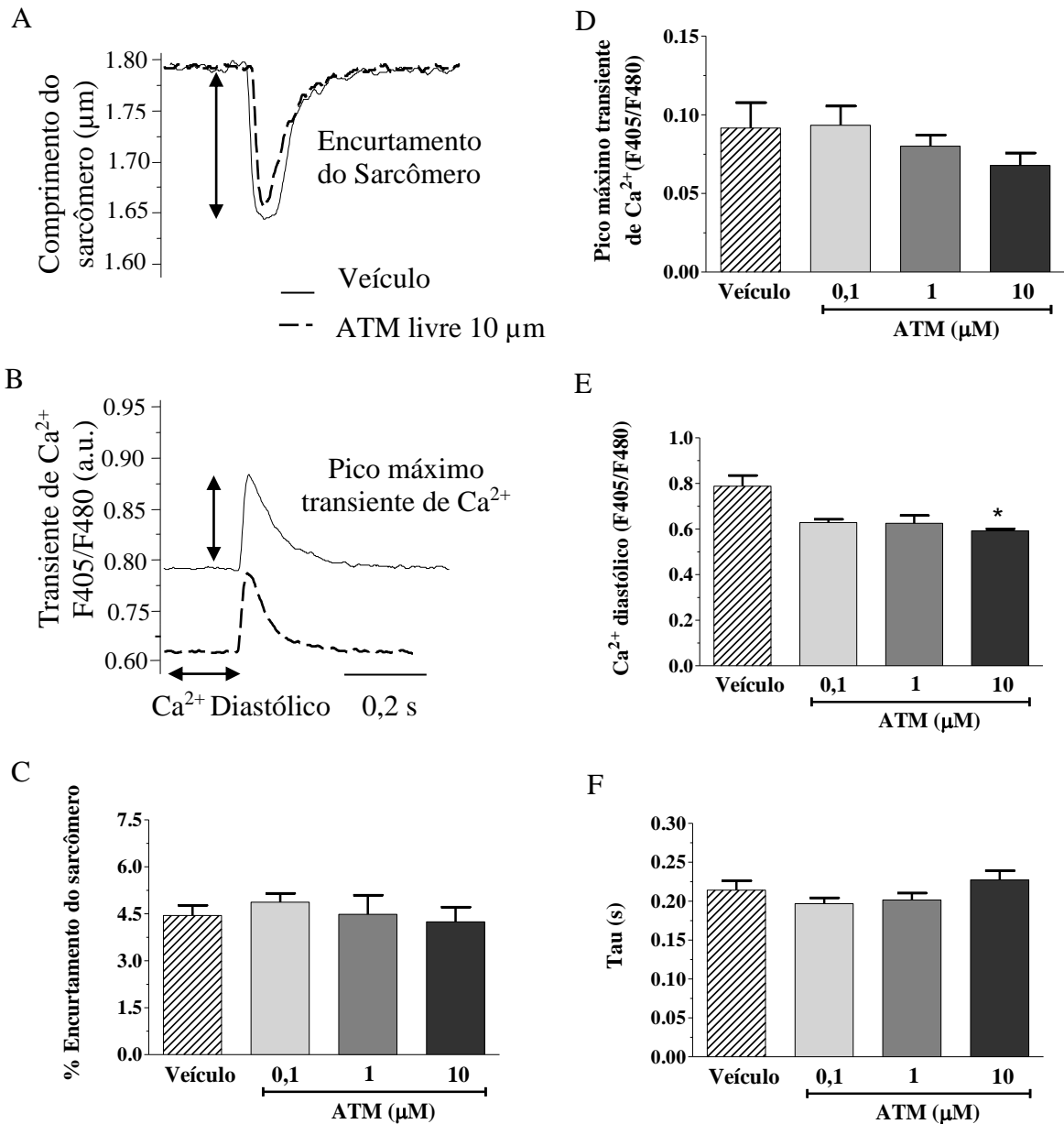


Figura 3.4: Exposição aguda dos cardiomiócitos isolados de camundongos sem tratamento ao ATM livre nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10  $\mu\text{M}$ . A-B: Registros típicos do efeito agudo do ATM (10  $\mu\text{M}$ ) no encurtamento do sarcômero (A) e no transiente  $\text{Ca}^{2+}$  (B). C-F: efeitos do ATM livre (0,1, 1,0 e 10  $\mu\text{M}$ ) sob o % de encurtamento de sarcômero (C), transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (D),  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico (E) e decaimento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -Tau (F). O transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  está expresso como a proporção de fluorescência a 405 e 480 nm. Dados expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$ , ATM livre em comparação ao veículo nas mesmas condições. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (n= 9 a 16 células por grupo).

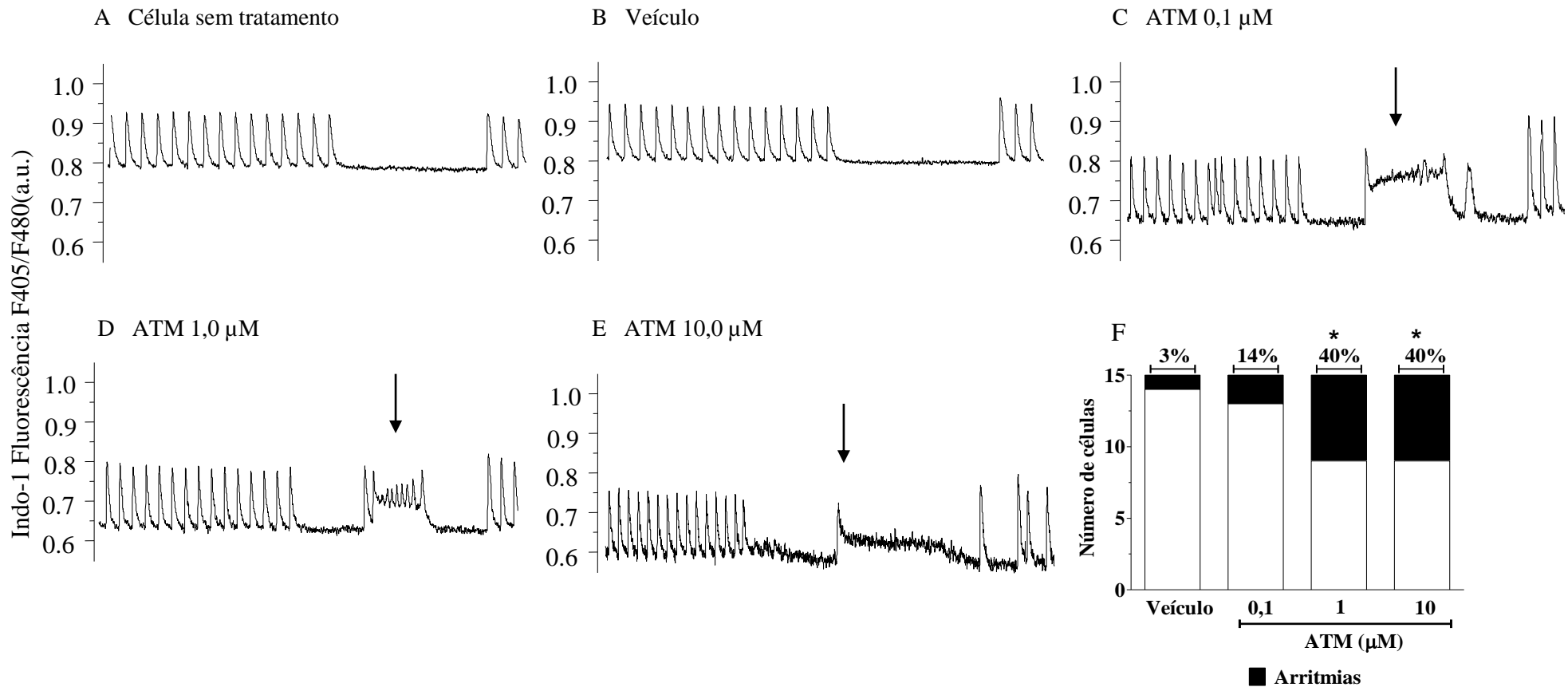


Figura 3.5: Registros representativos de ondas de  $Ca^{2+}$  durante os períodos de estimulação (1 Hz) e repouso de cardiomiócitos isolados de camundongos não tratados após exposição aguda ao ATM livre (0,1, 1,0 e 10  $\mu$ M). A-B: grupos controle. C-E: efeito das concentrações crescentes de ATM (0,1, 1,0 e 10  $\mu$ M) sobre as ondas espontâneas de  $Ca^{2+}$ . F: porcentagem de células que apresentaram pelo menos uma onda espontânea de  $Ca^{2+}$ . As setas indicam as ondas espontâneas de  $Ca^{2+}$ . \*  $P < 0,05$ , ATM em comparação ao veículo nas mesmas condições. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (n= 9-15 células por grupo).

O tratamento com ATM livre na dose de 120 mg/kg induziu efeitos cardiotoxicos nos cardiomiócitos sendo observado redução na contratilidade na contratilidade celular demonstrada pela redução no % de encurtamento do sarcômero. Também foram observadas alterações no transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  com reduções do  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico e no pico máximo do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . ATM livre reduziu significativamente o encurtamento do sarcômero (figura 3.6C) o que está associado à redução do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (figura 3.6D). O ATM livre induziu a redução significativa do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e do  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico em 41 % e 12 %, respectivamente (figura 3.6D, E). O ATM livre não causou alterações significativas no decaimento de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tau) (figura 3.6F), sugerindo que o ATM não interfere no processo de receptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático através da SERCA. Foi observado que o ATM livre induziu o surgimento de ondas espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  anormais (figura 3.7A), o que levou ao aumento significativo da ocorrência de arritmias (figura 3.7B). Por outro lado, o ATM-NC não induziu qualquer alteração da contratilidade dos cardiomiócitos (figura 3.6C) e nos parâmetros do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 3.6D-F), indicando que NC são capazes de prevenir a toxicidade do ATM nos miócitos. Além disso, não foram observadas a formação de ondas espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  anormais após o tratamento com ATM-NC (figura 3.7A, B). O efeito observado nos miócitos isolados de camundongos tratados com ATM-NC foi semelhante ao tratado com veículo ou NC-branca.



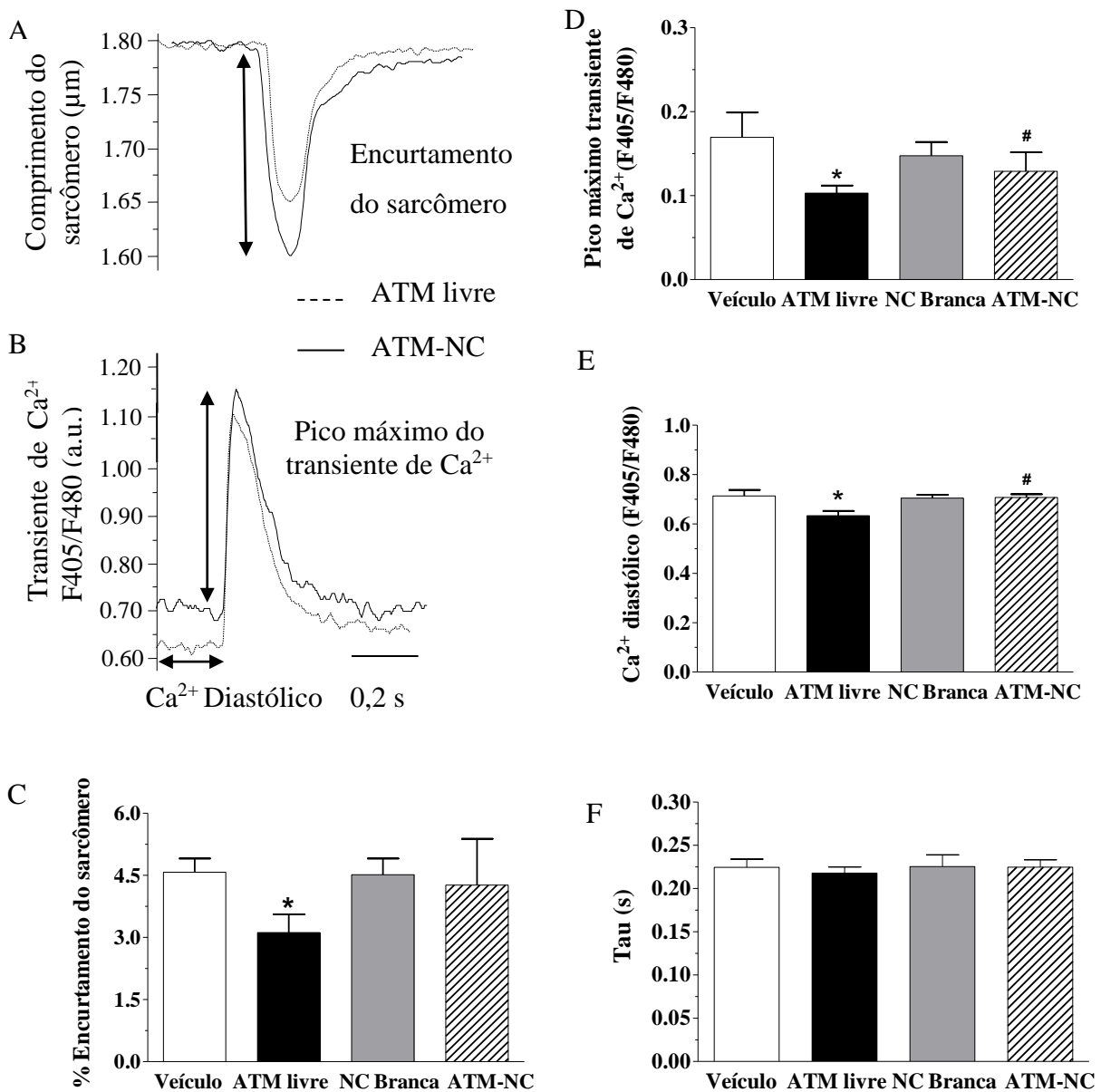


Figura 3.6: Parâmetros da contratilidade e dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos de camundongos previamente tratados com veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC, dose 120 mg/kg (média  $\pm$  EPM). A-B: Registros típicos do encurtamento de sarcômero (A) e transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (B) mensurados em cardiomiócitos isolados dos grupos tratados com ATM livre ou ATM-NC após 4 dias de tratamento. C-F: efeitos do tratamento com ATM livre, ATM-NC, veículo e NC-branca, sobre: % de encurtamento do sarcômero (C), transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (D),  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico (E) decaimento de  $\text{Ca}^{2+}$ -Tau (F). O transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  está expresso como a proporção de fluorescência a 405 e 480 nm. \*  $P < 0,05$ , ATM livre em comparação ao veículo nas mesmas condições. #  $P < 0,05$ , ATM-NC em comparação ao ATM livre nas mesmas condições. (n= 10-13 células por grupo). *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

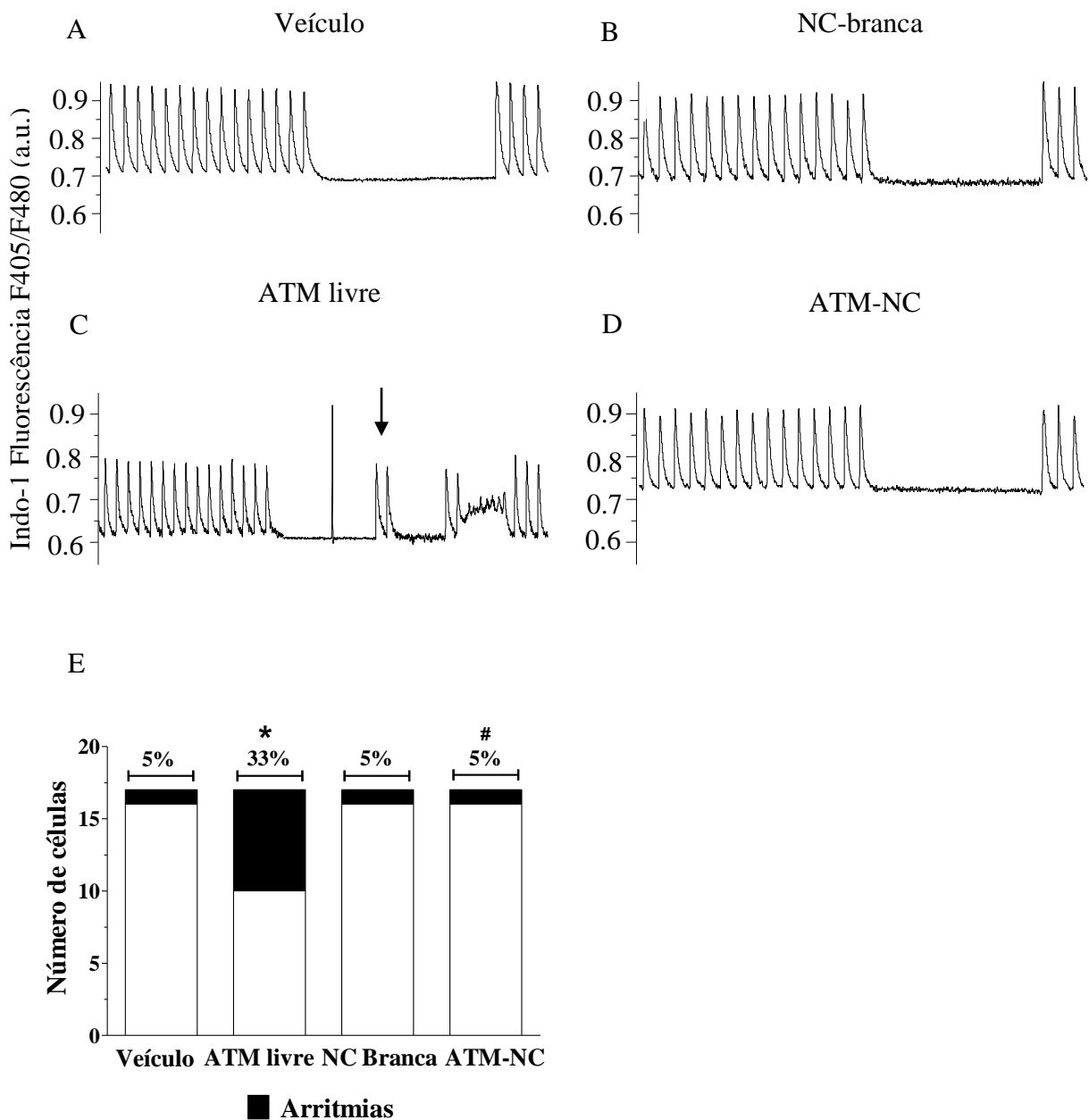


Figura 3.7: Registros representativos de ondas de Ca<sup>2+</sup> durante os períodos de estimulação (1 Hz) e repouso de cardiomiócitos isolados de camundongos tratados com veículo; NC-branca; ATM livre; ATM-NC (A-D) Os cardiomiócitos foram isolados 2 horas após a última dose. A: veículo; B: NC-branca; C: ATM livre (120 mg/kg); D: ATM-NC (120 mg/kg). E: porcentagem de células que apresentaram pelo menos uma onda espontânea de Ca<sup>2+</sup>. A seta indica ondas espontâneas de Ca<sup>2+</sup>. \* P < 0,05, ATM livre em comparação ao veículo nas mesmas condições; # P < 0,05, ATM-NC em comparação ao ATM livre nas mesmas condições. (n=10-16 células por grupo). *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

### **3.4.3 Eletrofisiologia: Potencial de ação e canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L**

Conforme descrito acima, a cardiotoxicidade de ATM livre foi associada à redução da amplitude transitória de Ca<sup>2+</sup> com subsequente redução da contração do sarcômero. Sabe-se que a dinâmica do Ca<sup>2+</sup> intracelular e a contração de cardiomiócitos são altamente influenciadas pelas propriedades de excitabilidade celular (BERS, 2002). Conforme indicado na figura 3.8A-B, em cardiomiócitos isolados de camundongos previamente tratados com ATM livre houve prolongamento da fase de repolarização do PA ( $350,0 \pm 49,3$  ms) em comparação ao veículo e a NC-branca ( $137,7 \pm 20,5$  ms e  $151,4 \pm 35,2$  ms, respectivamente). Este prolongamento do PA foi completamente ausente em cardiomiócitos isolados de camundongos tratados com ATM-NC ( $106,2 \pm 17,8$  ms), indicando que a encapsulação do ATM pode evitar as alterações no PA celular, causadas pela exposição ao ATM livre.

A amplitude do transiente Ca<sup>2+</sup> é determinada pela amplitude da corrente de Ca<sup>2+</sup> nos canais do tipo L, os quais são responsáveis por determinar a contração celular. No entanto, não foi observado alterações na densidade de corrente nos canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L após o tratamento oral com veículo, NC-branca, ATM livre, ou ATM-NC (figura 3.9). Esses dados sugerem que as alterações no Ca<sup>2+</sup> intracelular são desencadeadas por um mecanismo diferente de alterações na corrente de Ca<sup>2+</sup> de tipo L.

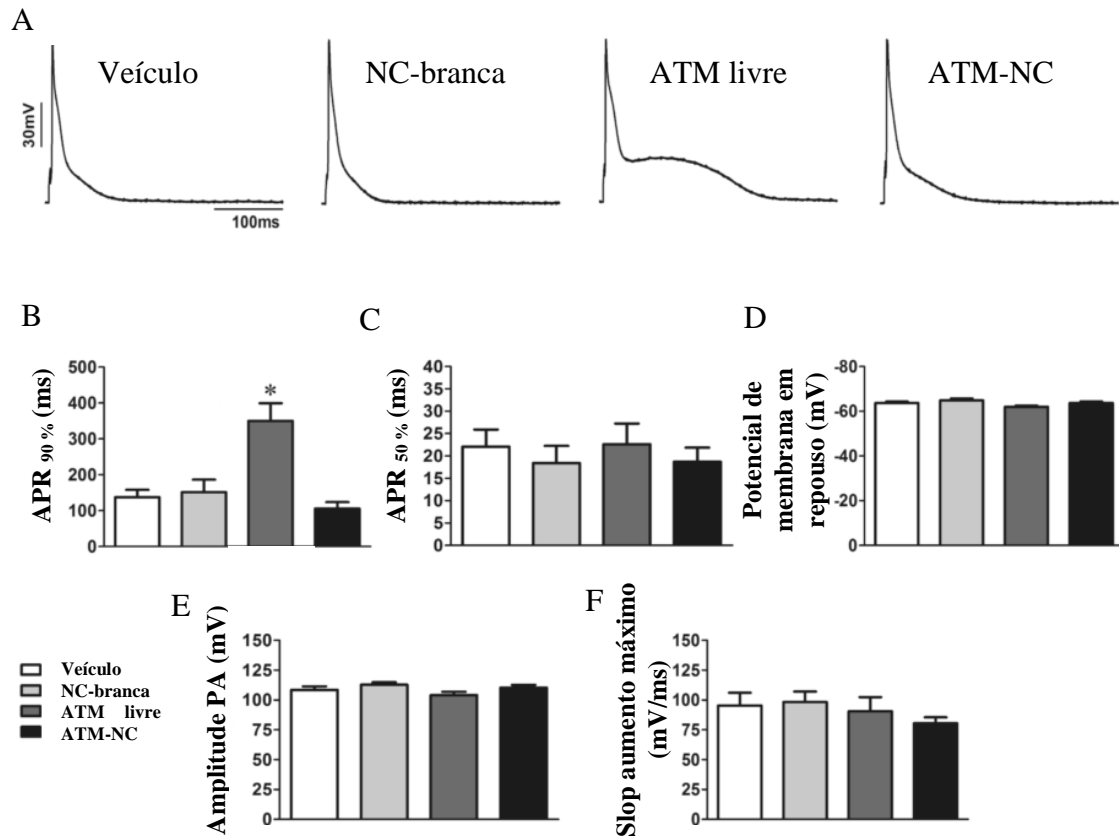


Figura 3.8: Registro do potencial de ação dos cardiomiócitos (média  $\pm$  EPM). A: Registros representativos de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo recém isolados de camundongos tratados com solução salina (n = 7), NC-branca (n = 7), ATM livre 120 mg/kg (n = 7) e ATM-NC 120 mg/kg (n = 7). B e C: Tempo necessário para alcançar respectivamente 90 % e 50 % do tempo de repolarização do potencial de ação. D: Potencial médio da membrana em repouso dos cardiomiócitos. E: Potencial de ação médio Amplitude. F: Taxa máxima de despolarização do potencial de ação. \* P < 0,05, em comparação com o veículo. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

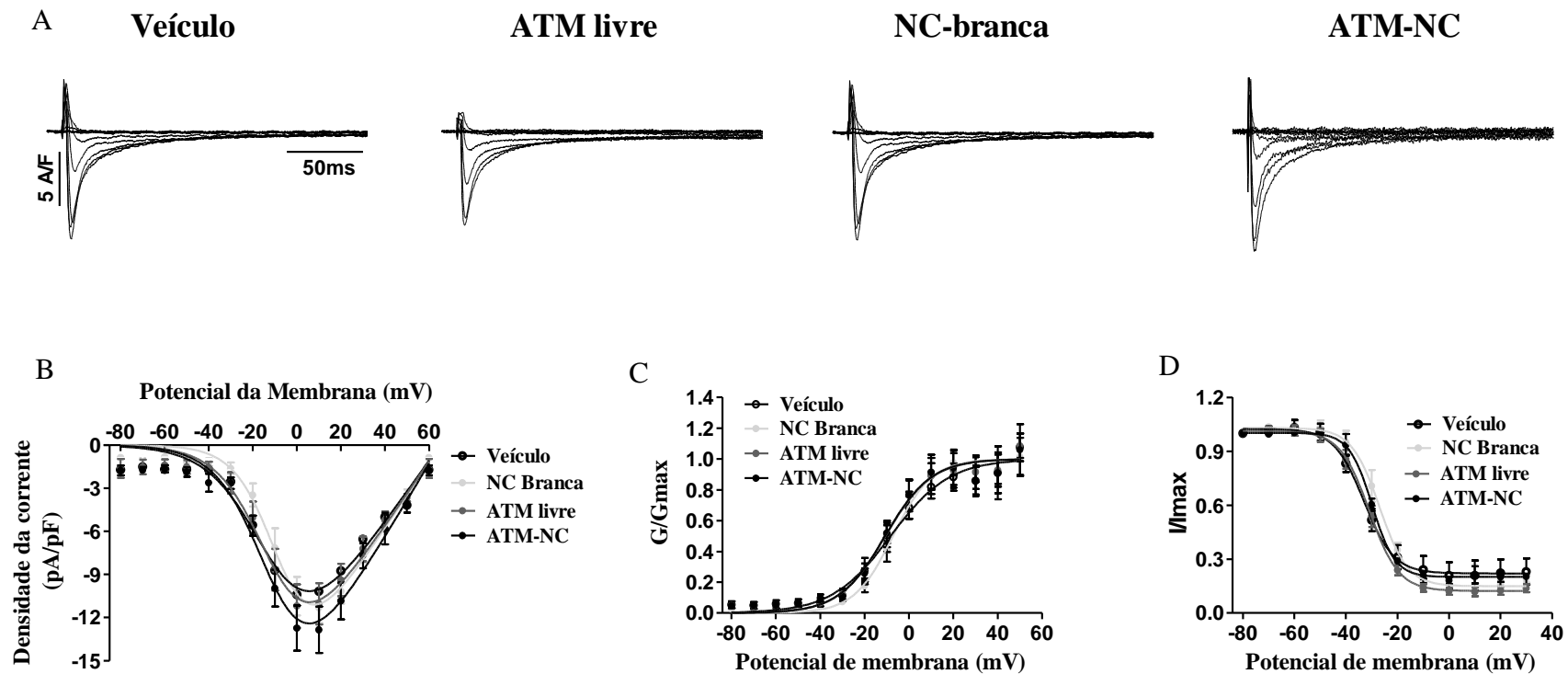


Figura 3.9: Efeitos do ATM livre e ATM-NC em canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (média  $\pm$  EPM). A: Registros representativos de cardiomiócitos de camundongos tratados com solução salina (n = 16), NC-branca (n = 15), ATM livre 120 mg/kg (n = 12) e ATM-NC 120 mg/kg (n = 10). Tensão de corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo-L (B). Curvas de ativação de estado estacionário da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L de acordo com a distribuição de Boltzmann (ver métodos) (C). D: Curvas de inativação de estado estacionário para corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L de acordo com a distribuição de Boltzmann (ver métodos). \*  $P < 0,05$ , em comparação com o veículo. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

#### **3.4.4 Ecocardiograma**

Foram avaliados os efeitos da dose mais alta (120 mg/kg) de ATM livre e ATM-NC utilizando o ECO em animais não infectados em relação ao grupo tratado com NC-branca. Os dados apresentados na tabela 3.1 mostram que houve um aumento significativo na fração da mudança de área, fração de ejeção e fração de encurtamento dos ventrículos esquerdo e direito dos grupos tratados com ATM livre e ATM-NC em relação ao grupo controle (NC-branca). O aumento destes é um preditor de melhora no quadro da função cardíaca. Para o fluxo aórtico foi observado um aumento significativo nos animais tratados com ATM livre em relação aos animais tratados com ATM-NC. O aumento do fluxo aórtico está relacionado com efeitos cardioprotetores devido à melhora no processo hemodinâmico (PINES et al., 1991). Os dados do ecocardiograma nos demonstram que após o tratamento com ATM livre e ATM-NC houve uma melhora na função cardíaca, demonstrado principalmente pelo aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, o qual é um importante marcador do funcionamento sistólico cardíaco (GOTTDIENER et al., 2004). Contudo, este resultado está em desacordo com os demais resultados deste trabalho nas diferentes metodologias empregadas, as quais indicam a ocorrência de cardiotoxicidade após o tratamento com ATM livre. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo é um importante marcador do funcionamento sistólico cardíaco. Quando os valores de fração de ejeção são inferiores a 55 % é indicativo de modificações na geometria ventricular o qual está pode estar relacionado à insuficiência cardíaca (GOTTDIENER et al., 2004).

Tabela 3.1: Parâmetros do ecocardiograma (média  $\pm$  EPM) dos camundongos tratados com ATM livre e nanocápsulas de ATM na dose de 120 mg/kg.

Parâmetros ventrículo	NC-branca	ATM livre	ATM-NC
FC (bpm)	448,0 $\pm$ 17,52	412,2 $\pm$ 16,88	447,8 $\pm$ 16,58
Fração ejeção (%) -VE <sup>&amp;</sup>	43,5 $\pm$ 4,47*	54,6 $\pm$ 5,578	54,9 $\pm$ 3,85*
Fração encurtamento (%) -VE	21,2 $\pm$ 2,57*	28,5 $\pm$ 3,77	28,5 $\pm$ 2,83*
Fração ejeção (%) -VD <sup>†</sup>	59,9 $\pm$ 5,73*	64,3 $\pm$ 23,23	65,9 $\pm$ 15,84*
Fração encurtamento (%) -VD	29,2 $\pm$ 3,76*	34,8 $\pm$ 7,39	34,7 $\pm$ 4,06*
Fração de mudança da área (%)	40,4 $\pm$ 3,12*	46,8 $\pm$ 6,19	47,5 $\pm$ 3,49*
Fluxo aórtico	47,8 $\pm$ 5,94	49,1 $\pm$ 2,67	40,4 $\pm$ 2,19 <sup>#</sup>

<sup>&</sup> VE: ventrículo esquerdo; VD<sup>†</sup>: ventrículo direito. \*P<0,05 comparado a NC-branca; <sup>#</sup>P<0,05 comparado ao ATM livre. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey (n=5-6).

### 3.4.5 Eletrocardiograma

As figuras 3.10 e 3.11 mostram valores absolutos para os intervalos PR e QRS do ECG para camundongos não infectados e infectados. O tratamento de camundongos não infectados com ATM livre ou ATM-NC não aumentou os intervalos PR (figura 3.10A, B, C) e QRS (figura 3.11A, B, C) quando comparados aos grupos veículo ou NC-branca. Para os camundongos infectados com *P. berghei*, o intervalo PR apresentou aumento significativo de 74 %, 24 horas após o tratamento com ATM livre 120 mg/kg, quando comparado ao grupo veículo (figura 3.10F). Nos camundongos infectados o ATM livre induziu o prolongamento do complexo QRS, enquanto ATM-NC não causou alterações deste parâmetro (figura 3.11D-F). Surpreendente, em camundongos infectados e tratados com veículo o complexo QRS foi significativamente maior que dos camundongos não infectados e submetidos ao mesmo tratamento (figura 3.11), nos tempos de 6 (20 %) e 24 (15 %) horas pós-tratamento. Este efeito mostra a influência da malária, causada por *P. berghei*, em desencadear distúrbios cardíacos eletrofisiológicos.

A análise do intervalo QT de camundongos não infectados (figura 3.12A, B, C) mostrou aumentos significativos às 2, 6 e 24 horas após a última dose de ATM livre, respectivamente, 16 %, 26 % e 22 % para 40 mg/kg; 28 %, 51 % e 48 % para 80 mg/kg; 26 %, 55 % e 55 % para 120 mg/kg. Resultados semelhantes foram obtidos para o intervalo QTc (figura 3.13A, B, C) com aumento significativo às 6 e 24 horas após a última dose de ATM livre, uma vez que o prolongamento foi, respectivamente, 31 % e 28 % para 40 mg/kg; 32 % e 35 % para 80 mg/kg; 35 % e 41 % para 120 mg/kg. Não houve diferença significativa para o intervalo QTc no tempo de 2 horas após a última dose.

ATM-NC não causou aumentos significativos nos intervalos QT e QTc de camundongos não infectados (figura 3.12A-C; 4.12A-C). Embora tenha sido observada bradicardia para ambos, ATM livre e ATM-NC, após o tratamento com 80 e 120 mg/kg, contudo não houve diferença significativa. Para camundongos não infectados tratados com NC-branca, FC foi aproximadamente  $303 \pm 25,3$ ;  $287 \pm 34,9$  e  $232 \pm 11,8$ ; para ATM livre, FC foi de  $264 \pm 35,7$ ;  $252 \pm 31,5$  e  $289 \pm 42,3$ ; para ATM-NC, FC foi de  $260 \pm 19,5$ ;  $333 \pm 40,1$  e  $301 \pm 29,8$ , respectivamente, às 2, 6 e 24 horas após o tratamento com a dose de 120 mg/kg.

Para os camundongos infectados e tratados com ATM livre nas doses de 80 e 120 mg/kg, os intervalos QT e QTc aumentaram significativamente (figura 3.12E, F; 3.13E, F). O prolongamento do intervalo QT após 80 mg/kg de ATM livre foi de 13 % após 6 horas e 25 % após 24 horas (figura 3.12E), enquanto o aumento de QTc (figura 3.13E) foi de 16 % e 29 %, respectivamente, 6 e 24 horas após a última dose de tratamento. O prolongamento do intervalo QT (figura 3.12F) após o tratamento com 120 mg/kg de ATM livre foi de 41 % e 53 %, enquanto o QTc (figura 3.13F) aumentou 20 % e 31 %, respectivamente, após 6 e 24 horas. A dose de 40 mg/kg de ATM livre não causou alterações significativas em qualquer parâmetro de ECG dos camundongos infectados (figura 3.10D; 3.11D; 3.12D; 3.13D). Ainda para estes animais, o tratamento com ATM-NC em todas as doses avaliadas não induziu alterações significativas em nenhum dos parâmetros do ECG, mostrando claramente a capacidade das NC em eliminar a toxicidade causada pelo ATM.



A figura 3.14 mostra segmentos representativos do ECG de camundongos não infectados e infectados tratados com NC-branca, ATM livre ou ATM-NC na dose de 120 mg/kg

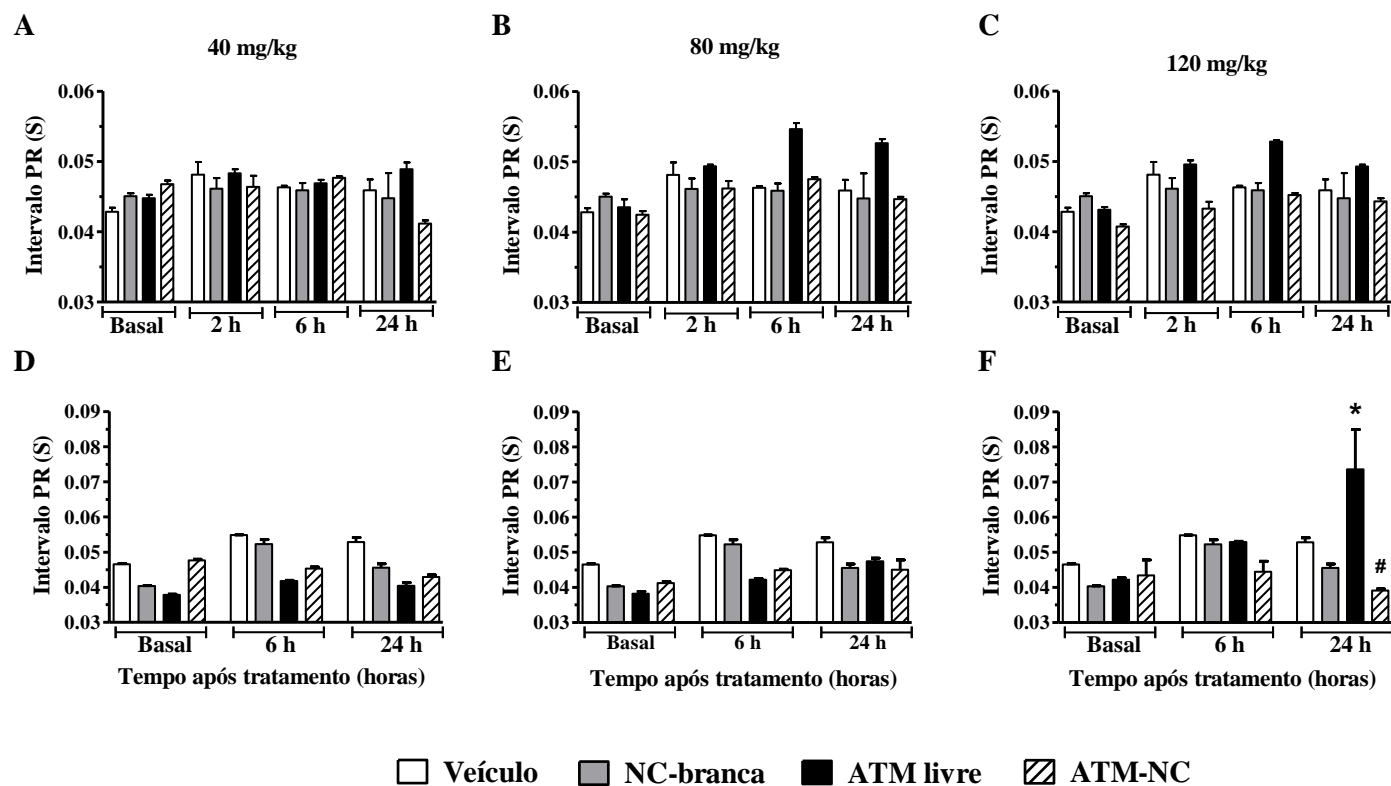


Figura 3.10: Intervalo PR (média ± EPM) do ECG de camundongos não infectados e infectados com *P. berghei*. Efeitos do ATM sobre o intervalo PR do ECG nos tempos de 2, 6 e 24 horas para animais não infectados e tempos de 6 e 24 horas para animais infectados após a última dose do tratamento com ATM livre, ATM-NC, ambos nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, ou NC-branca e veículo (controles). A, B e C: Camundongos não infectados. D, E, F: camundongos infectados. \* $P < 0,05$  em relação aos controles, # $P < 0,05$  em relação ao ATM livre. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (n = 6).

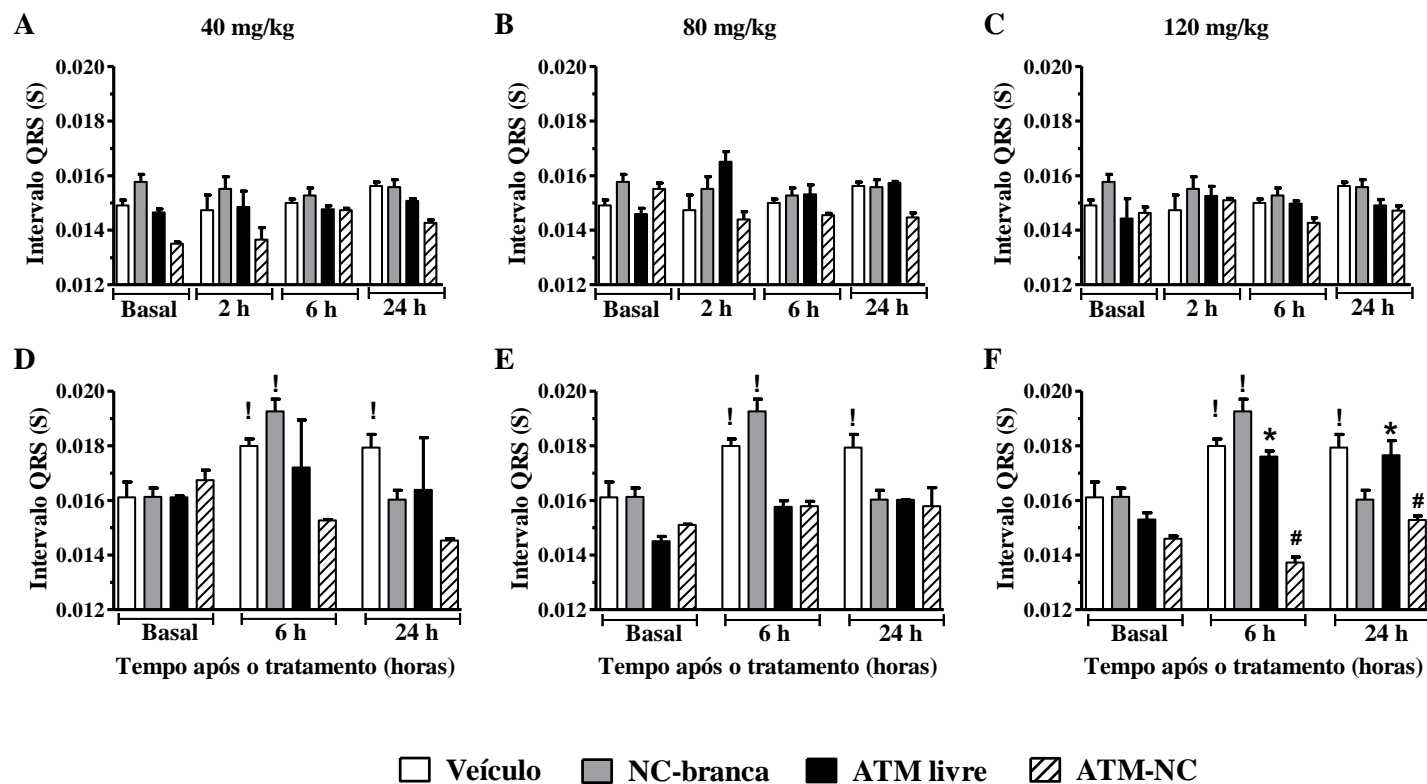


Figura 3.11: Intervalo QRS (média  $\pm$  EPM) do ECG de camundongos não infectados e infectados com *P. berghei*. Efeitos do ATM sobre o intervalo QRS do ECG nos tempos de 2, 6 e 24 horas para animais não infectados e tempos de 6 e 24 horas para animais infectados após a última dose do tratamento com ATM livre, ATM-NC, ambos nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, ou NC-branca e veículo (controles). A, B e C: Camundongos não infectados. D, E, F: camundongos infectados. \* $P < 0,05$  em relação aos controles, # $P < 0,05$  em relação ao ATM livre. ! $P < 0,05$  em relação ao tempo basal do mesmo grupo. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (n = 6).

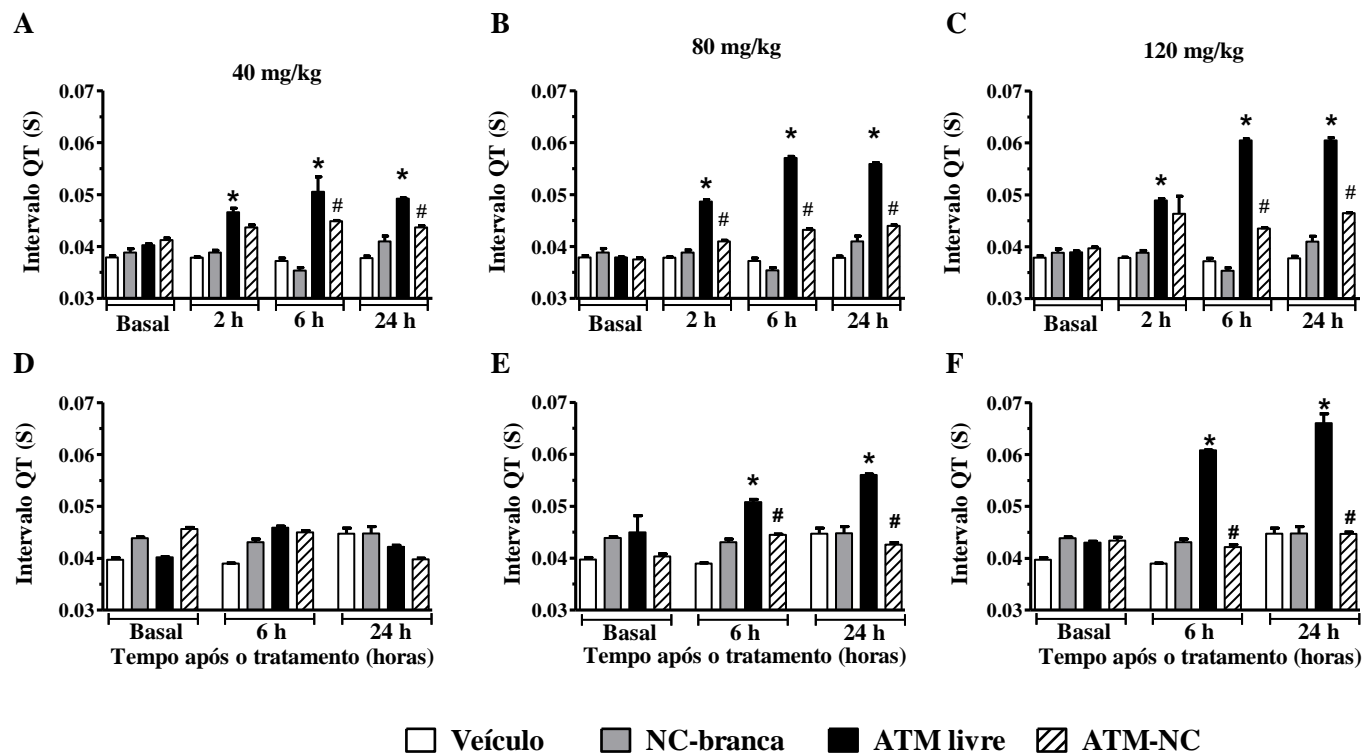


Figura 3.12: Intervalos QT (média ± EPM) do ECG de camundongos não infectados e infectados com *P. berghei*. Efeitos do ATM sobre o intervalo QRS do ECG nos tempos de 2, 6 e 24 horas para animais não infectados e tempos de 6 e 24 horas para animais infectados após a última dose do tratamento com ATM livre, ATM-NC, ambos nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, ou NC-branca e veículo (controles). A, B e C: Camundongos não infectados. D, E, F: camundongos infectados. \*P < 0,05 em relação aos controles, #P < 0,05 em relação ao ATM livre. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (n = 6)

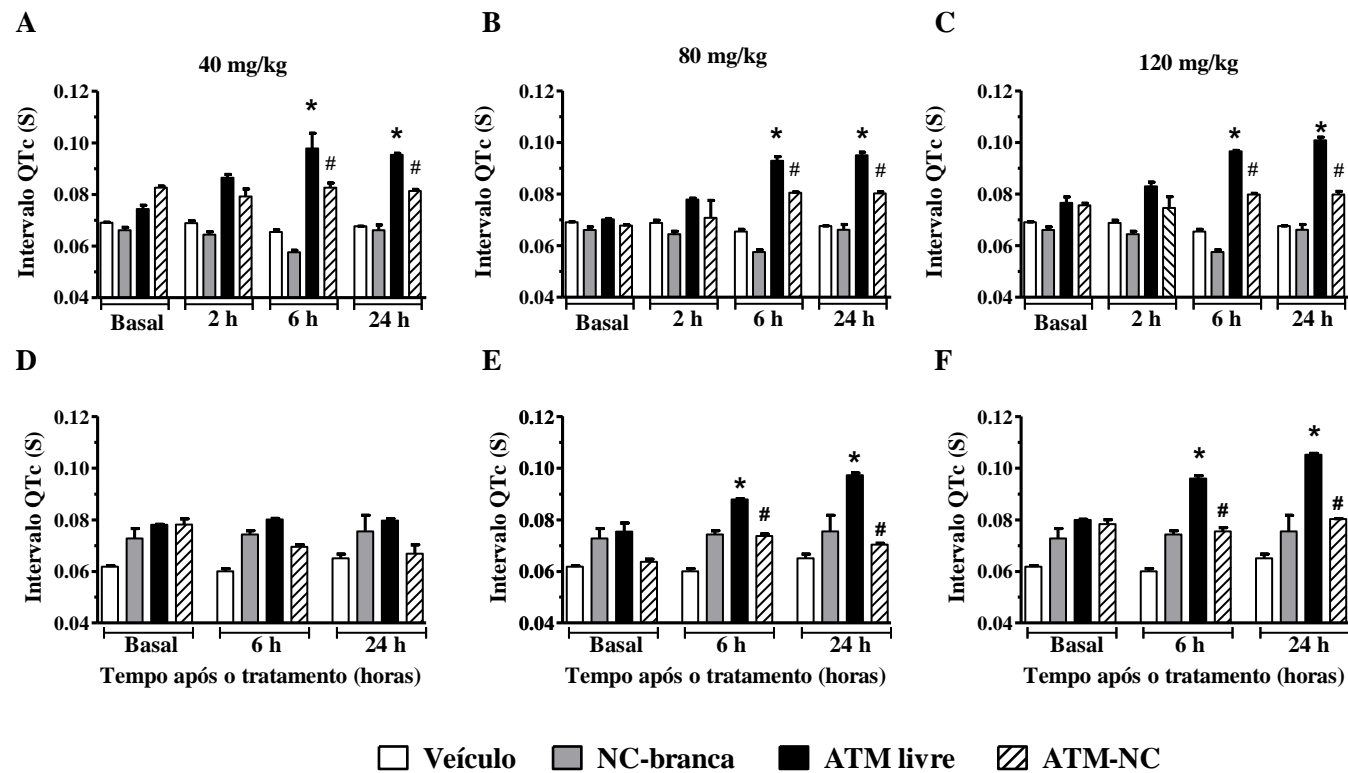


Figura 3.13: Intervalos QTc (média  $\pm$  EPM) do ECG de camundongos não infectados e infectados com *P. berghei*. Efeitos do ATM sobre o intervalo QRS do ECG nos tempos de 2, 6 e 24 horas para animais não infectados e tempos de 6 e 24 horas para animais infectados após a última dose do tratamento com ATM livre, ATM-NC, ambos nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, ou NC-branca e veículo (controles). A, B e C: Camundongos não infectados. D, E, F: camundongos infectados. \*  $P < 0,05$  em relação aos controles, #  $P < 0,05$  em relação ao ATM livre. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (n = 6).

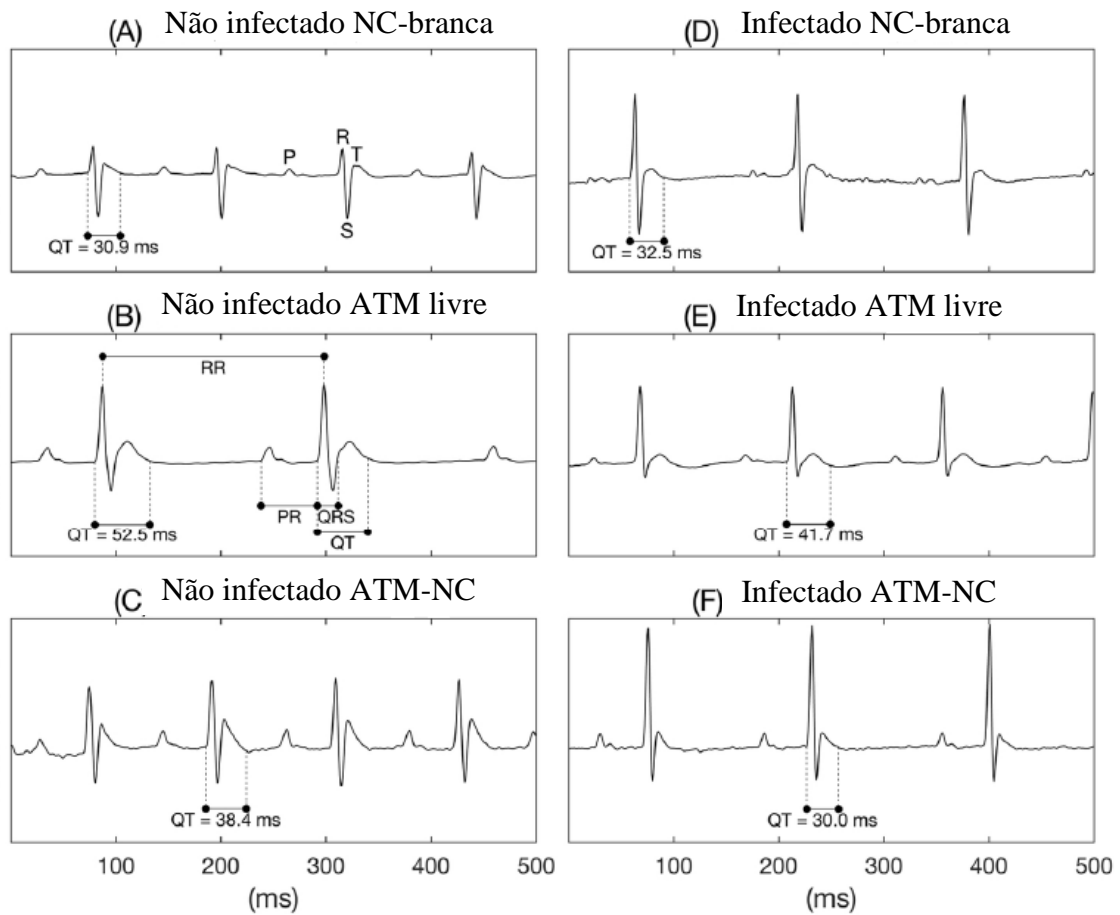


Figura 3.14: Registros ECG representativos de camundongos não infectados (A, B e C) e infectados com *P. Berghei* (D, E e F). Registros de ECG mostrando os efeitos do tratamento com NC-branca (A e D), ATM livre (B e E), e ATM-NC (C e F), todos referente ao efeito da dose de 120 mg/kg sobre o intervalo QT de camundongos não infectados (A, B, C) e camundongos infectados (D, E, F). Em (A) está demonstrado as ondas P, R, S e T, enquanto (B) demonstra os intervalos RR, PR, QRS e QT.

Para a análise cardiovascular foi utilizado, como modelo animal, camundongos machos c57BL6. De acordo com uma extensa revisão (PATTEN, 2007), as fêmeas são menos sensíveis às alterações cardiovasculares, uma vez que os hormônios ovarianos podem ser importantes na redução do risco de doença vascular. A partir de diferentes métodos foi avaliada a cardiotoxicidade causada pelo ATM livre e a ação das NC em prevenir tal efeito. Em geral, os medicamentos antimaláricos são potencialmente cardiotóxicos, como cloroquina, halofantrino, lumefantrina e mefloquina. As principais alterações cardiotóxicas causadas por esses agentes são bloqueio nos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L e nos canais de  $\text{K}^+$  do tipo  $\text{IK}_r$  e  $\text{IK}_s$  (ver WHITE, 2007). Neste trabalho, foi demonstrado que a administração de repetidas doses de ATM livre pode promover efeito cardiotóxico devido à redução da contratilidade e dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e prolongamento do potencial de ação dos cardiomiócitos. Contudo, nenhuma alteração sobre os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L foi observada.

A alteração dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foi demonstrada em vários tipos de processos patológicos, incluindo insuficiência cardíaca (DEL MONTE et al., 2004). O  $\text{Ca}^{2+}$  é um mensageiro que possui inúmeras atividades, sendo essencial no processo de acoplamento excitação-contração em cardiomiócitos e está envolvido na gênese de diferentes tipos de arritmias (DEL MONTE et al., 2004; PASQUIÉ; RICHARD, 2009). PASQUIÉ e RICHARD (2009) sugeriram que arritmias iniciadas por processos dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  devem ser considerados para a avaliação da segurança de medicamentos ao longo de seu estudo pré-clínico. As modificações dos mecanismos de regulação da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , em cardiomiócitos por agentes farmacológicos são susceptíveis à indução de arritmias e em longo prazo podem desenvolver uma cardiomiopatia, tornando-se um substrato pró-arritmogênico. A insuficiência cardíaca, por exemplo, é decorrente de inúmeras alterações biológicas que resultam em redução tanto dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  quanto na contratilidade celular (MANN, 1999).

Existem diferentes teorias sobre o mecanismo de ação antimalárico do ATM. Um deles propõe que a ação antiparasitária do ATM está envolvida na inibição do gene PfATP6, gene este ortólogo aos dos mamíferos e responsável pela expressão da SERCA. O ATM ao inibir a expressão da SERCA do parasita desregula seus níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003). Em estudos realizados por ANDERSSON et al., (2009) e BODE et al., (2011) mostraram que a insuficiência cardíaca pode estar relacionada com a redução da função da SERCA podendo levar a

disfunção contrátil do miocárdio e morte. No entanto, em nosso trabalho, foi demonstrado que o ATM livre não induziu alterações significativas no decaimento de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tau), demonstrando que o ATM livre não causa influência sobre o funcionamento da SERCA de cardiomiócitos de camundongos C57BL6. Nossos resultados estão em acordo com os estudos de TOOVEY et al., (2008) que demonstraram que ATM livre nas concentrações de 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  não foi capaz de inibir a SERCA nos cardiomiócitos de mamífero.

A cardiotoxicidade desenvolvida pelo ATM livre é semelhante a algumas das alterações causadas pela doxorrubicina nos cardiomiócitos (GE et al., 2016). A cardiotoxicidade causada pela doxorrubicina pode gerar insuficiência cardíaca por diferentes mecanismos (CARVALHO et al., 2013). A doxorrubicina é um fármaco empregado na terapia do câncer e seu mecanismo de ação anticancerígeno inclui a geração de espécies ROS, causando danos no DNA e/ou à peroxidação lipídica. Este mecanismo está diretamente relacionado ao efeito cardiotóxico deste fármaco. Assim como a doxorrubicina, o ATM também tem demonstrado ser eficaz no tratamento do câncer (ver DAS, 2015). ALCÂNTARA et al., (2013) sugerem que a ação anticancerígena do ATM pode estar relacionada com a formação de ROS. Além disso, outra proposta de mecanismo de ação antimalárica do ATM é devido a formação de ROS, os quais são tóxicos ao parasita (MESHNICK et al., 1991). O aumento das espécies reativas de oxigênio está relacionado com efeitos pró-arrítmico cardíaco e também pode promover o remodelamento estrutural e eletrofisiológico, levando a anormalidades no PA (WICKENDEN et al., 1998; TSE et al., 2016).

Nossos resultados demonstram que em cardiomiócitos de camundongos tratados com ATM livre na dose de 120 mg/kg houve o desenvolvimento de arritmias e o prolongamento do PA. O prolongamento do potencial de ação é um achado substancial na insuficiência cardíaca humana e em modelos animais (WICKENDEN et al., 1998) e podem estar envolvidos com diferentes mecanismos, como mudanças no transiente de potássio (SANGUINETTI; TRISTANI-FIROUZI, 2006) e no transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (SPENCER et al., 2014). Estudos demonstraram que a artemisinina causa o bloqueio dos canais de  $\text{K}^+$  ( $\text{IK}_r$  e  $\text{IK}_s$ ) em cardiomiócitos de cobaias (YANG; LUO; BAO, 1998) e tem efeito anticolinérgico através da inibição dos canais  $\text{IKACH}$  (HARA et al., 2007). Essas alterações estão diretamente relacionadas ao prolongamento do intervalo QT e à insuficiência cardíaca



O prolongamento do intervalo QT é uma alteração importante do ECG e um indicativo da toxicidade do medicamento (DARPO; NEBOUT; SAGER, 2006), podendo levar a morte (DAY; MCCOMB; CAMPBELL, 1990; REDFERN et al., 2003). Os resultados mostraram um prolongamento relevante dos intervalos QT e QTc de ECG às 6 e 24 horas após a administração oral de oito doses de ATM livre (40, 80 e 120 mg/kg) para animais não infectados e infectados com *P. berghei*. Em acordo com nossos resultados, trabalhos prévios demonstraram que o ATM e outros derivados da artemisinina são capazes de causar o prolongamento do intervalo QT após sua administração oral e parenteral (BREWER et al., 1994; CLASSEN et al., 1999; YIN et al., 2014).

Somente para os camundongos infectados foi observado prolongamento do intervalo PR 24 horas após o tratamento na dose de 120 mg/kg de ATM livre, mas esta alteração não ocorreu após o tratamento com ATM-NC. O prolongamento do intervalo PR refere-se a alterações atriais, com um possível surgimento de insuficiência cardíaca e fibrilação atrial (HOLMQVIST et al., 2015). Uma vez que camundongos infectados tratados com veículo e camundongos não infectados tratados com ATM livre não apresentaram alteração do intervalo PR, podemos inferir que a combinação de efeitos da malária e toxicidade ATM pode induzir esse distúrbio cardíaco.

O ATM-NC foi capaz de prevenir o prolongamento do intervalo QT observado com ATM livre em camundongos não infectados e infectados, impedindo o desenvolvimento de cardiotoxicidade em até 24 horas após a última administração oral. Não houve alteração significativa da FC e do complexo QRS após a administração de ATM livre ou ATM-NC em camundongos não infectados e infectados, o que indica que não há alterações na despolarização ventricular. Assim como também não foram observadas alterações sobre os parâmetros do ECO. No entanto, a própria infecção aumentou o QRS, indicando disfunção cardíaca (QUINTANILLA et al., 2017), um efeito ainda não relatado para a malária.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que ATM é um fármaco cardiotoxíco, o que ainda não era bem determinado já que os efeitos cardiotoxícos eram coincidentes com efeitos neurotóxicos (BREWER et al., 1994). No entanto, não foi possível definir o exato mecanismo cardiotoxíco.

O achado mais valioso neste trabalho foi a importância do uso das NC para prevenir efeitos cardiotoxicos causados pelo ATM, impedindo o surgimento de alterações no processo de acoplamento excitação-contração e dos parâmetros do ECG. Nenhum trabalho anterior relatou redução da cardiotoxicidade por associação do ATM a nanocarreadores administrados por via oral, como observamos aqui.

Outros estudos também demonstraram a importância do uso de nanocápsulas na prevenção de efeitos cardiotoxicos. BRANQUINHO et al., (2017a), demonstraram o potencial das NC em impedir alterações nos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular e o desenvolvimento de arritmias. LEITE et al. (2007) também mostraram a importância do uso da NC em prevenir efeitos cardiotoxicos a partir da redução do prolongamento do intervalo QT causado por um antimalárico.

# CAPÍTULO 4

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NEUROCOMPORTAMENTAL DO ARTEMÉTER

### 4.1 Introdução

Como demonstrado anteriormente o ATM é responsável por causar inúmeros efeitos adversos, dentre eles a neurotoxicidade. Os efeitos neurotóxicos causados pelo ATM incluem danos no núcleo vestibular (BREWER et al., 1994; CLASSEN et al., 1999) e no núcleo trapezoidal (AKINLOLU; SHOKUNBI, 2010); hemorragia cerebral (BECKMAN; YOURENEFF; BUTT, 2013) degeneração e necrose neuronal (YIN et al., 2014). O mecanismo de ação neurotóxica do ATM ainda não está completamente elucidado, mas em estudos *in vitro* realizados por FISHWICK et al., (1995) propõem que a neurotoxicidade seja decorrente da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas a partir de uma reação do tipo Fenton entre o ATM e o grupamento heme da hemoglobina nos eritrócitos, necessária para sua ação antimalárica. Adicionalmente, o ATM é um fármaco altamente lipofílico possuindo coeficiente de partição (log P) (octanol/água) igual a 3.53, (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2017) característica esta que facilita que o mesmo atravesse a barreira hematoencefálica possibilitando a ocorrência dos efeitos neurotóxicos (LI; HICKMAN, 2011).

Para a formulação ATM-NC é também importante avaliar o potencial destes nanocarreadores em reduzir a neurotoxicidade causada pelo ATM livre após sua administração por via oral. Deste modo, foram utilizados métodos de avaliação neurocomportamental de camundongos C57BL6 submetidos ao tratamento oral por 4 dias com veículo, NC-branca, ATM livre ou ATM-NC (40, 80 e 120 mg/kg).

## **4.2 Objetivo específico**

Avaliar a toxicidade neurocomportamental *in vivo* do arteméter livre ou veiculado em nanocápsulas

## **4.3 Metodologia**

Para avaliação neurocomportamental foram utilizados camundongos machos C57BL6 não infectados e infectados com *P. berghei*, tratados como descrito no item 1.3.3. Antes de receberem qualquer tipo de tratamento oral (tempo basal) e nos tempos de 6 e 24 horas após a última administração oral os camundongos foram submetidos aos testes descritos abaixo (figura 5.1). A escolha destes tempos partiu dos resultados encontrados nas análises de cardiotoxicidade, onde as principais respostas ocorreram em 6 e 24 horas após a última administração oral do ATM livre.

Antes dos experimentos serem realizados os camundongos foram colocados em ambiente fechado, desprovido de barulho externo, com temperatura constante ( $22 \pm 2$  °C) de modo a se adaptarem ao ambiente. Após cada bateria de testes os aparelhos foram higienizados com álcool 70 % a fim de eliminar odores e resíduos dos animais.

Os testes neurocomportamentais utilizadas neste trabalho são considerados métodos de triagem, sendo necessários maiores estudos para determinação dos efeitos neurotóxicos do ATM livre e ATM-NC.

### **4.3.1 Labirinto de cruz elevado**

Este método foi desenvolvido por HANDLEY e MITHANI, (1984) e validado por PELLOW et al., (1985) com objetivo de avaliar a ansiedade dos animais a partir do conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão que apresentam a altura e espaços abertos. O aparato (Insight Equipamentos Científicos, Brasil) consiste em quatro braços elevados a 40 cm do chão, sendo dois braços abertos e dois fechados por paredes laterais. Os camundongos foram submetidos a cinco minutos de experimentação, foram contados os bolos fecais e avaliado o número de entradas nos braços abertos e fechados, sendo considerada a entrada em um dos braços como a retirada das quatro patas do centro da cruz. O total de entradas nos braços abertos

representam indicadores de ansiedade e o total de entradas nos braços fechados é empregado como índice de atividade locomotora (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012) (figura 5.1A).

#### **4.3.2 Campo aberto (Open Field)**

O teste do campo aberto foi realizado em uma arena circular de acrílico 100x80 cm, sendo o assoalho demarcado por 12 campos (Insight Equipamentos Científicos, Brasil) que permite a quantificação da atividade locomotora do animal. Esta arena é cercada por paredes de acrílico de 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura de forma que o animal não possa sair (figura 5.1B). Este método foi previamente descrito por (HALL, 1934) para avaliar o estado emocional dos animais a partir de sua atividade motora no campo e defecação. Um animal por vez foi colocado neste aparato, partindo sempre de um dos quadrados próximo a parede. O animal foi submetido a 2 minutos de ambientação e, posteriormente, seu comportamento foi avaliado por 5 minutos. Os parâmetros observados foram: número de campos percorridos; o número de vezes que o animal se levantou apoiando-se nas patas traseiras (*rearing*), número de comportamento de auto-limpeza (*grooming*), contagem de bolos fecais.

#### **4.3.3 Haste Girante (Rota Road)**

O método da haste girante foi previamente descrito por DUNHAM e MIYA, (1957) com objetivo de avaliar a coordenação motora e equilíbrio dos animais. Os camundongos foram colocados com as quatro patas sobre o aparato (Insight Equipamentos Científicos) o qual é constituído por uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm da base do equipamento (figura 5.1C). Os animais foram avaliados por um período de 2 minutos, registrando o tempo de permanência na haste girante com rotação de 12 rpm e o número de quedas.

#### **4.3.4 Barra de Tração**

O método de tração foi realizado com objetivo de avaliar o tônus muscular dos camundongos e foi desenvolvido de acordo com a metodologia previamente descrita por RUDZIK et al. (1973). Foi avaliada a capacidade dos camundongos se manterem

seguros pelas patas dianteiras e/ou traseiras em um fio metálico suspenso a 30 cm de altura durante 5 segundos (figura 5.1D). Cada um dos camundongos realizou três vezes este teste com intervalo de quinze segundos entre elas. No dia anterior a experimentação os animais foram treinados no equipamento seguindo o mesmo protocolo

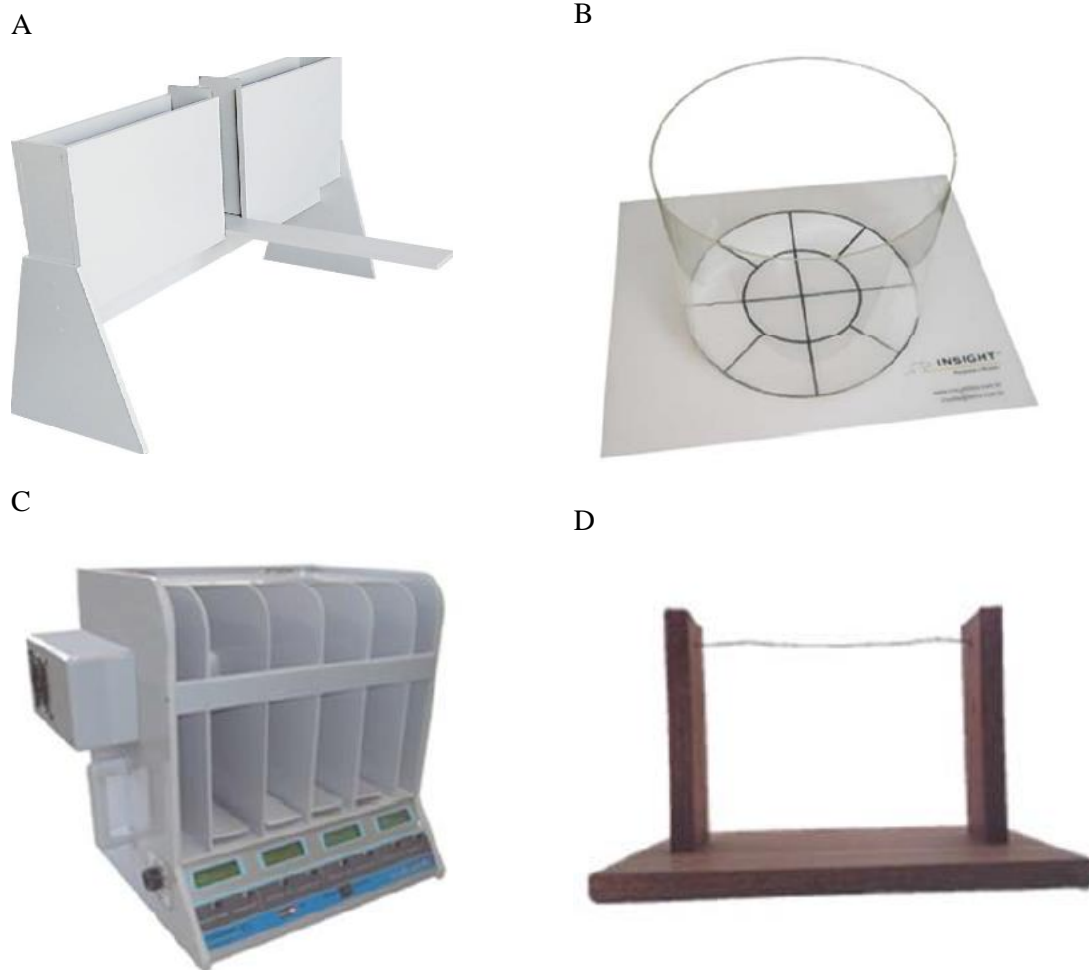


Figura 4.1: Aparatos utilizados para avaliação neurocomportamental; campo aberto (A), labirinto de cruz elevado (B), haste girante (C), tração (D).

## 4.4 Resultados e Discussão

Os testes neurocomportamentais foram realizados tanto em camundongos não infectados quanto em camundongos infectados com *P. berghei*, nos tempos de basal, 6 e 24 horas após o término tratamento.

### 4.4.1 Labirinto em cruz elevado

Para o teste no labirinto em cruz elevado realizado com animais não infectados foi possível observar redução significativa nas visitas aos braços abertos do labirinto após a administração oral de ATM livre na dose de 120 mg/kg. Esta redução foi de 60 % e 74 % em relação ao grupo tratado com veículo, respectivamente, nos tempos de 6 e 24 horas (figura 5.2 C). As doses de 40 e 80 mg/kg de ATM livre causaram acentuada redução no número de entradas nos braços abertos (figura 5.2A, B), apesar de não significativamente. Por outro lado, o tratamento com ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg não alterou o comportamento dos camundongos quando comparado ao grupo que recebeu NC-branca ou veículo (figura 5.2 A-F). Nenhuma alteração foi observada no número de entradas nos braços fechados.

Ao avaliarmos o comportamento dos camundongos infectados foi possível observar redução significativa no número de entradas nos braços abertos em relação ao tempo basal para todos os grupos e doses estudadas, veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC (40, 80 e 120 mg/kg) (figura 5.3). Indicando que a infecção por *P. berghei* é capaz de alterar o comportamento do camundongo, como demonstrado previamente (DE MIRANDA et al., 2011). Já em relação à capacidade de explorar os braços fechados ocorreu redução significativa no número de entradas para camundongos tratados com ATM livre e ATM-NC em relação ao tempo basal, o que não ocorreu para os animais tratados com o veículo e NC-branca, indicando que o ATM em associação a infecção pode agravar os danos causados pela malária no SNC.

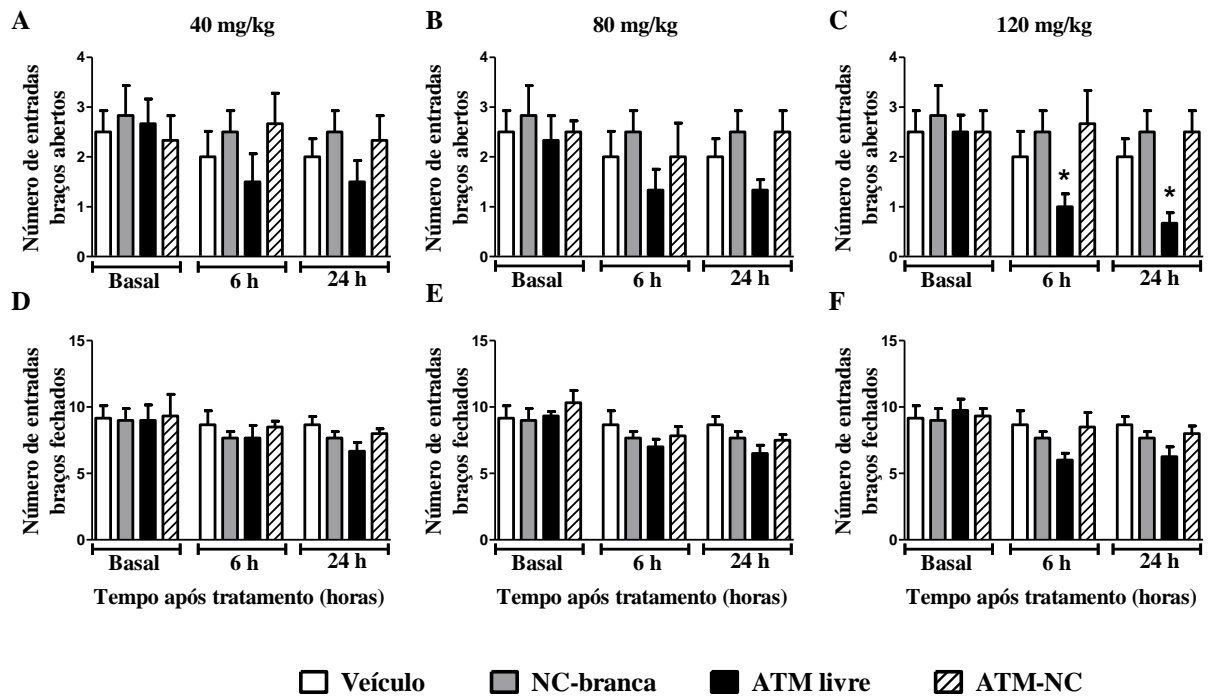


Figura 4.2: Avaliação da ansiedade e da atividade locomotora determinadas no labirinto em cruz elevado para camundongos não infectados (média  $\pm$  EPM). Número de entradas nos braços abertos (A, B, C) e fechados (D, E, F) após o tratamento com veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC nas doses de 40 mg/kg (A, D), 80 mg/kg (B, E) e 120 mg/kg (C, F) (n = 8).



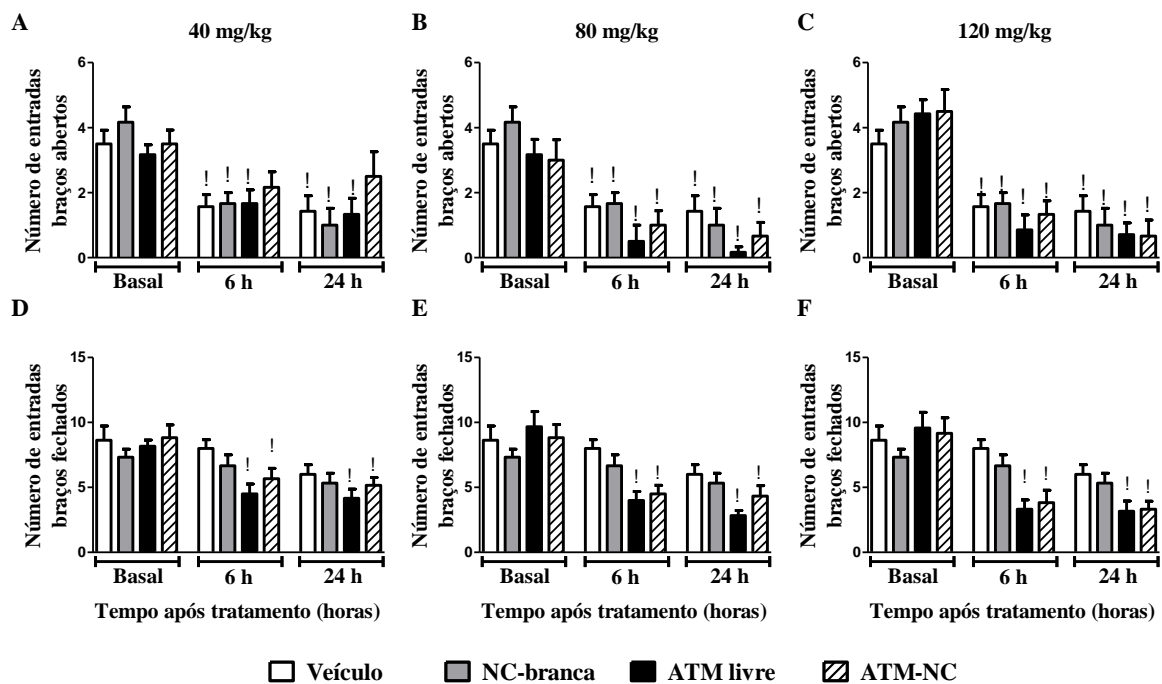


Figura 4.3: Avaliação da ansiedade e da atividade locomotora determinadas no labirinto em cruz elevado para camundongos infectados (média  $\pm$  EPM). Número de entradas nos braços abertos (A, B, C) e fechados (D, E, F) após o tratamento com veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC nas doses de 40 mg/kg (A, D), 80 mg/kg (B, E) e 120 mg/kg (C, F) (n =8).

#### 4.4.2 Campo aberto

Os resultados demonstram que, para os camundongos não infectados, o ATM livre 120 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente o número de *rearings*, em 53 % e 51 % em relação ao grupo tratado com veículo (figura 5.4F). Contudo, para os camundongos tratados com ATM-NC nenhum dos parâmetros analisados pelo método de campo aberto foi alterado. Para os demais parâmetros avaliados pelo método do campo aberto nenhuma alteração foi observada após o tratamento oral com ATM livre ou ATM-NC nas doses estudadas.

Para os camundongos infectados e tratados com NC-branca e veículo foi observado redução significativa em todos os parâmetros analisados pelo método de campo aberto, demonstrando que a infecção por *P. berghei* reduz a capacidade locomotora (figura 5.5). O tratamento com ATM-livre nas doses de 80 e 120 mg/kg também foi capaz de reduzir significativamente a locomoção dos camundongos. Para a dose de 120 mg/kg, tempos de 6 e 24 horas, as reduções no número de campos visitados, total *rearing* e *grooming* foram respectivamente de 82 % e 81 %, 92 % e 87 %; 72 % e 67 %, em relação ao tempo basal. Os resultados após o tratamento com ATM-NC na dose de 120 mg/kg não foram diferentes daqueles encontrados para o tratamento com ATM livre na mesma dose, contudo os efeitos sobre a atividade locomotora foram menos intensos com reduções de 66 % e 67 % para o número de campos visitados, 79 % e 81 % no total de *rearing* e 57 % e 53 % no total de *grooming*, respectivamente aos tempos de 6 e 24 horas.

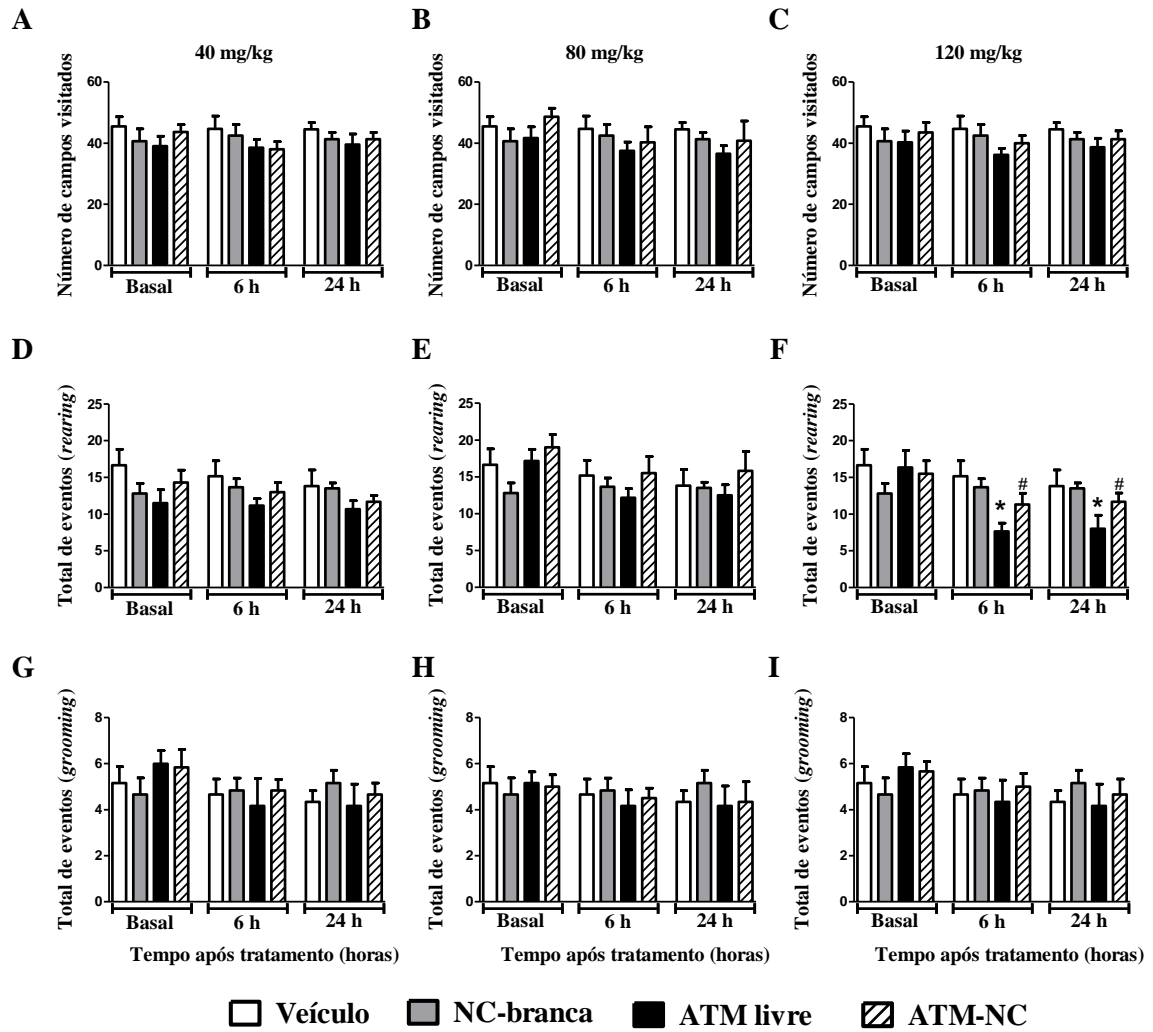


Figura 4.4: Avaliação da atividade locomotora determinada no campo aberto para camundongos não infectados (média  $\pm$  EPM). Número de campos visitados (A, B, C), total de *rearing* (levantamento das patas dianteiras, sustentando o corpo apenas nas patas traseiras) (D, E, F), total de *grooming* (auto limpeza) após o tratamento com veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC nas doses de 40 mg/kg (A, D, G), 80 mg/kg (B, E, H) e 120 mg/kg (C, F, I) (n=8).

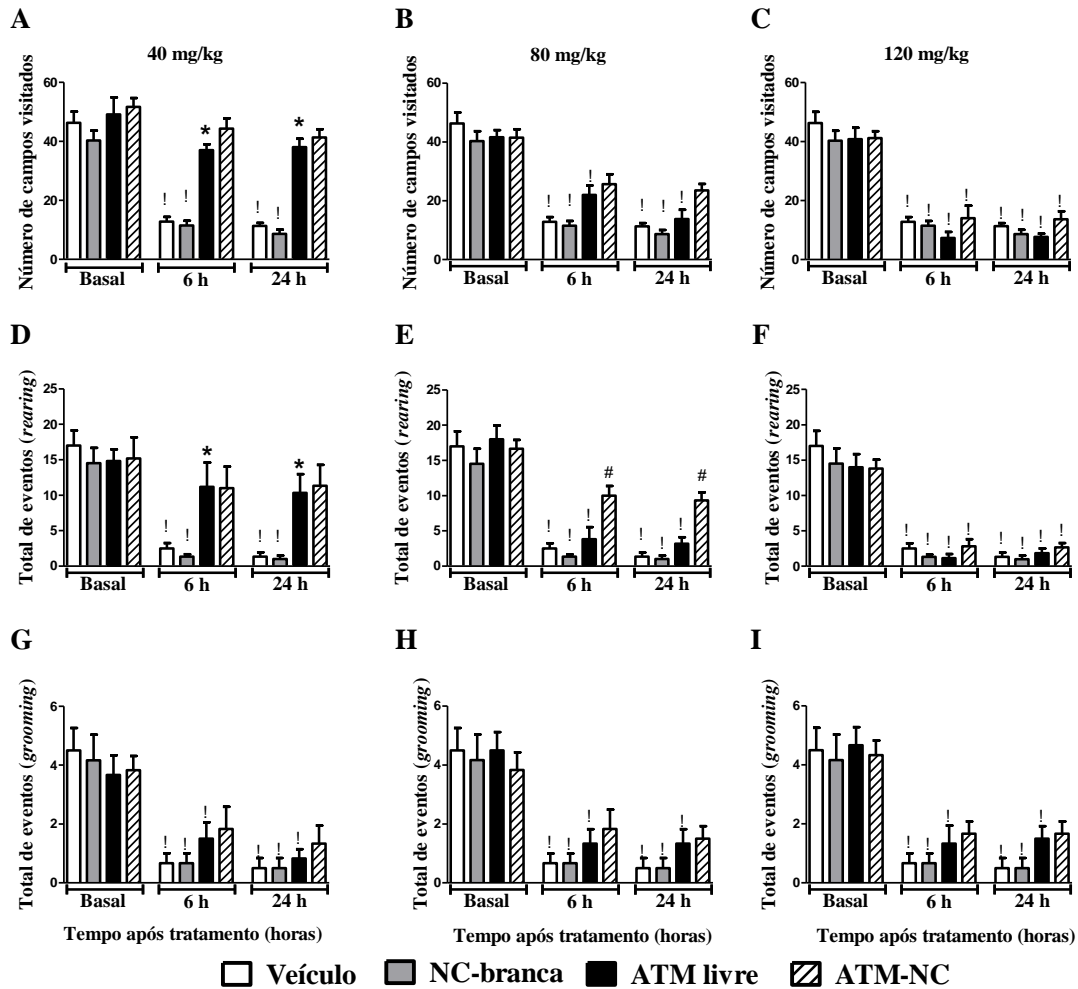


Figura 4.5: Avaliação da atividade locomotora determinada no campo aberto para camundongos infectados (média  $\pm$  EPM). Número de campos visitados (A, B, C), total de *rearing* (levantamento das patas dianteiras, sustentando o corpo apenas nas patas traseiras) (D, E, F), total de *grooming* (auto limpeza) após o tratamento com veículo, NC-branca, ATM livre e ATM-NC nas doses de 40 mg/kg (A, D, G), 80 mg/kg (B, E, H) e 120 mg/kg (C, F, I) (n =8).

#### **4.4.3 Haste girante**

Os resultados obtidos tanto para os camundongos não infectados quanto para os infectados após os tratamentos com veículo, NC-branca, ATM livre (40, 80 e 120 mg/kg) e ATM-NC (40, 80 e 120 mg/kg) não causaram nenhuma alteração sob o equilíbrio e a coordenação motora dos mesmos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos analisados (Anexo 11.2.1; 11.2.2).

#### **4.4.4 Barra de Tração**

Os tratamentos diferentes tratamentos e doses não causaram nenhuma resposta sobre o tônus muscular dos camundongos não infectados e infectados (Anexo 11.3.1; 11.3.2). Todos os camundongos foram capazes de se manter seguros na barra de tração, tanto com as patas dianteiras quanto com as patas traseiras, durante 5 segundos.

Os estudos neurocomportamentais são um importante método de triagem, pois distúrbios comportamentais estão associados com alterações cerebrais que podem ou não ser permanentes (ZASLER; MARTELLI; JACOBS, 2013). DAVIES et al. (2013) ao avaliarem os efeitos neurocomportamentais em ratos, após administração oral de 60 mg/kg de suspensão de ATM, não observaram alterações significativas no número de entradas nos braços abertos. Em contrapartida, os resultados apresentados demonstraram que o ATM livre na dose de 120 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevada, contudo não foram observadas alterações significativas quanto ao número de entradas nos braços fechados. Para validar o método de labirinto em cruz elevado, PELLOW et al. (1985) utilizaram fármacos como diazepam e anfetaminas, observando que as anfetaminas eram responsáveis por desencadear reduções no tempo de permanência ou no número de entradas nos braços abertos, relacionando este comportamento com o desenvolvimento de ansiedade. Os ratos tratados com diazepam apresentaram um comportamento oposto, com aumento do tempo permanência e entradas nos braços abertos. A redução no número de visitas aos braços fechados está relacionada com a diminuição da atividade locomotora do camundongo (LISTER, 1987).

Ainda para os camundongos não infectados observamos que o ATM livre na dose de 120 mg/kg reduziu significativamente o número de *rearing*. Este comportamento é o ato do animal ficar em pé nas patas traseiras utilizando a cauda como suporte, este movimento está relacionado com o comportamento exploratório ou com a atividade locomotora vertical (VAN ABEELLEN, 1970). Nossos resultados estão em acordo com os resultados encontrados por DAVIES et al. (2013) que observaram significativa redução na ação de *rearing* após tratamento oral com ATM na dose 60 mg/kg durante 28 dias. Além disso, estes autores também observaram redução no número de *grooming*, diferentemente dos resultados aqui apresentados. Foi demonstrado que para camundongos não infectados e submetidos aos diferentes tratamentos não foi observada alteração significativa na exploração dos campos e no número de *grooming*.

Para os camundongos infectados foi observada uma redução no número de entradas nos braços abertos e fechados, nos campos visitas, no total de *rearing* e *grooming*, tanto para aqueles tratados com ATM (livre ou nanoencapsulado) quanto os grupos controles (veículo e NC-branca), demonstrando que a malária é capaz de alterar o comportamento do camundongo. Em geral alterações comportamentais e neurológicas têm sido associadas a processos neuroinflamatórios (LACKNER et al., 2006; DE MIRANDA et al., 2011). Assim como em nossos resultados, DE MIRANDA et al. (2011) observaram que camundongos infectados com *P. berghei* exploravam menos os braços abertos do labirinto em cruz elevado. Neste trabalho, os autores demonstraram que este comportamento está relacionado com o processo inflamatório do SNC causado pelo parasita, com aumentos nos níveis de TNF- $\alpha$  e de interleucina 1- $\beta$  nas regiões do hipocampo e do córtex prefrontal. Provavelmente, este mesmo processo inflamatório foi responsável pela redução dos parâmetros avaliados no teste de campo aberto.

Demonstramos em nossos resultados que em animais infectados e tratados com ATM livre e ATM-NC, em todas doses estudadas, há uma redução no número de visitas nos braços fechados do labirinto, o que não foi observado para os animais não infectados. Nos estudos realizados com camundongos infectados sem tratamento (DE MIRANDA et al., 2011) e em camundongos não infectados e tratados com derivado da artemisinina (DAVIES; UDOH, 2016) não foi observado alteração na capacidade exploratória dos braços fechados do labirinto. Deste modo, sugere-se que a resposta inflamatória causada pelo parasita mais os efeitos tóxicos do ATM podem reduzir a

capacidade locomotora do camundongo. Esta proposição pode ser confirmada pela redução no número de campos visitados pelos camundongos infectados tratados com ATM livre nas doses de 80 e 120 mg/kg. Esta resposta não foi encontrada após o tratamento com a dose mais baixa de ATM livre (40 mg/kg) ou com ATM-NC nas doses de 40 e 80 mg/kg.

Os resultados demonstraram que as diferentes doses de ATM livre e ATM-NC não causaram alterações no tônus muscular, na coordenação e no equilíbrio dos camundongos não infectados e infectados. AKINLOLU; SHOKUNBI, (2010), demonstraram que ATM livre na dose de 25 mg/kg administrado durante 7 dias por via IM causou modesta alteração no equilíbrio e na coordenação dos ratos e significativos danos ao núcleo trapezoidal destes animais. Como demonstrado anteriormente, o ATM é responsável por causar efeitos neurotóxicos e provavelmente este efeito é decorrente da formação de ROS (FISHWICK et al., 1995). As ROS podem causar lesão à barreira hematoencefálica, bem como às células nervosas (DAMIANI et al., 2013).

Os resultados encontrados nos testes neurocomportamentais nos mostram que o ATM-livre, principalmente na dose de 120 mg/kg tem influência sobre o desenvolvimento do comportamento de ansiedade, diminui a capacidade locomotora, mas não altera o equilíbrio e o tônus muscular dos camundongos. De maneira oposta, o ATM-NC impede (camundongos não infectados) ou reduz (camundongos infectados) estes efeitos, demonstrando que as NC são uma ferramenta em potencial para contornar a neurotoxicidade causada pelo ATM. Contudo, maiores estudos são necessários para confirmar a ação neuronal do ATM livre e do ATM-NC.

#### 4 DISCUSSÃO GERAL

Os derivados da artemisinina são fármacos de escolha para o tratamento da malária, principalmente na terapia combinada contra *P. falciparum*. A fim de aumentar a eficácia dos medicamentos antimaláricos e reduzir os seus efeitos adversos, vários estudos mostraram o uso de nanocarreadores como estratégia valiosa para a melhora da terapia antimalárica (ADITYA et al., 2010; PRABHU et al., 2016).

As NC apresentam algumas vantagens, como fácil produção, biocompatibilidade e biodegradabilidade (ver LEGRAND et al., 1999), possuem alta eficiência de encapsulação do ATM (superior a 90%) com obtenção de partículas monodispersas (VIDAL-DINIZ, 2014) e estabilidade físico-química. Nossos resultados estão de acordo com BRANQUINHO et al. (2017a), que também obtiveram NC monodispersas e alto teor de encapsulação de uma lactona sesquiterpênica. Estas características são desejáveis para administração IV e oral para garantir uma taxa de liberação do fármaco homogênea. O potencial zeta negativo da NC pode ser atribuído à presença de grupos iônicos polarizados na superfície NC, principalmente os grupos carboxílicos de poli(ácido láctico) como discutido anteriormente (MOSQUEIRA et al., 2000). Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação entre nanopartículas adjacentes (ver LEGRAND et al., 1999). Nos testes de liberação in vitro as NC foram capazes de modificar o perfil de liberação do ATM para o meio aquoso, com uma liberação lenta e prolongada. Do mesmo modo que observado neste trabalho, outra lactona sesquiterpênica também apresentou um perfil de liberação lento e prolongado quando encapsulado em NC de PCL (BRANQUINHO et al., 2014).

ATM-NC nas doses 40, 80 e 120 mg/kg aumentou a taxa de sobrevivência dos camundongos infectados em relação ao grupo tratado com ATM livre nas mesmas doses e reduziu significativamente o número de parasitas quando comparado ao tratamento com veículo. Como esperado, foi observado uma remissão completa da doença em altas doses. Esse efeito pode ser atribuído à alteração na biodisponibilidade do ATM. Os resultados encontrados aqui estão de acordo com trabalhos anteriores que mostram NC foram capazes de alterar o perfil farmacocinético e a biodistribuição de moléculas lipofílicas, aumentando a eficácia dos fármacos (MOSQUEIRA et al., 2004; GARCIA



et al., 2015; BRANQUINHO et al., 2017a). Como já citado neste trabalho o ATM possui baixa biodisponibilidade oral (KARBWANG et al., 1997). Assim, um aspecto importante a destacar é a eficácia ATM-NC por via oral, uma vez que esta via é a mais conveniente e viável para uso na população, principalmente quando consideramos que a malária grave atinge particularmente as crianças. As NC nesse presente trabalho podem estar protegendo o ATM no TGI e melhorando sua absorção no intestino, o que pode ter contribuído para a melhoria de sua eficácia por via oral na forma nanoencapsulada. Esta formulação pode ser facilmente administrada em forma líquida para uso pediátrico.

Outros nanocarreadores já foram estudados para veicular o ATM e permitiram um aumento considerável de sua biodisponibilidade. O ATM quando veiculado no sistema de entrega de fármaco do tipo nanoemulsão foi capaz de aumentar a biodisponibilidade oral em 2,6 vezes em comparação com ATM livre (LAXMI et al., 2015). A administração oral de beta-arteméter veiculado em microemulsão (MANDAWGADE et al., 2008) e a formulação lipossomal (CHIMANUKA et al., 2002) foram eficazes na redução do número de *P. berghei* e *P. chabaudi*, respectivamente, por via oral e IV. Assim, o uso de nanocarreadores com ATM apresenta uma importante melhoria na terapia da malária. A partir disso, nós hipotetizamos que as NC poderiam reduzir a cardiotoxicidade induzida por ATM livre, em modelos não infectados e infectados por *P. berghei*.

Foi demonstrada a ação cardiotóxica do ATM livre *in vitro* e *in vivo*. Após a administração da dose de 120 mg/kg o ATM livre reduziu a contratilidade dos cardiomiócitos e os níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  além de prolongar o potencial de ação. Em estudos *in vitro* o ATM livre na concentração de 10  $\mu$ M reproduziu os efeitos ocasionados pelo tratamento oral com o fármaco livre. Estes efeitos estão diretamente relacionados com o prolongamento do intervalo QT observado camundongos não infectados e infectados tratados com as diferentes doses de ATM livre. Os efeitos cardiotóxicos desenvolvidos pelo ATM estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca (WICKENDEN et al., 1998; SPENCER et al., 2014), taquiarritmias ventriculares malignas e TdP, podendo levar a morte súbita por parada cardíaca (CHAN et al., 2007; LIN; KUNG, 2009; ISBISTER; PAGE, 2013). Os estudos *in vitro* e *in vivo* não demonstraram alterações após o tratamento oral com ATM-NC.

O achado mais importante deste trabalho foi o potencial das NC em impedir o desenvolvimento dos efeitos cardiotoxícos desencadeado pelo ATM livre também por via oral. A redução ou ausência de alterações sobre o sistema cardiovascular observadas após a administração oral de ATM-NC pode ter ocorrido devido à capacidade dos nanocarreadores em modificar a distribuição de fármacos no organismo. Como observado nos estudos de liberação *in vitro* as NC reduziram a liberação de ATM, provavelmente, as NC também desencadearam uma liberação lenta do ATM na corrente sanguínea, reduzindo assim a disponibilidade do fármaco para interagir com o tecido cardíaco, como observado recentemente com o lychnopholideo (BRANQUINHO et al., 2017a, 2017b). Além disso, como proposto anteriormente (ADITYA et al., 2010; MANNING et al., 2014), menos ATM está disponível para ser metabolizado em dihidroartemisinina, que também é cardiotoxíco. Estudos *in vitro* (BORSINI et al., 2012) demonstraram que a dihidroartemisinina em diferentes concentrações e associadas à piperquina podem causar um bloqueio significativo de genes hERG (*ether-a-go-go-related*). Seu bloqueio pode ser induzido por fármacos e está diretamente relacionado com prolongamento do intervalo QT (FERMINI; FOSSA, 2003).

O tamanho nanométrico de NC é uma característica importante para administração oral e absorção por células intestinais (MCCLEAN et al., 1998). Neste contexto, são possíveis dois eventos: (1) as NC podem ficar aprisionadas na rede de vilosidades do intestino mais facilmente e por um período de tempo maior que as formas de dosagem por via oral maiores (por exemplo, cápsulas ou comprimidos); ou (2) NC pode ser internalizada pelas células intestinais, o que permite a modificação da farmacocinética do fármaco e a entrega eficiente em locais alvos no corpo. Isto implica que as nanopartículas podem ser utilizadas quer para melhorar a entrega local de fármacos ou para promover a absorção oral de substâncias ativas que têm ação sistêmica. ATTILI-QADRI et al. (2013) demonstraram que a NC administrada por via oral, em ratos, alterou a eliminação e distribuição de docetaxel. A biodistribuição do docetaxel nos órgãos foi modificada devido a adsorção das NC à superfície dos enterócitos através de interações com apolipoproteínas e fosfolipídios. A administração oral de NC contendo docetaxel modifica o perfil farmacocinético do fármaco e melhora sua atividade anticancerígena quando comparada à administração IV de forma livre (ATTILI-QADRI et al., 2013). Além disso, DE MELLO et al. (2016) mostraram que a

administração oral de NC contendo uma lactona sesquiterpênica foi mais eficaz no combate à doença parasitária que a molécula livre, provavelmente protegendo o fármaco da degradação por via oral. Para diferentes fármacos que possuem tempo de meia-vida curto, como o ATM, a encapsulação em nanopartículas e a administração oral trazem vantagens como proporcionar a liberação prolongada do fármaco encapsulado, melhorar o perfil plasmático, aumentar a biodisponibilidade, diminuir efeitos irritantes sob o trato gastrointestinal e proteger da degradação no trato gastrointestinal (GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2005). ATM é um fármaco que possui baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral. No entanto, nossos resultados mostraram que o ATM-NC exibe eficácia após a administração oral, sugerindo que houve a absorção aumentada na forma de NC. Provavelmente, as NC foram absorvidas gradualmente e a liberação do ATM no sangue ocorreu lentamente, mas em doses suficientes para determinar o *clearance* sanguínea dos parasitas, e, ao mesmo tempo, reduzir a exposição do tecido cardíaco e neuronal ao ATM.

A análise neurocomportamental foi usada como ferramenta para a demonstração de um possível efeito neurotóxico do ATM. Assim, para os animais sadios e infectados submetidos aos diferentes tratamentos, foram utilizados os métodos do labirinto em cruz elevado, campo aberto, haste girante e barra de tração, que avaliam, respectivamente, o grau de ansiedade/medo, a locomoção, o equilíbrio/coordenação motora e a força muscular, fatores influenciados por substâncias que atuam no SNC. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o ATM livre, principalmente na maior dose estudada, é capaz de reduzir a atividade locomotora e causar efeitos similares a ansiedade, em animais não infectados e infectados, sugerindo que o ATM causa alterações na região cerebral da amígdala, região responsável pelo medo e ansiedade (YANG et al., 2016). As NC reduziram os efeitos neurocomportamentais desencadeados pela administração oral de ATM livre. O acometimento do sistema nervoso central devido à malária, em casos graves da doença, é bastante descrito na literatura (COBAN et al., 2007; LACERDA-QUEIROZ et al., 2010). A patogênese da malária cerebral é complexa e ainda não foi completamente elucidada. Atualmente existem duas grandes teorias que tentam explicar a sua ocorrência: I) teoria mecânica a qual sugere o sequestro de hemácias e a conseqüente obstrução do fluxo cerebral e hipóxia estariam diretamente relacionada com o acometimento cerebral na malária grave (BERENDT; TUMER; NEWBOLD, 1994); II) teoria da inflamação em modelos

de infecção com *P. berghei* sugerem intensa resposta imune associada à resposta inata, com resposta inflamatória local com infiltração de linfócitos T CD8+ e células do tipo *natural killers* em camundongos (COBAN et al., 2007). Geralmente, a malária cerebral se desenvolve de forma progressiva e o paciente pode manifestar cefaleia, alterações de comportamento, desorientação, convulsões e coma (MARSH et al., 1996; GOMES et al., 2011). Assim, um dos grandes objetivos do desenvolvimento de ATM-NC é para o tratamento da malária grave, reduzindo a possibilidade de maiores acometimentos no SNC.

De acordo com todo o exposto, os resultados deste trabalho demonstram a capacidade ATM-NC em reduzir a cardiotoxicidade e a neurotoxicidade, além de melhorar a eficácia contra *P. berghei* por via oral em monoterapia, sendo mais uma opção para melhoria dos regimes terapêuticos usados no tratamento da malária.

## 5 CONCLUSÕES

As NC (NC-branca e ATM-NC) apresentaram características físico-químicas satisfatórias que as mantiveram estáveis por até 90 dias e que permitiram seu uso *in vivo*. O ATM-NC em todas as doses estudadas, 40, 80 e 120 mg/kg, administrado oralmente, demonstrou-se eficaz na redução da parasitemia e foi capaz de aumentar a sobrevivência dos camundongos em relação àqueles tratados com ATM livre. O principal achado deste trabalho foi a importância das NC em reduzir a cardiotoxicidade causada pelo ATM livre, principalmente ao reduzir o prolongamento dos intervalos QT e QTc do ECG, impedir o prolongamento do PA, impedir a redução da contratilidade dos cardiomiócitos e dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ . O desenvolvimento de alterações eletrocardiográficas foi reduzido tanto em camundongos não infectados quanto em camundongos infectados, após a administração de ATM-NC em comparação ao ATM livre. Além disso, o tratamento com ATM-NC reduziu alterações neurocomportamentais causadas pelo ATM livre, sugerindo redução da neurotoxicidade causada pelo fármaco em sua forma livre. Assim este trabalho demonstrou-se de grande relevância, pois trouxe uma alternativa eficaz e de maior segurança para a terapêutica da malária a partir do uso do ATM-NC.

## 6. PERSPECTIVAS

Este trabalho abre perspectivas para trabalhos subsequentes:

- ✓ Estudo farmacocinético visando estabelecer correlação entre as concentrações plasmáticas de ATM e os efeitos sobre o sistema cardiovascular e o SNC.
- ✓ Avaliação histológica do coração e cérebro de camundongos tratados com ATM livre e ATM-NC corroborando com as análises realizadas previamente a fim de se detectar possíveis alterações como fibrose e aumento de infiltrado inflamatório.
- ✓ Isolamento e análise de células do tecido neuronal a fim de determinar processos neuropatológicos e o potencial da NC em reduzir efeitos neurotóxicos.
- ✓ Determinação do mecanismo cardiotoxico do ATM:
  - Análises da formação de espécies reativas de oxigênio em cardiomiócitos de camundongos previamente tratados com ATM livre.
  - Quantificação de ATP intracelular em cardiomiócitos de camundongos previamente tratados com ATM livre.
  - Patch-clamp para determinação das correntes de  $I_{K_r}$  e  $I_{K_s}$  em cardiomiócitos de camundongos previamente tratados com ATM livre.

## 6 REFERÊNCIAS

ADITYA, N. P.; PATANKAR, S.; MADHUSUDHAN, B.; MURTHY, R. S. R.; SOUTO, E. B. Artemether-loaded lipid nanoparticles produced by modified thin-film hydration: Pharmacokinetics, toxicological and in vivo anti-malarial activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 448–455, 2010.

AI, J.; GAO, H. H.; HE, S. Z.; WANG, L.; LUO, D. L.; YANG, B. F. Effects of matrine, artemisinin, tetrandrine on cytosolic  $[Ca^{2+}]_i$  in guinea pig ventricular myocytes. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 22, n. 6, p. 512–515, 2001.

AKINLOLU, A. A.; SHOKUNBI, M. T. Neurotoxic effects of 25mg/kg/body weight of artemether on the histology of the trapezoid nuclei and behavioural functions in adult male Wistar rats. **Acta Histochemica**, v. 112, n. 2, p. 193–198, 2010.

ALCÂNTARA, D. D. F. Á.; RIBEIRO, H. F.; CARDOSO, P. C. dos S.; ARAÚJO, T. M. T.; BURBANO, R. R.; GUIMARÃES, A. C.; KHAYAT, A. S.; DE OLIVEIRA BAHIA, M. In vitro evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of artemether, an antimalarial drug, in a gastric cancer cell line (PG100). **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 151–156, 2013.

ANDERSSON, K. B.; BIRKELAND, J. A. K.; FINSEN, A. V.; LOUCH, W. E.; SJAASTAD, I.; WANG, Y.; CHEN, J.; MOLKENTIN, J. D.; CHIEN, K. R.; SEJERSTED, O. M.; CHRISTENSEN, G. Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the *Serca2* gene. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 47, n. 2, p. 180–187, 2009.

ANDRADE, J.; PASTORE, C.; PINHO, C.; MANO, R. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Análise e Emissão de Laudos Eletrocardiográficos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 3 (suplemento 2), p. 1–19, 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de toxicologia e segurança. p. 1–48, 2013.

ATTILI-QADRI, S.; KARRA, N.; NEMIROVSKI, A.; SCHWOB, O.; TALMON, Y.; NASSAR, T.; BENITA, S. Oral delivery system prolongs blood circulation of docetaxel

nanocapsules via lymphatic absorption. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17498–17503, 2013.

AYIMBA, E.; HEGEWALD, J.; GANTIN, R. G.; LECHNER, C. J.; AGOSSOU, A.; BANLA, M.; SOBOSLAY, P. T. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 1, p. 218–226, 2011.

AZIKIWE, C.; IFEZULIKE, C.; SIMINIALAYI, I.; AMAZU, L.; ENYE, J.; NWAKWUNITE, O. A comparative laboratory diagnosis of malaria: microscopy versus rapid diagnostic test kits. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 4, p. 307–310, 2012.

BARBOSA, M.; NUNES, M.; FILHO, O. C.; CAMAROZANO, A.; RABISCHOFFSKY, A.; MACIEL, B. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes das indicações da ecocardiografia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 6 supl.3, p. e265–e302, 2009.

BAYOMI, M.A.; AL-ANGARY, A.A.; AL-MESHAL, M.A.; MOHAMED M.; AL-DARDIRI, M.M. In vivo evaluation of arteether liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.175, p.1-7, 1998.

BECKMAN, D. A.; YOURENEFF, M.; BUTT, M. T. Neurotoxicity Assessment of Artemether in Juvenile Rats. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 98, n. 2, p. 183–199, 2013.

BERENDT, A. R.; TUMER, G. D. H.; NEWBOLD, C. I. Cerebral malaria: The sequestration hypothesis. **Parasitology Today**, v. 10, n. 10, p. 412–414, 1994.

BERLINER, R. W.; EARLE, D. P.; TAGGART, J. V.; ZUBROD, G.; WELCH, W. J.; CONAN, N. J.; BAUMAN, E. L. I.; SCUDDER, S. T.; SHANNON, J. A. Studies on the chemotherapy of the human malaras. The physiological disposition, antimalarial activity, and toxicity of several derivatives of 4-aminoquinoline. **The Journal Clinical Investigation**, v. 27, p. 98–107, 1948.

BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198–205, 2002.



BERS, D. M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annual Review of Physiology**, p. 23–49, 2008.

BODE, E. F.; BRISTON, S. J.; OVEREND, C. L.; O'NEILL, S. C.; TRAFFORD, A. W.; EISNER, D. A. Changes of *SERCA* activity have only modest effects on sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  content in rat ventricular myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. Pt 19, p. 4723–9, 2011.

BOPP, S. E.; RODRIGO, E.; GONZÁLEZ-PÁEZ, G. E.; FRAZER, M.; BARNES, S.; VALIM, C.; WATSON, J.; WALKER, J. R.; SCHMEDT, C.; WINZELER, E. A. Identification of the *Plasmodium berghei* resistance locus 9 linked to survival on chromosome 9. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 316, 2013.

BORRAJO, E.; ABELLAN-POSE, R.; SOTO, A.; GARCIA-FUENTES, M.; CSABA, N.; ALONSO, M. J.; VIDAL, A. Docetaxel-loaded polyglutamic acid-PEG nanocapsules for the treatment of metastatic cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 238, p. 263–271, 2016.

BORSINI, F.; CRUMB, W.; PACE, S.; UBBEN, D.; WIBLE, B.; YAN, G. X.; FUNCK-BRENTANO, C. *In vitro* cardiovascular effects of dihydroartemisin-piperazine combination compared with other antimalarials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3261–3270, 2012.

BOUDREAU, E. F.; PANG, L. W.; DIXON, K. E.; WEBSTER, H. K.; PAVANAND, K.; TOSINGHA, L.; SOMUTSAKORN, P.; CANFIELD, C. J. Malaria: treatment efficacy of halofantrine ( WR 171 , 669 ) in initial field trials in Thailand. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 66, n. 2, p. 227–235, 1988.

BRANQUINHO, R. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; KANO, E. K.; DE SOUZA, J.; DORIM, D. D. R.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; DE LANA, M. HPLC-DAD and UV-spectrophotometry for the determination of lychnopholide in nanocapsule dosage form: Validation and application to release kinetic study. **Journal of Chromatographic Science**, v. 52, n. 1, p. 19–26, 2014.

BRANQUINHO, R. T.; POUND-LANA, G.; MARQUES MILAGRE, M.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; DE LANA, M.; MOSQUEIRA, V. C. F. Increased body exposure to new anti-trypanosomal through

nanoencapsulation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017a.

BRANQUINHO, R. T.; ROY, J.; FARAH, C.; GARCIA, G. M.; AIMOND, F.; LE GUENNEC, J.-Y.; SAUDE-GUIMARÃES, D. A.; GRABE-GUIMARAES, A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; DE LANA, M.; RICHARD, S. Biodegradable polymeric nanocapsules prevent cardiotoxicity of anti-trypanosomal *Lychnopholide*. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 44998, 2017b.

BREWER, T. G.; PEGGINS, J. O.; GRATE, S. J.; PETRAS, J. M.; LEVINE, B. S.; WEINA, P. J.; SWEARENGEN, J.; HEIFFER, M. H.; SCHUSTER, B. G. Neurotoxicity in animals due to arteether and artemether. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 33–36, 1994.

BROSSI, A.; VENUGOPALAN, B.; DOMINGUEZ GERPE, L.; YEH, H. J. C.; FLIPPEN-ANDERSON, J. L.; BUCHS, P.; LUO, X. D.; MILHOUS, W.; PETERS, W. Arteether, a new antimalarial drug: synthesis and antimalarial properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 20, p. 645–650, 1988.

CARVALHO FS, BURGEIRO A, GARCIA R, MORENO AJ, CARVALHO RA, O. P. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. **Medicinal Research Reviews**, n. 0, p. 1–30, 2013.

CÉSAR IC, PIANETTI GA. Quantitation of artemether in pharmaceutical raw material and injections by high performance liquid chromatography. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n.4, p.737-742, 2009.

CHAN, A.; ISBISTER, G. K.; KIRKPATRICK, C. M. J.; DUFFUL, S. B. Drug-induced QT prolongation and *torsades de pointes*: Evaluation of a QT nomogram. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 100, n. 10, p. 609–615, 2007.

CHENG, Q.; KYLE, D. E.; GATTON, M. L. Artemisinin resistance in plasmodium falciparum: A process linked to dormancy? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 249–255, 2012.

CHIMANUKA, B.; GABRIËLS, M.; DETAEVERNIER, M. R.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. A. Preparation of  $\beta$ -artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescence parasitaemia in Plasmodium

chabaudi malaria-infected mice. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 1, p. 13–22, 2002.

CLASSEN, W.; ALTMANN, B.; GRETENER, P.; SOUPPART, C.; SKELTON-STROUD, P.; KRINKE, G. Differential effects of orally versus parenterally administered qinghaosu derivative artemether in dogs. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 51, n. 6, p. 507–516, 1999.

COBAN, C.; ISHII, K. J.; UEMATSU, S.; ARISUE, N.; SATO, S.; YAMAMOTO, M.; KAWAI, T.; TAKEUCHI, O.; HISAEDA, H.; HORII, T.; AKIRA, S. Pathological role of toll-like receptor signaling in cerebral malaria. **International Immunology**, v. 19, n. 1, p. 67–79, 2007.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, n. 123-133, 2001.

COSTENARO, P.; BENEDETTI, P.; FACCHIN, C.; MENGOLI, C.; PELLIZZER, G. Fatal myocarditis in course of plasmodium falciparum infection: case report and review of cardiac complications in malaria. **Case Reports in Medicine**, v. 2011, p. 202083, 2011.

CRUZ, A. P. de M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. **Métodos em Neurociência**, p. 192–217, 2012.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; COSTA, T. D.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, n. 1–2, p. 198–205, 2006.

DAMIANI, D.; LAUDANNA, N.; BARRIL, C.; SANCHES, R.; BORELLI, N. S.; DAMIANI, D. Encefalopatias: etiologia , fisiopatologia e manuseio clínico de algumas das principais formas de apresentação da doença. **Revista Brasileira Clínica Médica**, v. 11, n. 1, p. 67–74, 2013.

DARPO, B.; NEBOUT, T.; SAGER, P. T. Clinical evaluation of QT/QTc prolongation and proarrhythmic potential for nonantiarrhythmic drugs: the international conference

on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use E14 guideline. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, n. 5, p. 498–507, 2006.

DAS, A. Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, v. 5, n. 2, p. 93–102, 2015.

DAVIES, K. G.; EDAGHA, N.; ARIBO, E.; ANTAI, A. B.; OSIM, E. Effects of artemether and artesunate on social behaviour and pain perception. **Research in Neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 31–38, 2013.

DAVIES, K.; UDOH, U. Effect of oral artesunate on anxiety and fear. **Journal of Disease and Global Health**, v. 8, n. 2, p. 48–54, 2016.

DAY, C. P.; MCCOMB, J. M.; CAMPBELL, R. W. QT dispersion: an indication of arrhythmia risk in patients with long QT intervals. **British Heart Journal**, v. 63, n. 6, p. 342–344, 1990.

DE MELLO, C. G. C.; BRANQUINHO, R. T.; OLIVEIRA, M. T.; MILAGRE, M. M.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; DE LANA, M. Efficacy of lychnopholide polymeric nanocapsules after oral and intravenous administration in murine experimental Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5215–5222, 2016.

DE MIRANDA, A. S.; LACERDA-QUEIROZ, N.; DE CARVALHO VILELA, M.; RODRIGUES, D. H.; RACHID, M. A.; QUEVEDO, J.; TEIXEIRA, A. L. Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA). **Neuroscience Letters**, v. 491, n. 3, p. 202–206, 2011.

DEL MONTE, F.; DJAMEL, L.; JLUIS, G.; TSUYOSHI, T.; DOYE, A.; GWATHMEY, J.; HAJJAR, R. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 15, p. 2004, 2004.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. Role of nanotechnology in

pharmaceutical product development. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 3, n. 2, p. 26–33, 2011.

DO, T. D.; AMIN, F. U.; NOH, Y.; KIM, M. O.; YOON, J. Guidance of magnetic nanocontainers for treating Alzheimer's disease using an electromagnetic, targeted drug-delivery actuator. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 569–574, 2016.

DOKOMAJILAR, C.; NSOBYA, S. L.; GREENHOUSE, B.; ROSENTHAL, P. J.; DORSEY, G. Selection of *Plasmodium falciparum* pfmdr1 alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1893–1895, 2006.

DOUGLAS, P. S.; DECARA, J. M.; DEVEREUX, R. B.; DUCKWORTH, S.; GARDIN, J. M.; JABER, W. A.; MOREHEAD, A. J.; OH, J. K.; PICARD, M. H.; SOLOMON, S. D.; WEI, K.; WEISSMAN, N. J. Echocardiographic imaging in clinical trials: american society of echocardiography standards for echocardiography core laboratories. endorsed by the american college of cardiology foundation. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 22, n. 7, p. 755–765, 2009.

DUAL, V. K.; KARL, P. K.; SHARMA, V. P. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax* malaria in India. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, p. 16–19, 1996.

DUFFY, P. E.; MUTABINGWA, T. K. Artemisinin combination therapies. **Lancet**, v. 367, n. 9528, p. 2037–2039, 2006.

DUNHAM, N.; MIYA, T. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association.**, v. 46, n. 3, p. 208–209, 1957.

DUNST, J.; KAMENA, F.; MATUSCHEWSKI, K. Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. **Frontier in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. July, p. 1–16, 2017.

ECKSTEIN-LUDWIG, U.; WEBB, R. J.; VAN GOETHEM, I. D. A.; EAST, J. M.; LEE, A. G.; KIMURA, M.; O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; WARD, S. A.; KRISHNA, S. Artemisinins target the *SERCA* of *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 424, n. 6951,

p. 957–961, 2003.

EFFERTH, T.; RÜCKER, G.; FALKENBERG, M.; MANNS, D.; OLBRICH, A.; FABRY, U.; OSIEKA, R. Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs. **Arzneimittel-Forschung**, v. 46, n. 2, p. 196–200, 1996.

ESU, E.; EE, E.; ON, O.; UWAOMA, A.; MM, M. Artemether for severe malaria (Review ). **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, p. 68, 2014.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for industry interval prolongation and guidance for industry. E14 clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for non-antiarrhythmic drugs. **U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)**, n. 1–16, 2005.

FEITOSA, G.S.; NICOLAU, J.C.; et al. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes para Avaliação e Tratamento de Pacientes com Arritmias Cardíacas. **Arquivos brasileiros de Cardiologia**, v.79, p.1-49, 2002.

FELDMAN, J.; GOLDWASSER, G. P. Eletrocardiograma : recomendações para a sua interpretação. **Revista SOCERJ**, v. 17, n. 4, p. 251–256, 2004.

FERMINI, B.; FOSSA, A. A. The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 6, p. 439–447, 2003.

FERNÁNDEZ-VELASCO, M.; RUEDA, A.; RIZZI, N.; BENITAH, J. P.; COLOMBI, B.; NAPOLITANO, C.; PRIORI, S. G.; RICHARD, S.; GÓMEZ, A. M. Increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. **Circulation Research**, v. 104, n. 2, p. 201–209, 2009.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.

FISHWICK, J.; MCLEAN, W. G.; EDWARDS, G.; WARD, S. a. The toxicity of artemisinin and related compounds on neuronal and glial cells in culture. **Chemico-Biological Interactions**, v. 96, n. 3, p. 263–271, 1995.

FRAGASSO, G.; SANVITO, F.; BARATTO, F.; MARTINENGGHI, S.; DOGLIONI, C. Cardiotoxicity after low-dose chloroquine antimalarial therapy. **Heart Vessels**, v. 24, p. 385–387, 2009.

FRANÇA, T. C. C.; DOS SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271–1278, 2008.

FREIREICH, E. J. Quantitative comparasion of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, dog, monkey and man. **Cancer Chemother Rep.**, v.50, p. 219-244, 1966.

FRIDERICIA, L. S. Die systolendauer im elektrokardiogramm bei normalen menschen und bei herzkranken. **Acta Medica Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 469–486, 1920.

GABRIËLS, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Physical and chemical evaluation of liposomes, containing artesunate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.31, p.655-667.

GALINDO-RODRIGUEZ, S. A.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of *in vivo* studies. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 22, n. 5, p. 419–464, 2005.

GAMBARDELLA, J.; TRIMARCO, B.; IACCARINO, G. New insights in cardiac calcium handling and excitation-contraction coupling. **Advances in Internal Medicine**, 2017.

GARAVELLI, P. L.; CORTI, E. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: the first case in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 86, n. (2), p. 128, 1992.

GARCIA, G. M.; OLIVEIRA, L. T.; PITTA, I. D. R.; DE LIMA, M. D. C. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; ABDALLA, D. S. P.; MOSQUEIRA, V. C. F. Improved nonclinical pharmacokinetics and biodistribution of a new PPAR pan-agonist

and COX inhibitor in nanocapsule formulation. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 207–218, 2015.

GARG, A.; BHALALA, K.; TOMAR, D.S.; WAHAJUDDIN. In-situ single pass intestinal permeability and pharmacokinetic study of developed Lumefantrine loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 10, p.120-130, 2017.

GE, W.; YUAN, M.; CEYLAN, A. F.; WANG, X.; REN, J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase protects against doxorubicin cardiotoxicity through a transient receptor potential channel vanilloid 1-mediated mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 4, p. 622–634, 2016.

GONDIM, A. N. S.; LARA, A.; SANTOS-MIRANDA, A.; ROMAN-CAMPOS, D.; LAUTON-SANTOS, S.; MENEZES-FILHO, J. E. R.; DE VASCONCELOS, C. M. L.; CONDE-GARCIA, E.; GUATIMOSIM, S.; CRUZ, J. S. (-)-Terpinen-4-ol changes intracellular Ca<sup>2+</sup> handling and induces pacing disturbance in rat hearts. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, p. 56-63, 2017.

GOMES, A.; VITORINO, R.; COSTA, A.; MENDONÇA, E.; OLIVEIRA, M.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358–369, 2011.

GONÇALVES, L. A.; CRAVO, P.; FERREIRA, M. U. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 534–539, 2014.

GOTTDIENER, J. S.; BEDNARZ, J.; DEVEREUX, R.; GARDIN, J.; KLEIN, A.; MANNING, W. J.; MOREHEAD, A.; KITZMAN, D.; OH, J.; QUINONES, M.; SCHILLER, N. B.; STEIN, J. H.; WEISSMAN, N. J. American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials: A report from the american society of echocardiography's guidelines and standards committee and the task force on echocardiography in clinical trials. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 17, n. 10, p. 1086–1119, 2004.

GU, Y. X.; CUI, Y. F.; WU, B. A.; SHI, X. C.; TENG, X. H. Effects of artemether on peripheral T, B, T mu and T gamma lymphocytes in beagle dog. **Journal of**



**Traditional Chinese Medicine**, v. 9, n. 0255–2922 (Print), p. 215–219, 1989.

GUIMARÃES, J.; NICOLAU, J.; POLANCZYK, C.; PASTORE, C.; PINHO, J.; BACELLAR, M. Diretrizes de interpretação do eletrocardiograma de repouso. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, n. suplemento II, p. 1–18, 2003.

GUPTA, S.; SEYDEL, K.; MIRANDA-ROMAN, M. A.; FEINTUCH, C. M.; SAIDI, A.; KIM, R. S.; BIRBECK, G. L.; TAYLOR, T.; DAILY, J. P. Extensive alterations of blood metabolites in pediatric cerebral malaria. **Indian Journal of Medical Microbiology**, p. 1–13, 2017.

HAAS, S. E.; BETTONI, C. C.; DE OLIVEIRA, L. K.; GUTERRES, S. S.; DALLA COSTA, T. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 2, p. 156–161, 2009.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385–403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, 1984.

HARA, Y.; YAMAWAKI, H.; SHIMADA, M.; OKADA, K.; TANAI, T.; ICHIKAWA, D.; MIYAKE, K.; KIZAKI, K. Anticholinergic effects of artemisinin, an antimalarial drug, in isolated guinea pig heart preparations. **The Journal of Veterinary Medical Science the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 69, n. 7, p. 697–702, 2007.

HAVERKAMP, W.; BREITHARDT, G.; CAMM, A.J.; JANSE, M.J.; ROSEN, M.R.; ANTZELEVITCH, C.; ESCANDE, D.; FRANZ, M.; MALIK, M.; MOSS, A.; SHAH, R. The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. **Cardiovascular Research**, v. 47, p.219-233, 2000.

HAYNES, R.; CHEU, K.-W. Considerations on the Mechanism of Action of Artemisinin Antimalarials: Part 1-The 'Carbon Radical' and 'Heme' Hypotheses. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 4, p. 217–277, 2013.

HERRÁN, E.; REQUEJO, C.; RUIZ-ORTEGA, J. A.; ARISTIETA, A.; IGARTUA, M.; BENGOTXEA, H.; UGEDO, L.; PEDRAZ, J. L.; LAFUENTE, J. V.; HERNÁNDEZ, R. M. Increased antiparkinson efficacy of the combined administration of VEGF- and GDNF-loaded nanospheres in a partial lesion model of Parkinson's disease. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 2677–2687, 2014.

HOLMQVIST, F.; THOMAS, K. L.; BRODERICK, S.; ERSBØLL, M.; SINGH, D.; CHISWELL, K.; SHAW, L. K.; HEGLAND, D. D.; VELAZQUEZ, E. J.; DAUBERT, J. P. Clinical outcome as a function of the PR-interval- There is virtue in moderation: Data from the Duke Databank for cardiovascular disease. **Europace**, v. 17, n. 6, p. 978–985, 2015.

IBRAHIM, S.; TAGAMI, T.; OZEKI, T. Effective-Loading of Platinum-Chloroquine into PEGylated Neutral and Cationic Liposomes as a Drug Delivery System for Resistant Malaria Parasites. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.40, n.6, p. 815-823, 2017.

IDRO, R.; MARSH, K.; JOHN, C. C.; NEWTON, C. R. J. Europe PMC funders group cerebral malaria; mechanisms of brain injury and strategies for improved neuro-cognitive outcome. **Pediatric Research**, v. 68, n. 4, p. 267–274, 2010.

IONOPTIX. Myocyte Calcium & Contractility Recording System (HyperSwitch Configuration). 2011. Disponível em: <<http://www.ionoptix.com/product/myocyte-calcium-and-contractility-recording-system/>>.

ISACCHI, B.; BERGONZI, M. C.; GRAZIOSO, M.; RIGHESCHI, C.; PIETRETTI, A.; SEVERINI, C.; BILIA, A. R. Artemisinin and artemisinin plus curcumin liposomal formulations: enhanced antimalarial efficacy against Plasmodium berghei-infected mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.80, p.528-534, 2011.

ISBISTER, G. K.; PAGE, C. B. Drug induced QT prolongation: The measurement and assessment of the QT interval in clinical practice. **British Journal of Clinical**

**Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 48–57, 2013.

JAIN, K.; SOOD, S.; GOWTHAMARAJAN, K. Lipid nanocarriers and molecular targets for malaria chemotherapy. **Current Drug Targets**, v. 15, n. 3, p. 292–312, 2014.

JOANNY, F.; LÖHR, S. J.; ENGLEITNER, T.; LELL, B.; MORDMÜLLER, B. Limit of blank and limit of detection of *Plasmodium falciparum* thick blood smear microscopy in a routine setting in Central Africa. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 234, 2014.

KARBWANG, J.; NA-BANGCHANG, K.; CONGPUONG, K.; MOLUNTO, P.; THANAVIBUL, A. Pharmacokinetics and bioavailability of oral and intramuscular artemether. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 4, p. 307–310, 1997.

KARUNAWEERA, N. D.; GRAU, G. E.; GAMAGE, P.; CARTER, R.; MENDIS, K. N. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 89, p. 3200–3203, 1992.

KHOURY, D. S.; CROMER, D.; ELLIOTT, T.; SOON, M. S. F.; THOMAS, B. S.; JAMES, K. R.; BEST, S. E.; AOGO, R. A.; ENGEL, J. A.; GARTLAN, K. H.; AKTER, J.; SEBINA, I.; HAQUE, A.; DAVENPORT, M. P. Characterising the effect of antimalarial drugs on the maturation and clearance of murine blood-stage *Plasmodium* parasites *in vivo*. **International Journal of Parasitology**, 2017.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): An antimalarial drug from China. **American Association for the Advancement of Science**, v. 228, n. 4703, p. 1049–1055, 1985.

KOUCHAK, M.; MALEKAHMADI, M.; BAVARSAD, N.; SAKI MALEHI, A.; ANDISHMAND, L. Dorzolamide nanoliposome as a long action ophthalmic delivery system in open angle glaucoma and ocular hypertension patients. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 0, p. 1–16, 2017.

KRISHNA, S.; UHLEMANN, A.; HAYNES, R. K. Artemisinins: mechanisms of action

and potential for resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 233–244, 2004.

KRISHNA, S.; WOODROW, C. J.; STAINES, H. M.; HAYNES, R. K.; MERCEREAU-PUIJALON, O. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 5, p. 200–205, 2006.

KUMAR-ROINÉ, S.; MATSUIA, M.; REYBIERA, K.; DARIUSD, H.T.; CHINAIND, M.; PAUILLAC, S.; LAURENTA, D. Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 369–377, 2009.

LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D. H.; VILELA, M. C.; MIRANDA, A. S. de; AMARAL, D. C. G.; CAMARGOS, E. R. da S.; CARVALHO, L. J. de M.; HOWE, C. L.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 3, p. 271–278, 2010.

LACKNER, P.; BEER, R.; HEUSSLER, V.; GOEBEL, G.; RUDZKI, D.; HELBOK, R.; TANNICH, E.; SCHMUTZHARD, E. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 32, n. 2, p. 177–188, 2006.

LAXMI, M.; BHARDWAJ, A.; MEHTA, S.; MEHTA, A. Development and characterization of nanoemulsion as carrier for the enhancement of bioavailability of artemether. **Artificial cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 334–344, 2015.

LEANG, R.; BARRETTE, A.; BOUTH, D. M.; MENARD, D.; ABDUR, R.; DUONG, S.; RINGWALD, P. Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated plasmodium falciparum and *Plasmodium vivax* in Cambodia, 2008 to 2010. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 818–826, 2013.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. **STP Pharma Science**, v. 9, n. 1, p. 411–418, 1999.

LEHANE, A. M.; MCDEVITT, C. A.; KIRK, K.; FIDOCK, D. A. Degrees of chloroquine resistance in *Plasmodium*-Is the redox system involved? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 47–57, 2012.

LEITE, E. A.; GRABE-GUIMARÃES, A.; GUIMARÃES, H. N.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. **Life Sciences**, v. 80, n. 14, p. 1327–1334, 2007.

LI, Q.; HICKMAN, M. Toxicokinetic and toxicodynamic (TK/TD) evaluation to determine and predict the neurotoxicity of artemisinins. **Toxicology**, v. 279, n. 1–3, p. 1–9, 2011.

LI, W.; MO, W.; SHEN, D.; SUN, L.; WANG, J.; LU, S.; GITSCHIER, J. M.; ZHOU, B. Yeast model uncovers dual of mitochondria in the action of artemisinin. **PLoS Genetics**, v. 1, n. 3, p. 329–334, 2005.

LIN, Y.; KUNG, M. Magnitude of QT prolongation associated with a higher risk of *Torsades de Pointes*. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 18, n. 5, p. 235–239, 2009.

LISTER, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 0–5, 1987.

LOBO, L.; DE SOUSA, B.; CABRAL, L.; CRISTIANO, M. L. S.; NOGUEIRA, F. Highly active ozonides selected against drug resistant malaria. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 7, p. 450–453, 2016.

LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.; CHANTHAVANICH, P.; EDWARDS, G.; NICHOLL, D.; BUNCH, C.; WARRELL, D. Cardiovascular toxicity and distribution kinetics of intravenous chloroquine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 31–36, 1986.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; ECHEVARRIA, A.; GRZYMBERG, N. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MANDAWGADE, S. D.; SHARMA, S.; PATHAK, S.; PATRAVALE, V. B.

Development of SMEDDS using natural lipophile: Application to  $\beta$ -Artemether delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 362, n. 1–2, p. 179–183, 2008.

MANN, D. L. Mechanisms and models in heart failure. **Circulation**, v. 100, p. 999–1008, 1999.

MANNING, J.; VANACHAYANGKUL, P.; LON, C.; SPRING, M.; SO, M.; SEA, D.; SE, Y.; SOMETHY, S.; PHANN, S. T.; CHANN, S.; SRIWICHAI, S.; BUATHONG, N.; KUNTAWUNGINN, W.; MITPRASAT, M.; SIRIPOKASUPKUL, R.; TEJA-ISAVADHARM, P.; SOH, E.; TIMMERMANS, A.; LANTERI, C.; KAEWKUNGWAL, J.; AUAYPORN, M.; TANG, D.; CHOUR, C. M.; PROM, S.; HAIGNEY, M.; CANTILENA, L.; SAUNDERS, D. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of a two-day regimen of dihydroartemisinin-piperaquine for malaria prevention halted for concern over prolonged corrected QT interval. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6056–6067, 2014.

MANNING, L.; LAMAN, M.; PAGE-SHARP, M.; SALMAN, S.; HWAIWHANJE, I.; MOREP, N.; SIBA, P.; MUELLER, I.; KARUNAJEEWA, H. A.; DAVIS, T. M. E. Meningeal inflammation increases artemether concentrations in cerebrospinal fluid in papua new guinean children treated with intramuscular artemether. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5027–5033, 2011.

MARSH, K.; ENGLISH, M.; CRAWLEY, J.; PESHU, N. The pathogenesis of severe malaria in African children. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 395–402, 1996.

MAUDE, R. J.; PONTAVORNPINYO, W.; SARALAMBA, S.; AGUAS, R.; YEUNG, S.; DONDORP, A. M.; DAY, N. P.; WHITE, N. J.; WHITE, L. J. The last man standing is the most resistant: eliminating artemisinin-resistant malaria in Cambodia. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 31, 2009.

MCCLEAN, S.; PROSSER, E.; MEEHAN, E.; O'MALLEY, D.; CLARKE, N.; RAMTOOLA, Z.; BRAYDEN, D. Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 153–163, 1998.

MECCA, T. E.; ELAM, J. A. N. E. T. T.; NASH, C. B.; CALDWELL, R. W.  $\alpha$ -

adrenergic blocking properties of quinine HCl 1. **European Journal of Pharmacology**, v. 63, p. 159–66, 1980.

MENARD, D.; MATSIKA-CLAQUIN, M. D.; DJALLE, D.; YAPOU, F.; MANIRAKIZA, A.; DOLMAZON, V.; SARDA, J.; TALARMIN, A. Association of failures of seven-day courses of artesunate in a non-immune population in Bangui, Central African Republic with decreased sensitivity of *Plasmodium falciparum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 3, p. 616–621, 2005.

MESHNICK, S. R.; THOMAS, A.; RANZ, A.; XU, C. M.; PAN, H. Z. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemin in its mechanism of antimalarial action. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 49, n. 2, p. 181–189, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. v. 1, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 25, p. 1–5, 2015.

MOHSEN, A. H.; GREEN, S. T. .; MCKENDRICK, M. W. .; WEST, J. N. . Myocarditis associated with *Plasmodium falciparum* malaria: A case report and a review of the literature. **Journal of Travel Medicine**, v. 8, n. 4, p. 219–220, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614–626, 2000.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LOISEAU, P. M.; LEGRAND, P.; DEVISSAGUET, J.; BORIES, C.; BARRATT, G. Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in plasmodium berghei -infected mice efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in *Plasmodium berghei*-infected mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48,

n. 4, p. 1222–1228, 2004.

MOVELLAN, J.; URBÁN, P.; MOLES, E.; DE LA FUENTE, J. M.; SIERRA, T.; SERRANO, J. L.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X. Amphiphilic dendritic derivatives as nanocarriers for the targeted delivery of antimalarial drugs. **Biomaterials**, v. 35, n. 27, p. 7940–7950, 2014.

MULVAGH, S. L.; RAKOWSKI, H.; VANNAN, M. A.; ABDELMONEIM, S. S.; BECHER, H.; BIERIG, S. M.; BURNS, P. N.; CASTELLO, R.; COON, P. D.; HAGEN, M. E.; JOLLIS, J. G.; KIMBALL, T. R.; KITZMAN, D. W.; KRONZON, I.; LABOVITZ, A. J.; LANG, R. M.; MATHEW, J.; MOIR, W. S.; NAGUEH, S. F.; PEARLMAN, A. S.; PEREZ, J. E.; PORTER, T. R.; ROSENBLOOM, J.; STRACHAN, G. M.; THANIGARAJ, S.; WEI, K.; WOO, A.; YU, E. H. C.; ZOGHBI, W. A. American Society of Echocardiography consensus statement on the clinical applications of ultrasonic contrast agents in echocardiography. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 21, n. 11, p. 1179–1201, 2008.

MURAMBIWA, P.; MASOLA, B.; GOVENDER, T.; MUKARATIRWA, S.; MUSABAYANE, C. T. Anti-malarial drug formulations and novel delivery systems: A review. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 71–79, 2011.

NAGARSENKER, M.; TAYADE, N. Development and evaluation of artemether parenteral microemulsion. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 5, p. 637, 2010.

National center for biotechnology informations. Artemether. **U.S. National library of Medicine**, p. 1–35, 2017.

NERBONNE, J. M.; KASS, R. S. Molecular physiology of cardiac repolarization. **Physiological Reviews**, p. 1205–1253, 2005.

NGOUESSE, B.; BASCO, L. K.; RINGWALD, P.; KEUNDJIAN, A.; BLACKETT, K. N. Cardiac effects of amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in malaria-infected african patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 6, p. 711–716, 2001.

NONTPRASERT, A.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; NOSTEN-BERTRAND, M.



Studies of the neurotoxicity of oral artemisinin derivatives in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 3, p. 409–412, 2000.

NOSTEN, F.; KUILE, F. O.; LUXEMBURGER, C.; WOODROW, C.; KYLE, D. E.; CHONGSUPHAJASIDDHI, T.; WHITE, N. Cardiac effects of antimalarial treatment with halofantrine. **Journal of medical genetics**, v. 17, n. 6, p. 409, 1993.

NOSTEN, F.; MCGREADY, R.; D'ALESSANDRO, U.; BONELL, A.; VERHOEFF, F.; MENENDEZ, C.; MUTABINGWA, T.; BRABIN, B. Antimalarial drugs in pregnancy: a review. **Current Drug Safety**, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2006.

ORTA-SALAZAR, G.; RA, B.; MORALES-SALGADO, F.; SALINAS-STEFANON, E. Inhibition of cardiac Na<sup>+</sup> current by primaquine. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 3, p. 751–763, 2002.

PAHO. **Pan American Health Organization**. Report on the situation of malaria in the Americas, 2000-2015, 2016.

PASQUIÉ, J.-L.; RICHARD, S. Prolongation in QT interval is not predictive of Ca<sup>2+</sup>-dependent arrhythmias: implications for drug safety. **Expert opinion on drug safety**, v. 8, n. 1, p. 57–72, 2009.

PATTEN, R. D. Models of gender differences in cardiovascular disease. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 4, n. 4, p. 227–232, 2007.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PETERS, W.; LI, Z. L.; ROBINSON, B. L.; WARHURST, D. C. The chemotherapy of rodent malaria, XL. The action of artemisinin and related sesquiterpenes. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 80, n. 5, p. 483–489, 1986.

PHILLIPS, M. A.; BURROWS, J. N.; MANYANDO, C.; HUIJSDUIJNEN, R. H. Van; VOORHIS, W. C. Van; WELLS, T. N. C. Malaria. **Nature Reviews**, v. 3, p. 1–24, 2017.

PINES, A.; FISMAN, E. Z.; LEVO, Y.; AVERBUCH, M.; LIDOR, A.; DRORY, Y.;

FINKELSTEIN, A.; HETMAN-PERI, M.; MOSHKOWITZ, M.; BEN-ARI, E.; AYALON, D. The effects of hormone replacement therapy in normal postmenopausal women: Measurements of Doppler-derived parameters of aortic flow. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, n. 3, p. 806–812, 1991.

POLLOCK, J. D.; MAKARYUS, A. N. Physiology, cardiovascular, cardiac cycle. , **National Institutes of Health**, p. 2–5, 2017.

PRABHU, P.; SURYAVANSHI, S.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; PATRAVALE, V. Artemether–lumefantrine nanostructured lipid carriers for oral malaria therapy: enhanced efficacy at reduced dose and dosing frequency. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 1, p. 473–487, 2016.

PRICE, R. I. C.; VUGT, M. V. A. N.; PHAIPUN, L.; LUXEMBURGER, C.; SIMPSON, J.; MCGREADY, R.; KUILE, F. T. E. R.; KHAM, A. M.; CHONGSUPHAJASIDDHI, T. A. N.; WHITE, N. J. Adverse effects in patients with acute falciparum malaria treated with artemisinin derivatives. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 4, p. 547–555, 1999.

QUINTANILLA, J. G.; MORENO, J.; ARCHONDO, T.; ALFONSO-ALMAZÁN, J. M.; LILLO-CASTELLANO, J. M.; USANDIZAGA, E.; GARCÍA-TORRENT, M. J.; RODRÍGUEZ-BOBADA, C.; GONZÁLEZ, P.; BORREGO, L.; CAÑADAS-GODOY, V.; GONZÁLEZ-FERRER, J. J.; PÉREZ-CASTELLANO, N.; PÉREZ-VILLACASTÍN, J.; FILGUEIRAS-RAMA, D. QRS duration reflects underlying changes in conduction velocity during increased intraventricular pressure and heart failure. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2017.

REDFERN, W. S.; CARLSSON, L.; DAVIS, A. S.; LYNCH, W. G.; MACKENZIE, I.; PALETHORPE, S.; SIEGL, P. K. S.; STRANG, I.; SULLIVAN, A. T.; WALLIS, R.; CAMM, A. J.; HAMMOND, T. G. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and *torsade de pointes* for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. **Cardiovascular Research**, v. 58, n. 1, p. 32–45, 2003.

ROY, J., OGER, C., THIREAU, J., ROUSSEL, J., MERCIER-TOUZET, O., FAURE, D., PINOT, E., FARAH, C., TABER, D.F., CRISTOL, J.P., LEE, J.C., LACAMPAGNE, A., GALANO, J.M., DURAND, T., LE GUENNEC, J.Y. Nonenzymatic lipid mediators, neuroprostanes, exert the antiarrhythmic properties of docosahexaenoic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v.86, p. 269-278, 2015.

RUDZIK, A.; HESTER, J.; TANG, A.; STAW, R.; FRIIS, W. **The Benzodiazepines**. New York: Raven Press, p. 285-297, 1973.

SADOH, W. E.; UDUEBOR, J. O. Electrocardiographic changes and troponin T levels in children with severe malaria anemia and heart failure. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 0, n. 5, p. 1–5, 2016.

SALGADO, A. A.; COELHO FILHO, C. D.; REIS, C. A. de S. S. The Role of Echocardiography in Chemotherapy. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 27, n. 1, p. 18–23, 2014.

SANGUINETTI, M. C.; TRISTANI-FIROUZI, M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 463–469, 2006.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4–5, p. 560–575, 2010.

SHAH, S. M. H.; ULLAH, F.; KHAN, S.; SHAH, S. M. M.; DE MATAS, M.; HHUSSAIN, Z.; MINHAS, M. U.; AABDEEL-SALAM, N. M.; AASSI, K. H.; IISREB, M. Smart nanocrystals of artemether: fabrication, characterization, and comparative *in vitro* and *in vivo* antimalarial evaluation. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3837–3850, 2016.

SHAH, U.; JOSHI, G.; SAWANT, K. Improvement in antihypertensive and antianginal effects of felodipine by enhanced absorption from PLGA nanoparticles optimized by factorial design. **Materials Science and Engineering C**, v. 35, n. 1, p. 153–163, 2014.

SILVA, R. P.; AMODEO, C.; RAMIRES, J. A. F. O ventrículo direito e a hipertensão arterial: aspectos ecocardiográficos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 3, p. 313–318, 2002.

SINCLAIR, D.; DONEGAN, S.; DG, L. Artesunate versus quinine for treating severe malaria (Review). **Health (San Francisco)**, n. 4, 2011.

SISOWATH, C.; STRÖMBERG, J.; MÅRTENSSON, A.; MSELLEM, M.; OBONDO, C.; BJÖRKMAN, A.; GIL, J. P. *In vivo* selection of *Plasmodium falciparum* pfmdr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). **The Journal of infectious diseases**, v. 191, n. 6, p. 1014–1017, 2005.

SOUSA-BATISTA, A. J.; POLETTO, F. S.; PHILIPON, C. I. M. S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; ROSSI-BERGMANN, B. Lipid-core nanocapsules increase the oral efficacy of quercetin in cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, v. 144, n. 13, p. 1769–1774, 2017.

SOWUNMI, A.; AKANO, K.; NTADOM, G.; AYEDE, A. I.; IBIRONKE, F. O.; ADEROYEJE, T.; ADEWOYE, E. O.; FATUNMBI, B.; OGUCHE, S.; OKAFOR, H. U.; WATILA, I.; MEREMIKWU, M.; AGOMO, P.; OGALA, W.; AGOMO, C.; FOLARIN, O. A.; GBOTOSHO, G. O.; HAPPI, C. T. Therapeutic efficacy and effects of artemisinin-based combination treatments on uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria-associated anaemia in Nigerian children during seven years of adoption as first-line treatments. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 36, 2017.

SOUZA A. C. M.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SILVEIRA, A. P. A.; ANTUNES, L. R.; RICHARD, S.; GUIMARÃES, H.; GRABE-GUIMARÃES, A. Reduced cardiotoxicity and increased oral efficacy of artemether polymeric nanocapsules in *Plasmodium berghei*-infected mice. **Parasitology**, v.10, p.1-9, 2017.

SPENCER, C. I.; BABA, S.; NAKAMURA, K.; HUA, E. A.; SEARS, M. A. F.; FU, C. C.; ZHANG, J.; BALIJEPALLI, S.; TOMODA, K.; HAYASHI, Y.; LIZARRAGA, P.; WOJCIAK, J.; SCHEINMAN, M. M.; AALTO-SETÄLÄ, K.; MAKIELSKI, J. C.; JANUARY, C. T.; HEALY, K. E.; KAMP, T. J.; YAMANAKA, S.; CONKLIN, B. R. Calcium transients closely reflect prolonged action potentials in iPSC models of inherited cardiac arrhythmia. **Stem Cell Reports**, v. 3, n. 2, p. 269–281, 2014.

SPÓSITO, P. Á. F.; MAZZETI SILVA, A. L.; DE OLIVEIRA FARIA, C.; URBINA, J. A.; POUND-LANA, G.; BAHIA, M. T.; MOSQUEIRA, V. C. F. Ravuconazole self-emulsifying delivery system: in vitro activity against in *Trypanosoma cruzi* amastigotes

and *in vivo* toxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 3785–3799, 2017.

TANG, J.; LI, J.; LI, G.; ZHANG, H.; WANG, L.; LI, D.; DING, J. nanoparticles containing fluorofenidone for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6687–6704, 2017.

TOOVEY, S.; BUSTAMANTE, L. Y.; UHLEMANN, A. C.; EAST, J. M.; KRISHNA, S. Effect of artemisinins and amino alcohol partner antimalarials on mammalian sarcoendoplasmic reticulum calcium adenosine triphosphatase activity. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 103, n. 3, p. 209–213, 2008.

TORRE-AMIONE, G.; KAPADIA, S.; BENEDICT, C.; ORAL, H.; YOUNG, J. B.; MANN, D. L. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). **Journal of the American College of Cardiology**, v. 27, n. 5, p. 1201–1206, 1996.

TRAMPUZ, A.; JEREB, M.; MUZLOVIC, I.; PRABHU, R. M. Clinical review: Severe malaria. **Critical care (London, England)**, v. 7, n. 4, p. 315–323, 2003.

TSE, G.; YAN, B. P.; CHAN, Y. W. F.; TIAN, X. Y.; HUANG, Y. Reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction: The Link with Cardiac Arrhythmogenesis. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 1–11, 2016.

VAN ABEELLEN, J. H. F. Genetics of rearing behavior in mice. **Behavior Genetics**, v. 1, n. 1, p. 71–76, 1970.

VAUTHIER, C.; COUVREUR, P. Nanomedicines: A new approach for the treatment of serious diseases. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, n. 3, p. 223–234, 2007.

VIDAL-DINIZ, A. T. Nanocápsulas de arteméter: caracterização físico-química, cardiotoxicidade, neurotoxicidade e eficácia na malária experimental. **Tese Doutorado, Universidade federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil.**, 2014.

WESCHE, D. L.; SCHUSTER, B. G.; WANG, W. X.; WOOSLEY, R. L. Mechanism of cardiotoxicity of halofantrine. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 67, n.

5, p. 521–529, 2000.

WHITE, N. J. Cardiotoxicity of antimalarial drugs. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 8, p. 549–58, ago. 2007.

WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 297, 2011.

WHITE, N. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T. T.; FAIZ, M. A.; MOKUOLU, O. A.; DONDORP, A. M. Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 22–28, 2013.

WHO. World Health Organization. Treatment of severe malaria. **Guidelines For The Treatment of Malaria**, p. 71–88, 2015.

WHO. World Health Organization. **World Malaria Report**. Geneva; 2016a. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO. World Health Organization. **Artemisinin and Artemisinin-based Combination Therapy Resistance**. n. April, p. 1–8, 2016b.

WHO. World Health Organization. **Recommended Selection Criteria for Procurement of Malaria Rapid Diagnostic Tests**, p. 16, 2016c.

WICKENDEN, a D.; KAPRIELIAN, R.; KASSIRI, Z.; TSOPORIS, J. N.; TSUSHIMA, R.; FISHMAN, G. I.; BACKX, P. H. The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 37, p. 312–323, 1998.

WITCHEL, H. J.; HANCOX, J. C. Familial and acquired long QT syndrome and the cardiac rapid delayed rectifier potassium current. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 10, p. 753–766, 2000.

YANG, B.; LUO, D.-L.; BAO, L.-H. Artemisinin blocks activating and slowly activating K current in guinea pig ventricular myocytes. **Acta Pharmacologica Sinica**, 1998. .

YANG, L.; SHI, L.-J.; YU, J.; ZHANG, Y.-Q. Activation of protein kinase A in the

amygdala modulates anxiety-like behaviors in social defeat exposed mice. **Molecular Brain**, v. 9, p. 3, 2016.

YIN, J. Y.; WANG, H. M.; WANG, Q. J.; DONG, Y. S.; HAN, G.; GUAN, Y. B.; ZHAO, K. Y.; QU, W. S.; YUAN, Y.; GAO, X. X.; JING, S. F.; DING, R. G. Subchronic toxicological study of two artemisinin derivatives in dogs. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–8, 2014.

YOHANNES, A. M.; TEKLEHAIMANOT, A.; BERGQVIST, Y.; RINGWALD, P. Confirmed *vivax* resistance to chloroquine and effectiveness of artemether-lumefantrine for the treatment of *vivax* malaria in Ethiopia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 1, p. 137–140, 2011.

ZASLER, N.; MARTELLI, M.; JACOBS, H. Chapter 32 - Neurobehavioral disorders. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 110, p. 377–388, 2013.

## 7 ANEXOS

8.1 Avaliação do percentual de parasitemia e sobrevivência de camundongos tratados com NC-branca; veículo; ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, nos dias 3, 6, 11, 14, 21 e 30 dias após a infecção.

Tratamento oral	Dose	(% ) Sobreviventes	(% ) Parasitemia						
			3	6	11	14	21	30	
NC-branca	-	0 %	25	27	-	-	-	-	-
Veículo	-	0 %	27	29	-	-	-	-	-
ATM livre	40 mg/kg	50 %	25	21	0	0	0	0	0
	80 mg/kg	66 %	14	10	0	0	0	0	0
	120 mg/kg	100 %	11	7	0	0	0	0	0
ATM-NC	40 mg/kg	83 %	20	13	0	0	0	0	0
	80 mg/kg	83 %	11	7	0	0	0	0	0
	120 mg/kg	66 %	13	7	0	0	0	0	0



## 8.2. Tabelas dos resultados do método de haste girante

Tabela 8.2.1: Análise da coordenação motora e equilíbrio de camundongos não infectados e tratados com NC-branca; veículo; ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, nos tempos de 6 e 24 horas após a última administração oral.

Tratamento oral	Dose	6 horas		24 horas	
		Quedas	Permanência (min)	Quedas	Permanência (min)
NC-branca	-	0	2	0	2
Veículo	-	0	2	0	2
	40 mg/kg	0	2	0	2
ATM livre	80 mg/kg	0	2	0	2
	120 mg/kg	0	2	0	2
	40 mg/kg	0	2	0	2
ATM-NC	80 mg/kg	0	2	0	2
	120 mg/kg	0	2	0	2

Tabela 8.2.2: Análise da coordenação motora e equilíbrio de camundongos infectados e tratados com NC-branca; veículo; ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, nos tempos de 6 e 24 horas após a última administração oral.

Tratamento oral	Dose	6 horas		24 horas	
		Quedas	Permanência (min)	Quedas	Permanência (min)
NC-branca	-	0	2	0	2
Veículo	-	0	2	0	2
	40 mg/kg	0	2	0	2
ATM livre	80 mg/kg	0	2	0	2
	120 mg/kg	0	2	0	2
	40 mg/kg	0	2	0	2
ATM-NC	80 mg/kg	0	2	0	2
	120 mg/kg	0	2	0	2

### 8.3. Tabela dos resultados do método de barra de tração

Tabela 8.3.1: Análise do tônus muscular de camundongos não infectados e tratados com NC-branca; veículo; ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, nos tempos de 6 e 24 horas após a última administração oral.

Tratamento oral	Dose	6 horas		24 horas	
		<i>Capacidade de se segurar</i>		<i>Capacidade de se segurar</i>	
		<b>Patas traseiras</b>	<b>Patas dianteiras</b>	<b>Patas traseiras</b>	<b>Patas dianteiras</b>
NC-branca	-	sim	sim	sim	sim
Veículo	-	sim	sim	sim	sim
ATM livre	40 mg/kg	sim	sim	sim	sim
	80 mg/kg	sim	sim	sim	sim
	120 mg/kg	sim	sim	sim	sim
ATM-NC	40 mg/kg	sim	sim	sim	sim
	80 mg/kg	sim	sim	sim	sim
	120 mg/kg	sim	sim	sim	sim

Tabela 8.3.2: Análise do tônus muscular de camundongos infectados e tratados com NC-branca; veículo; ATM livre e ATM-NC nas doses de 40, 80 e 120 mg/kg, nos tempos de 6 e 24 horas após a última administração oral.

Tratamento oral	Dose	6 horas		24 horas	
		<i>Capacidade de se segurar</i>		<i>Capacidade de se segurar</i>	
		<b>Patas traseiras</b>	<b>Patas dianteiras</b>	<b>Patas traseiras</b>	<b>Patas dianteiras</b>
NC-branca	-	sim	sim	sim	sim
Veículo	-	sim	sim	sim	sim
ATM livre	40 mg/kg	sim	sim	sim	sim
	80 mg/kg	sim	sim	sim	sim
	120 mg/kg	sim	sim	sim	sim
ATM-NC	40 mg/kg	sim	sim	sim	sim
	80 mg/kg	sim	sim	sim	sim
	120 mg/kg	sim	sim	sim	sim

## 8.4. Artigo científico

### 8.4.1. Artigo Científico aceito

Parasitology

cambridge.org/par

#### Research Article

**Cite this article:** Souza ACM, Mosqueira VJ, Silvino AP, Antunes LR, Richard S, Guimarães HN, Grabe-Guimarães A. Reduced cardiotoxicity and increased oral efficacy of artemether polymeric nanocapsules in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Parasitology* <https://doi.org/10.1017/S0033180119002287>

Received: 11 September 2017  
Revised: 3 November 2017  
Accepted: 5 November 2017

#### Key words:

Artemether; cardiotoxicity; electrocardiogram; malaria; polymeric nanocapsules; QT interval

#### Author for correspondence:

Andrea Grabe-Guimarães, E-mail: [agguimara@gmail.com](mailto:agguimara@gmail.com), [grabe@ufc.br](mailto:grabe@ufc.br)

## Reduced cardiotoxicity and increased oral efficacy of artemether polymeric nanocapsules in *Plasmodium berghei*-infected mice

Ana Carolina Moreira Souza<sup>1</sup>, Vanessa Carla Furtado Mosqueira<sup>1</sup>, Ana Paula Amariz Silveira<sup>1</sup>, Lidiane Rodrigues Antunes<sup>1</sup>, Sylvain Richard<sup>2</sup>, Homero Nogueira Guimarães<sup>3</sup> and Andrea Grabe-Guimarães<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmacological Science Program (GPharma), School of Pharmacy, Federal University of Guanabara, Guanabara, Minas Gerais, Brazil; <sup>2</sup>Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles (PHMEXCOP), Unit Montpellier, CHU UMR 5234, INSERM U1048, Montpellier, France and <sup>3</sup>Department of Electrical Engineering, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

#### Abstract

Artemether (ATM) cardiotoxicity, its short half-life and low oral bioavailability are the major limiting factors for its use to treat malaria. The purposes of this work were to study free-ATM and ATM-loaded poly- $\epsilon$ -caprolactone nanocapsules (ATM-NC) cardiotoxicity and oral efficacy on *Plasmodium berghei*-infected mice. ATM-NC was obtained by interfacial polymer deposition and ATM was associated with polymeric NC oily core. For cardiotoxicity evaluation, male black C57BL/6 uninfected or *P. berghei*-infected mice received, by oral route twice daily/4 days, vehicle (sorbitol/carboxymethylcellulose), blank-NC, free-ATM or ATM-NC at doses 40, 80 or 120 mg kg<sup>-1</sup>. Electrocardiogram (ECG) lead II signal was obtained before and after treatment. For ATM efficacy evaluation, female *P. berghei*-infected mice were treated the same way. ATM-NC improved antimalarial *in vivo* efficacy and reduced mice mortality. Free-ATM induced significantly QT and QTc intervals prolongation. ATM-NC (120 mg kg<sup>-1</sup>) given to uninfected mice reduced QT and QTc intervals prolongation 34 and 30%, respectively, compared with free-ATM. ATM-NC given to infected mice also reduced QT and QTc intervals prolongation, 28 and 27%, respectively. For the first time, the study showed a nanocarrier reducing cardiotoxicity of ATM given by oral route and it was more effective against *P. berghei* than free-ATM as monotherapy.

#### Introduction

In 2015, there were 212 million new cases of malaria and 429 000 deaths (WHO, 2016a). Malaria is caused by a protozoan of genus *Plasmodium* sp. and *Plasmodium falciparum* is the most pathogenic species causing severe form and high mortality rate. Clinical manifestation of severe malaria can include damages on central nervous system (Jetro *et al.* 2005), severe anaemia (Stoute *et al.* 2003), kidney failure (Plewes *et al.* 2017), pulmonary dysfunction (Maguire *et al.* 2008), disseminated intravascular coagulation, hepatic dysfunction and shock (Jain *et al.* 2016), and also cardiovascular abnormalities (Costanzo *et al.* 2011). There are different pathways which *P. falciparum* infection can trigger cardiac disorders. Parasitized red blood cells can occlude myocardial capillaries, leading to ischaemic cardiomyopathy and dilated heart (Molosen *et al.* 2001; Costanzo *et al.* 2011); high levels of tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) may play a role in inflammatory process at heart, impairing myocardial function (Torre-Amione *et al.* 1996); and hypoxia induced by severe anaemia may cause ischaemic myocardial injury with prolonged QTc interval of electrocardiogram (ECG), as frequently observed in children (Sadeh and Uthaber, 2016).

In addition to cardiovascular complications inherent to *P. falciparum* infection, currently available antimalarial drugs may aggravate and trigger additional cardiotoxic effects. Hypotension was observed with quinine and quinidine (Mecca *et al.* 1980) and chloroquine caused cardiac conduction disorders and hypotension leading to sudden death (Looussouwan *et al.* 1986). Prolonged PR, QRS and QTc intervals of ECG were induced by amodiaquine (Ngouesse *et al.* 2001) and halofantrine (Lette *et al.* 2007). Artemisinin derivatives caused QT and QTc interval prolongation (Clasen *et al.* 1999) and Torsade de Pointes (TdP), which was observed in dogs specifically for ATM (Yin *et al.* 2014).

According to WHO (2016b), malaria treatment should be performed with antimalarial drugs combination therapy, including artemisinin derivatives, in order to reduce *P. falciparum* resistance. Semi-synthetic derivatives of artemisinin, such as artesunate, artemether (ATM), arteether and dihydroartemisinin significantly reduce parasitaemia and they are used against resistant strains of *P. falciparum* as artemisinin-based combination therapy (ACT) (WHO, 2016b). Despite its effectiveness as antimalarial by schizonticide and gametocyte activities (Branst *et al.* 1988), ATM is used in ACT, mainly with lumefantrine, but presents short half-life (Silamut *et al.* 2003), significant general toxicity (Differth and Kaina, 2010), including cardiotoxicity (Yin *et al.* 2014). Thus, investigation of artemisinin derivatives toxicological profile,

© Cambridge University Press 2017

CAMBRIDGE  
UNIVERSITY PRESS

Downloaded from <https://www.cambridge.org/core>. University of New England, on 11 Dec 2017 at 14:52:52, subject to the Cambridge Core terms of use, available at <https://www.cambridge.org/core/terms>. <https://doi.org/10.1017/S0033180119002287>

particularly its cardiotoxicity, is a theme of special interest in chemotherapy of life threatening diseases such as malaria.

Considering that new safer and simple strategies to improve the efficacy of malaria treatment is an urgent demand, new pharmaceutical formulations to reduce the toxicity of the current used drugs and to increase their efficacy require investigation. Nanostructured lipid carriers were already developed to enhance the oral efficacy of ATM lamfantrine and was able to complete parasite clearance with a reduced daily dose (Prabhu et al. 2016). Another study was conducted for the development of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) containing ATM, with significant absorption and permeation increases and also, *P. berghei* parasitaemia reduction (Tripathy et al. 2012). Polymeric nanocapsules (NC) have been proved to be a useful tool to treat parasitic diseases, increasing efficacy of drugs by controlling the release into the body (Mosqueira et al. 2004), protecting sesquiterpene lactone from degradation (Beaunquino et al. 2017a), and dramatically reducing their toxic effects by parenteral and oral routes (Leite et al. 2007; Beaunquino et al. 2017b). NC are polymeric drug nanocarriers that vary from 100 to 400 nm in size and have a vesicular structure with the polymeric wall surrounding an oily cavity where hydrophobic drugs can be dissolved (Legrand et al. 1999). To the best of our knowledge, a nanocarrier containing ATM modifying or reducing cardiotoxicity was not evaluated or reported until now. Thus, the present work investigated an experimental malaria pharmacotherapy to improve oral efficacy of ATM and to avoid or reduce its cardiovascular toxic effects. NC containing ATM (ATM-NC) was prepared to evaluate the oral treatment efficacy against *P. berghei* infection in mice and cardiovascular safety, using the analyses of ECG signal of uninfected and infected mice.

## Materials and methods

### Materials

Dihydroartemisinin methyl ether (ATM), poly-ε-caprolactone (PCL), poloxamer 188, carboxymethylcellulose sodic, and HPLC grade acetone were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA); sorbitol (aqueous solution 70%, Synth, Brazil). Paluther® intramuscular parenteral formulation was granted by the National Malaria Control Program Ministry of Health, Brazil, that contains 80 mg mL<sup>-1</sup> of ATM dissolved in sesame oil. Soy lecithin at ~75% phosphatidylcholine (Epikuron™170) was a gift from Cargill (Germany). Miglyol® 812N was purchased from Sasol Germany GmbH. MilliQ water was purified using a Simplicity® System (Millipore, Bedford, USA) and used throughout experiments.

### ATM formulations preparation

Blank NC and ATM NC were prepared by the interfacial deposition method of preformed polymer followed by solvent displacement, as previously described by Feasi et al. (1989). Briefly, to prepare 2.0 mL of ATM NC it was used an organic phase containing 24 mg of PCL, 30 mg of soy lecithin, 100 µL of Paluther® (80 mg mL<sup>-1</sup>), 2.0 mL of acetone and an aqueous phase (8 mL) containing 30 mg of poloxamer 188. After complete dissolution of all components in each phase, the organic phase was poured, into aqueous phase using a 3 mL syringe at 60 mL min<sup>-1</sup> flow rate. NC formed instantly and the dispersion was maintained under agitation during 10 min. Then solvents were evaporated under reduced pressure (Heidolph Rotary Evaporator Instruments, Germany) until small volumes of NC is obtained. The formulation volume was measured in a calibrated test tube and the volume completed with MilliQ water up to 2 mL final volume to

obtain the final concentration of 4 mg mL<sup>-1</sup> of ATM in an NC colloidal suspension. To prepare blank NC it was used the same procedure in absence of ATM using 100 µL of Miglyol 812N as NC oily core. An oral dosage form of the free ATM suspension was prepared mixing 0.09 g of ATM with 0.3 g of carboxymethylcellulose and 2.0 mL of 70% w/v sorbitol solution that was further dispersed in 15 mL of water. The vehicle was prepared same way in the absence of ATM. This suspension was freshly prepared on the day of treatment beginning and protected from light. Free ATM solution and ATM NC formulations were maintained at controlled temperature protected from direct light.

### NC characterization: size and zeta potential

Mean hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential of NC were determined using Zetasizer NanoZS equipment (Malvern Instruments, UK), using the dynamic light scattering technique (DLS) and zeta potential DLS coupled to microelectrophoresis. Zeta potential is a measure of the magnitude of the electrostatic or charge repulsion/attraction between particles in the aqueous medium. The measurements were performed at 25 °C with samples previously diluted 1000-fold in water, using three distinct formulations and in triplicate. The results are expressed as the mean ± standard deviation (s.d.).

### Animals

Male and female black C57BL/6 mice aged 6–8 weeks (20–22 g) were used. The experimental protocols were approved by Ethical Committee of Federal University of Ouro Preto under protocol number 2014/14. All experiments were in compliance with the guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The animals were maintained under environmental conditions of 12 h day/night cycles, room temperature 22 ± 2 °C, standard diet and water *ad libitum*. Female mice were used only to evaluate ATM antimalarial efficacy, as performed before (Khoury et al. 2017).

### Treatment protocol

Male mice were distributed into two groups of uninfected and *Plasmodium berghei* infected animals. Mice were treated with: (1) vehicle (n = 6), (2) blank NC (n = 6), (3) free ATM at doses 40, 80 or 120 mg kg<sup>-1</sup> per administration (n = 6 each) or (4) ATM-NC at doses 40, 80 or 120 mg kg<sup>-1</sup> per administration (n = 6 each). Treatments were given by oral route, administered by gavage, twice daily (every 12 h), during 4 days, totaling eight administrations per dose. For infected mice, treatment started at the 4th day after infection to evaluate the antimalarial efficacy and ECG parameters, respectively to female and male mice.

### In vivo antimalarial efficacy

Female mice were infected with an intravenous inoculum of 1 × 10<sup>6</sup> red blood cells (RBCs) infected with *P. berghei* NK 65 strain diluted in 0.2 mL of saline. The treatment was performed as described before (Peters et al. 1986), with modifications. Mice were considered infected after established infection with parasitaemia higher than 25% (three days), and treatment was initiated as described in treatment protocol (n = 6 per group at the beginning). Parasitaemia was monitored at day zero (before infection) and at 3, 6, 11, 14, 21, 30 days after infection, considering the day of infection as day one. Blood samples from mice tail vein were used for the direct parasitaemia analysis in Giemsa stained thin blood smears. Percentage of parasitaemia (% of infected

RBCs) was determined microscopically at 1000x magnification, by examining a minimum of 3000 cells, for each mouse.

#### ATM general toxicity evaluation

General toxicity of ATM, in free or NC dosage form, was evaluated using the % survival of uninfected mice treated with the highest used ATM dose. Mice were treated as described in treatment protocol with vehicle, blank NC, free-ATM ( $120 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or ATM-NC ( $120 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ( $n=6$ , each group). Survival was evaluated during 30 consecutive days of mice observation.

#### ECG signal

A total of 16 experimental groups of male uninfected and *P. berghei* infected mice were treated as described in the protocol. For ECG signal record, mice were anaesthetized with ketamine ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and xilasin ( $14 \text{ mg kg}^{-1}$ ), intraperitoneally. ECG signals were obtained before (baseline) any procedure, and 2, 6 and 24 h after the end of treatment for uninfected mice. Since for uninfected mice main electrocardiographic alterations were at 6 and 24 h after last free-ATM dose administration, for the infected mice ECG was obtained only at baseline and these two times.

Limb lead II ECG was continuously recorded during 5 min using subcutaneous stainless steel needle electrodes, connected by a shielded cable to a biopotential amplifier with a bandpass of 0.5–100 Hz, and sampled at 1200 Hz with an A/D conversion board of 16 bits resolution (DaqBoard/2001, JOTech, USA). From raw ECG records, three segments of 2 s were randomly extracted, and in these waveforms all cardiovascular parameters were measured and averaged to generate a single value each. Figure 2A shows the waves P, R, S and T of an ECG. The measured ECG parameters were RR, PR, QRS, QT intervals (Fig. 2B). RR interval was measured between two successive R-waves, determining a complete cardiac cycle, and used to calculate the heart rate (HR) in beats per minute (bpm), where  $\text{HR} = 60/\text{RR}$ . PR interval was measured from the beginning of P wave to the onset of QRS complex, meaning the interval between the onset of atrial

depolarization and the onset of ventricular depolarization. QRS interval was measured between the start of R wave and the end of S wave and represents the ventricular depolarization. QT interval was measured between the onset of QRS complex and the end of T wave, which represents a complete ventricular systole, including depolarization and repolarization (Farrag et al. 2011). In addition to the measured intervals, the QTc interval was calculated, which is the QT interval corrected by HR by the Fridericia's formulae ( $\text{QTc} = \text{QT}/\text{RR}^{0.33}$ ) and it is an improved marker (with less dependence on HR) of cardiac arrhythmia risk. It should be noted that despite the lack of Q-wave in mice, it still appears in the definition of intervals, such as QRS, QT (and QTc), where the beginning of Q-wave must be replaced by the beginning of R-wave. ECG intervals are expressed as absolute values (mean  $\pm$  S.E.M.) in seconds, except for Fig. 2 where they are shown in ms.

#### Statistical analysis

ECG and area under the curve of parasitaemia were analysed using One-way ANOVA followed by Tukey's post test. For comparison of percentual survival it was used Kaplan-Meier to estimate Cox regression. Graph Pad Prism<sup>®</sup> 5.0 (Graph Pad Software, USA) software was used as a tool for statistical analysis. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). A *P* value below 0.05 was considered statistically significant.

#### Results

##### NC characterization

ATM-NC were previously developed and characterized in detail by our group (Vidal-Diniz, 2014; unpublished data). Encapsulation efficiency (EE) was >90% at concentration of  $40 \text{ mg mL}^{-1}$ . Table 1 shows mean size, PDI and zeta potential of blank NC and ATM-NC. NC were monodisperse in size (PDI <0.3) and presented negative zeta potential values at NC surface, which maintains colloidal stability by electrostatic repulsion, preventing particles aggregation. ATM reduced slightly the surface charge in modulus and increased NC mean size,

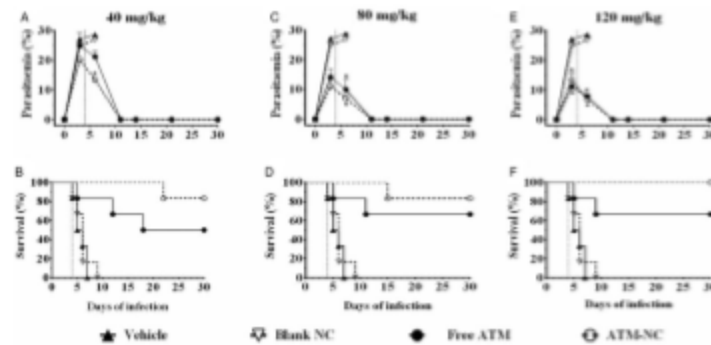


Fig. 3. Parasitaemia and survival rate until 30th day of infection with *Plasmodium berghei*. Percentual of parasitaemia and survival rate of infected mice after treatment with free-ATM, ATM-NC or control solution (vehicle or blank NC), in and 1) 40 mg kg<sup>-1</sup>; 2) 80 mg kg<sup>-1</sup>; 3) 120 mg kg<sup>-1</sup>. Vertical dashed lines indicate first day treatment. \**P* < 0.05. ANOVA followed by Tukey's post hoc test compared with vehicle treated mice.

RBCs) was determined microscopically at 1000 $\times$  magnification, by examining a minimum of 3000 cells, for each mouse.

#### ATM general toxicity evaluation

General toxicity of ATM, in free or NC dosage form, was evaluated using the % survival of uninfected mice treated with the highest used ATM dose. Mice were treated as described in treatment protocol with vehicle, blank NC, free ATM (120 mg kg<sup>-1</sup>) or ATM-NC (120 mg kg<sup>-1</sup>) ( $n = 6$ , each group). Survival was evaluated during 30 consecutive days of mice observation.

#### ECG signal

A total of 16 experimental groups of male uninfected and *P. berghei* infected mice were treated as described in the protocol. For ECG signal record, mice were anaesthetized with ketamine (100 mg kg<sup>-1</sup>) and xilasin (14 mg kg<sup>-1</sup>), intraperitoneally. ECG signals were obtained before (baseline) any procedure, and 2, 6 and 24 h after the end of treatment for uninfected mice. Since for uninfected mice main electrocardiographic alterations were at 6 and 24 h after last free ATM dose administration, for the infected mice ECG was obtained only at baseline and these two times.

Limb lead II ECG was continuously recorded during 5 min using subcutaneous stainless steel needle electrodes, connected by a shielded cable to a biopotential amplifier with a bandpass of 0.5–100 Hz, and sampled at 1200 Hz with an A/D conversion board of 16 bits resolution (DaqBoard2001, IOTech, USA). From raw ECG records, three segments of 2 s were randomly extracted, and in these waveforms all cardiovascular parameters were measured and averaged to generate a single value each. Figure 2A shows the waves P, R, S and T of an ECG. The measured ECG parameters were RR, PR, QRS, QT intervals (Fig. 2B). RR interval was measured between two successive R waves, determining a complete cardiac cycle, and used to calculate the heart rate (HR) in beats per minute (bpm), where  $HR = 60/RR$ . PR interval was measured from the beginning of P wave to the onset of QRS complex, meaning the interval between the onset of atrial

depolarization and the onset of ventricular depolarization. QRS interval was measured between the start of R wave and the end of S wave and represents the ventricular depolarization. QT interval was measured between the onset of QRS complex and the end of T wave, which represents a complete ventricular systole, including depolarization and repolarization (Farrag *et al.* 2011). In addition to the measured intervals, the QTc interval was calculated, which is the QT interval corrected by HR by the Fridericia's formulae ( $QTc = QT/RR^{0.33}$ ) and it is an improved marker (with less dependence on HR) of cardiac arrhythmia risk. It should be noted that despite the lack of Q wave in mice, it still appears in the definition of intervals, such as QRS, QT (and QTc), where the beginning of Q wave must be replaced by the beginning of R wave. ECG intervals are expressed as absolute values (mean  $\pm$  S.E.M.) in seconds, except for Fig. 2 where they are shown in ms.

#### Statistical analysis

ECG and area under the curve of parasitaemia were analysed using One-way ANOVA followed by Tukey's *post test*. For comparison of percentual survival it was used Kaplan-Meier to estimate Cox regression. Graph Pad Prism<sup>®</sup> 5.0 (Graph Pad Software, USA) software was used as a tool for statistical analysis. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). A *P* value below 0.05 was considered statistically significant.

#### Results

##### NC characterization

ATM-NC were previously developed and characterized in detail by our group (Vidal-Dinis, 2014; unpublished data). Encapsulation efficiency (EE) was >90% at concentration of 4.0 mg ml<sup>-1</sup>. Table 1 shows mean size, PDI and zeta potential of blank NC and ATM-NC. NC were monodisperse in size (PDI <0.3) and presented negative zeta potential values at NC surface, which maintains colloidal stability by electrostatic repulsion, preventing particles aggregation. ATM reduced slightly the surface charge in modulus and increased NC mean size,

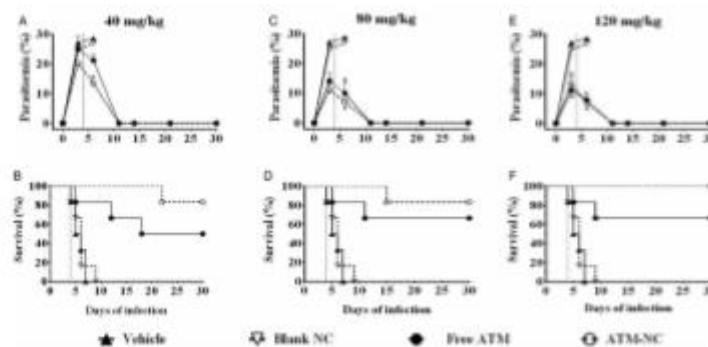


Fig. 3. Parasitaemia and survival rate until 30th day of infection with *Plasmodium berghei*. Percentual of parasitaemia and survival rate of infected mice after treatment with free ATM, ATM-NC or control solutions (vehicle or blank NC). (A and B) 40 mg kg<sup>-1</sup>; (C and D) 80 mg kg<sup>-1</sup>; (E and F) 120 mg kg<sup>-1</sup>. Vertical dashed lines indicate first day treatment. \**P* < 0.05. ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test compared with vehicle treated mice.

Table 1. Physicochemical characteristics of nanocapsules formulation

Nanocapsules <sup>a</sup>	Mean size ± s.d. (nm)	PDI ± s.d.	Zeta potential ± s.d. (mV)
Blank NC	150 ± 1.045	0.17 ± 0.040	-56.3 ± 1.02
ATM-NC	254.5 ± 3.84	0.25 ± 0.030	-50.2 ± 0.74

<sup>a</sup> Poly-ε-caprolactone (PCL) nanocapsules (NC); ATM-NC, artesunate in NC (4 mg mL<sup>-1</sup>); PDI, Polydispersity Index; s.d., standard deviation. Measurement after dilution 1:100 in 0.05M water (n = 3).

evidencing its association with the oily core of NC. No ATM precipitation was observed until three months after preparation stored at 4 °C. Considering these physicochemical characteristics, NC formulations were considered suitable for *in vivo* studies in mice model.

#### Survival and antimarial efficacy of free-ATM and ATM-NC

At all three ATM doses, parasitaemia was reduced and survival was increased for both formulations, free and NC, compared with control groups, vehicle and blank NC (Fig. 1). Parasitaemia reduction at 6th day was about 63% after oral treatment with free ATM and about 69% after treatment with ATM-NC, both at dose 120 mg kg<sup>-1</sup>, when compared with respective control groups (Fig. 1B). ATM-NC 40 mg kg<sup>-1</sup> was more efficient than free ATM in reducing parasite number at the 6th day after infection (Fig. 1A). From the 11th day, efficacy was similar for three ATM doses, free and NC (Fig. 1A, C and E). Until the 9th day after infection (Fig. 1B, D and F), all animals treated with vehicle or blank NC went to death. The areas under the curve

comparison using the Kaplan-Meier survival estimator were not significantly different ( $P > 0.05$ ) between 40 and 80 mg kg<sup>-1</sup> for ATM-NC in treated infected mice.

For ATM toxicity evaluation and its influence on % survival of uninfected animals, none of the mice treated with vehicle, blank NC or ATM-NC went to death (100% survival), indicating the absence of toxic effect that could be related to pharmaceutical excipient toxicity or ATM delivered by NC. However, 50% of mice treated with free ATM (120 mg kg<sup>-1</sup>) went to death after 4 days of treatment, indicating high toxicity. Encapsulation of ATM abolished its toxicity even with the highest dose.

#### Cardiovascular parameters

Figure 2 shows representative ECG segments of uninfected and *P. berghei* infected mice treated with blank NC, free-ATM or ATM-NC at 120 mg kg<sup>-1</sup> 24 h after the last oral dose administration.

For uninfected mice, PR (Fig. 3A-C) and QRS (Fig. 4A-C) intervals were similar for all groups. For *P. berghei* infected mice, PR interval showed a significant increase (74%), related to vehicle treatment, 24 h after the last dose with free ATM 120 mg kg<sup>-1</sup> (Fig. 3E). QRS interval was significantly higher (Fig. 4) for infected mice at 6 (20%) and 24 h (15%) after treatment with vehicle (Fig. 4D-F), compared with uninfected mice at same time (Fig. 4A-C). QRS interval also increased (Fig. 4D-F) in infected mice treated with free ATM at dose 120 mg kg<sup>-1</sup>. These alterations of PR and QRS intervals were not observed for ATM-NC treatment of infected mice. This effect strongly shows the influence of malaria, caused by *P. berghei*, causing a cardiac electrophysiological disturbance, beyond free-ATM toxicity.

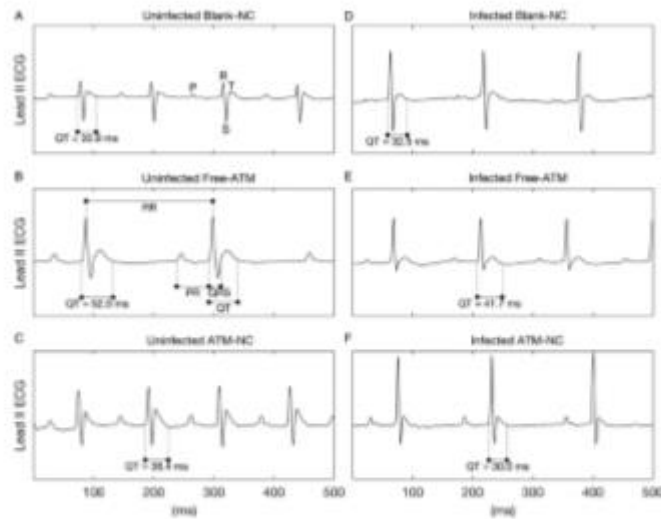


Fig. 2. Representative ECG records of uninfected and *Plasmodium berghei* infected mice. ECG records showing the effects of treatment with blank NC (A, D), free-ATM (B and E), and ATM-NC (C, F), both 120 mg kg<sup>-1</sup>, on QT interval of uninfected (A-C) and infected mice (D-F). Panel (D) shows the waves P, R, S and T, while (E) shows the intervals PR, PQ, QRS and QT.

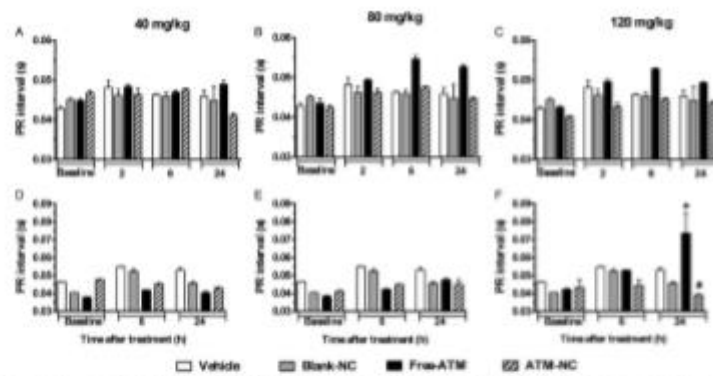


Fig. 3. PR interval (mean  $\pm$  s.e.m.) of ECG of uninfected and *P. berghei* infected mice. Effect of ATM on PR interval 2, 6 and 24 h for uninfected mice, 6 and 24 h for infected mice, after low oral dose treatment with free-ATM, ATM encapsulated in nanocapsules (ATM-NC), both at 40, 80 and 120 mg kg<sup>-1</sup>, or control solutions (vehicle or blank NC). (A-C) Uninfected mice. (D-F) Infected mice. \**P* < 0.05 compared with vehicle and blank NC, †*P* < 0.05 compared with free-ATM. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Analysis of QT (Fig. 5A-C) and QTc (Fig. 5D-F) intervals of uninfected mice compared with control groups showed significant increase after free-ATM, mainly for 120 mg kg<sup>-1</sup>, such as 55 and 41%, respectively, at 24 h. ATM-NC did not cause significant increases in QT and QTc intervals on uninfected mice (Fig. 5A-F). ATM-NC (120 mg kg<sup>-1</sup>) given to uninfected mice reduced 34 and 30%, respectively, to QT and QTc intervals prolongation, compared with free-ATM. Although some bradycardia was observed for free-ATM and ATM-NC, there was no difference of HR. For uninfected mice treated with blank-NC, HR was about 308  $\pm$  32, 360  $\pm$  33 and 396  $\pm$  31; for free-ATM, HR was 284  $\pm$  57, 252  $\pm$  29 and 285  $\pm$  39; for ATM-NC, HR was

279  $\pm$  17, 347  $\pm$  29 and 335  $\pm$  27, respectively, at 2, 6 and 24 h after treatment with 120 mg kg<sup>-1</sup>, all normal values for anaesthetized mice. For *P. berghei* infected mice treated with free-ATM, QT and QTc intervals also increased significantly (Fig. 5G-I). QT interval (Fig. 5I) prolongation after 120 mg kg<sup>-1</sup> was 53%, while QTc interval (Fig. 5L) increased 31%, both after 24 h. ATM-NC given to infected mice also reduced QT and QTc intervals prolongation, 28 and 27%, respectively, compared with free-ATM (Fig. 5G-I). At all doses, ATM-NC did not induce significant alterations of any ECG parameter, showing clearly the cardioprotection provided by NC, eliminating ATM toxicity.

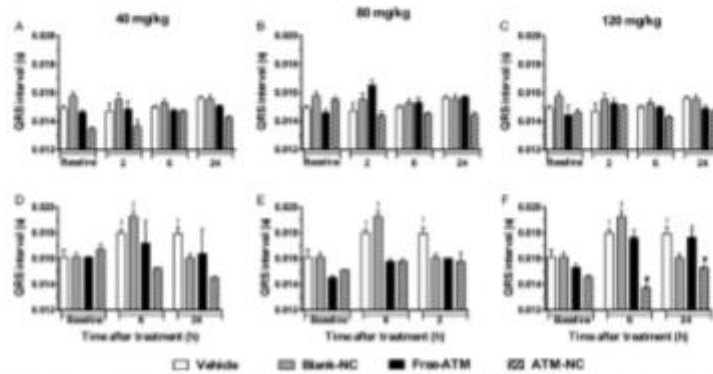


Fig. 4. QRS interval (mean  $\pm$  s.e.m.) of ECG of uninfected and *P. berghei* infected mice. Effect of ATM on QRS interval 2, 6 and 24 h for uninfected mice, 6 and 24 h for infected mice, after low oral dose treatment with free-ATM, ATM encapsulated in nanocapsules (ATM-NC), both at 40, 80 and 120 mg kg<sup>-1</sup>, or control solutions (vehicle or blank NC). (A-C) Uninfected mice. (D-F) Infected mice. \**P* < 0.05 compared with vehicle and blank NC, †*P* < 0.05 compared with free-ATM. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.



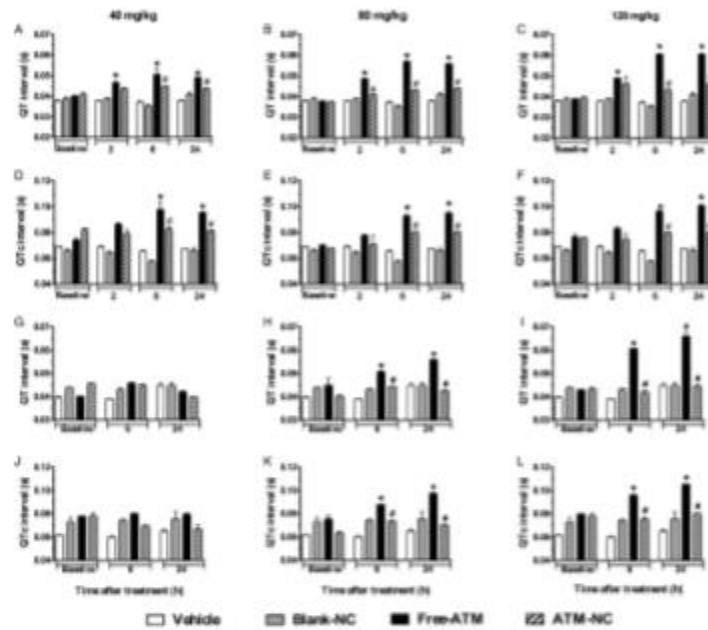


Fig. 3. QT and QTc intervals (mean  $\pm$  s.e.) of ECG of uninfected and *P. berghei*-infected mice. Effect of ATM on QT and QTc intervals 2, 6 and 24 h for uninfected mice, 6 and 24 h for infected mice, after oral dose treatment with free ATM (40, 80 and 120 mg kg<sup>-1</sup>), ATM encapsulated in nanocapsules (ATM-NC, 40, 80 and 120 mg kg<sup>-1</sup>) or control solution (vehicle or Blank-NC). [A-C] QT interval for uninfected mice, [D-F] QTc interval for uninfected mice, [G-I] QT interval for infected mice, [J-L] QTc interval for infected mice. \**P* < 0.05 compared with vehicle and blank NC, \*\**P* < 0.05 compared with free ATM. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

### Discussion

The present work shows that ATM conveyed in nanocapsules (ATM-NC) administered orally can clearly reduce *in vivo* cardiotoxicity mainly by preventing QT interval prolongation, both in uninfected and *P. berghei*-infected mice. Even at the high doses used in this study, encapsulation completely prevented cardiotoxic effects of free ATM. Additionally, the efficacy of ATM-NC against *P. berghei* was at least as good as free-ATM. In order to increase the efficacy of antimalarial drugs and reduce their adverse effects, several studies have shown the use of nanocarriers as a valorous strategy for malaria therapy improvement (Aditya et al. 2010; Pralbu et al. 2016). Polymeric NC present some advantages, as easy one step production, biocompatibility and biodegradability (Legrand et al. 1999), high ability to encapsulate ATM (Vidal-Dinis, 2014), low size polydispersity and physico-chemical stability (Legrand et al. 1999). Our results of ATM are in accordance with encapsulation of a lipophilic sesquiterpene lactone, lycoperside, which was also encapsulated with EE higher than 95% with good stability (Branquinho et al. 2017a).

ATM-NC, at all doses used in our study, increased survival of infected mice and significantly reduced parasite number. It was observed complete parasite clearance as expected with such

high doses. This effect could be attributed to ATM bioavailability changes. Our results are in accordance with previous findings that showed similar polymeric NC able to alter the pharmacokinetics of lipophilic molecules, to improve drug body exposure and increase efficacy (Mosqueira et al. 2004; Branquinho et al. 2017a). Free ATM has prompt but incomplete absorption by the oral route, with only 40% of bioavailability (Karlwang et al. 1997). An important aspect to highlight is the ATM-NC efficacy by oral route as liquid dosage form, since this route is the most convenient and feasible to use in low income countries, mainly when we consider that severe malaria reaches particularly children (WHO, 2016).

ATM doses used in the present work were based on a previous study (Beckman et al. 2015), that reported neurotoxicity in juvenile rats by different protocols using doses from 20 to 200 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for 7 days, by the oral route. They showed that doses higher than 30 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> increased mortality, renal necrosis and brain haemorrhage. Thus, the doses 40, 80 and 120 mg kg<sup>-1</sup> of ATM were chosen for evaluation of cardiotoxicity and efficacy.

Other studies reported about another nanocarrier that allows a considerable bioavailability increase. ATM in nanosuspension drug delivery system was able to increase oral bioavailability in 2.6 fold (Laxmi et al. 2015). Oral administration of beta ATM in

microemulsifying drug delivery system (Mandavapala *et al.* 2008) and liposomal formulation (Chitmasuka *et al.* 2002) were effective in reducing the number of *P. berghei* and *P. chabaudi*, respectively.

We hypothesized that NC could reduce free ATM induced cardiotoxicity, in healthy and malaria mice models. ECG is an important tool used both for diagnosis of cardiac diseases (Suzawicz *et al.* 2007) and for detection of cardiotoxic effects caused by drugs (Salvi *et al.* 2010; Farraj *et al.* 2011). QT interval prolongation is a major alteration of ECG indicative of drug toxicity (Crumb and Cavens, 1999; Redfern *et al.* 2003). It is associated with malignant ventricular tachyarrhythmia and susceptibility to TdP, which may lead to sudden death (Redfern *et al.* 2003). Male mice model were used for cardiovascular studies because, according to Patten (2007), female animals are less sensitive to cardiovascular alterations, since ovarian hormones may be important in reducing the risk of vascular disease. ATM NC was able to prevent QT interval prolongation observed with free ATM in both uninfected and *P. berghei*-infected mice, reducing cardiac risk. Infection itself caused QRS enlargement, indicating cardiac depolarisation abnormalities (Bassano and Mecurio, 2013), an effect reported for malaria model for the first time here. No previous work reported a reduction of cardiotoxicity through association with nanocarriers, as we observed herein.

Only for infected mice, PR interval increased at 24 h after treatment with a higher dose of free ATM, but not with ATM-NC. PR interval prolongation refers to atrial alterations, a possible onset of heart failure and atrial fibrillation (Holmgren *et al.* 2015). Since infected mice treatment with vehicle and uninfected mice treatment with free ATM did not induce PR interval alterations, we should hypothesize that combination of malaria effects and ATM toxicity could induce this cardiac disturbance.

Reduction or absence of electrocardiographic alterations after oral administration of ATM NC was also probably due to the ability of nanocarriers to modify the distribution of entrapped drug into body, as discussed before. It was very likely that there was a slow release of ATM into the bloodstream, thus reducing the availability of ATM to get into cardiac tissue as recently observed with another sesquiterpene lactone (Branquinho *et al.* 2017a, b). In addition, less ATM is available to be metabolized to dihydroartemisinin, which is potentially cardiotoxic as proposed before (Aditya *et al.* 2010; Manning *et al.* 2014). *In vitro* study (Borsini *et al.* 2012) showed that dihydroartemisinin in different concentrations, and associated with piperazine, can cause a significant hERG channel block. The hERG gene codes a subunit of the potassium channel that controls the repolarizing current  $I_{Kr}$  (rapid delayed rectifier potassium current). Its drug-induced blockade is related to QT interval prolongation, increasing cardiac risk to sudden death (Fornini and Fossa, 2003).

The nanometric size of NC is an important characteristic for oral administration and uptake by intestinal cells (McCleau *et al.* 1998). In this context, two events are possible: (1) NC entrapped in the villi network may be retained in the intestine longer than macroscopic oral dosage forms (e.g. capsules or tablets); or (2) NC might be internalized by the intestinal cells, which allows drug pharmacokinetics modification and efficient delivery at target sites in the body. It was demonstrated that orally absorbed NC altered the elimination and distribution of doxetaxel, as shown in the organ biodistribution rat study, due to their reinforced coating, while transiting through the enterocytes by surface adsorption of apolipoproteins and phospholipids (Alshb Qadri *et al.* 2013). Oral administration of doxetaxel NC modifies the pharmacokinetic profile of doxetaxel and improved anticancer activity when compared with free form intravenous administration. In addition, De Mello *et al.* (2016) showed that

orally administration of sensitive sesquiterpene lactones NC was more effective in combating parasitic disease than free molecule, probably by protecting the drug from degradation. For different drugs having a short half life, such as ATM, nanocapsulation and oral administration have advantages such as protection from ATM degradation in the gastrointestinal tract (GIT) and upon absorption of NC provides changes in plasma profile, increasing bioavailability (Galindo-Rodríguez *et al.* 2005). ATM is not a stable molecule in the GIT. However, our results showed that ATM NC exhibit efficacy after oral administration, indicating that NC uptake is probable. NC is supposed to be absorbed gradually and release the free form into the blood at a slow rate, enough to kill the parasites but, at the same time, reducing ATM exposure to the heart tissue.

Thus experimental data showed here provide strong results of ATM NC ability to reduce cardiotoxicity and give efficacy improvement against *P. berghei* monotherapy. Our mouse option for therapeutic improvement of ATM against severe malaria was provided, since ATM NC administered orally showed to be effective and non-toxic against experimental malaria model *in vivo*.

**Acknowledgements.** The authors would like to thank also Ministry of Health (Programa Nacional de Controle de Malária Brasil) for a donation of "Palatier" ampoules. VCF Mosquito is a research fellow of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. A.C.M. Sampa thanks her scholarship grant from CAPES.

**Financial Support.** This work was supported by the Bilateral Research Collaboration CAPES-COPECUB between Brazil and France (no. 780/03). This work was also supported by the NANORHONG Network (0002/14 and #4011), APQ 01510/14 and PPM grants (F 00432/13, #CDS-PPM-00481/13) from FAPIMIG, Minas Gerais, Brazil.

**Conflict of Interest Statement.** The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## References

- Aditya NP, Patidar S, Madhusudhan B, Marthy RSR and Sontsi BR (2010) Artemisinin loaded lipid nanoparticles produced by modified thin film hydration: pharmacokinetic, toxicological and *in vitro* anti-malarial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 40, 448–455.
- Alshb Qadri S, Karia N, Nourmoudi A, Scherb D, Tolson Y, Nasir T and Boulik S (2013) Oral delivery system prolongs blood circulation of doxetaxel nanocapsules via lymphatic absorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(43), 17498–17503.
- Bassano PP and Mecurio G (2013) QRS complex enlargement as a predictor of ventricular arrhythmias in patients affected by surgically treated strategy of Fabry: a comprehensive literature review and historical overview. *EBM Cardiology* 2013, 202508.
- Beckman DA, Yonemoff M and Ball MT (2013) Neurotoxic assessment of artemether in juvenile rats. *Birth Defects Research Part B – Developmental and Reproductive Toxicology* 98, 183–195.
- Borsini F, Cruzat W, Pao S, Ubben D, Wille B, Yan GX and Franck-Borstmann C (2012) *In vitro* cardiotoxic effects of dihydroartemisinin-piperazine combination compared with other antimalarials. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 56, 3261–3270.
- Branquinho RT, Pened-Lima G, Marques MM, Sade-Guimarães DA, Vilela JMC, Spangler AM, de Lima M and Mosquito VCF (2017a) Increased body exposure to new anti-trypansomal through nanocapsulation. *Scientific Reports* 7, 1–12a.
- Branquinho RT, Roy J, Farah C, Garcia GM, Almeida E, Le Guennec JY, Sade-Guimarães DA, Gade-Guimarães A, Mosquito VCF, Lima M and Richard S (2017b) Biodegradable polymeric nanocapsules prevent cardiotoxicity of anti-trypansomal lipocholethals. *Scientific Reports* 7, 44998.
- Brossi A, Venugopalan B, Dominguez-Gorpe I, Yeh HJC, Hippens-Anderson JI, Buche P, Luo XJ, McIlhenny W and Peters W (1988) Arctonin, a new antimalarial drug, synthesis and antimalarial properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 31, 645–650.

- Chinnaike B, Gabrielis M, Datta-Ramirez MR and Plaisier-Vercammen JA (2002) Preparation of artesunate liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing neurocysticercosis in Plasmodium chabaudi malaria infected mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28(1), 13–23.
- Chasen W, Altman R, Gostener P, Inappart C, Shelton-Stroed P and Kriker G (1999) Differential effects of orally versus parenterally administered zingibain derivative artesether in dogs. *Experimental and Toxicological Pathology* 51, 507–516.
- Coutinho P, Benedetti P, Facchin C, Mengali C and Pillitter G (2011) Fatal myocarditis in course of Plasmodium falciparum infection, case report and review of cardiac complications in malaria. *Case Reports in Medicine* 2011, 1–5.
- Croasd W and Casero I (1999) QT interval prolongation by non-cardiovascular drugs, issues and solutions for novel drug development. *Pharmaceutical Science and Technology* 3, 279–289.
- De Mello CGC, Benaguido RT, Oliveira MT, Milage MM, Saiki-Guimarães DA, Mosquito VCP and Lemos M (2016) Efficacy of lyophilized polymeric nanosuspensions after oral and intravenous administration in murine experimental Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60, 5215–5222.
- Elliott T and Kaina B (2010) Toxicity of the antimalarial artemisinins and its derivatives. *Critical Reviews in Toxicology* 40(5), 405–431.
- Farooq AK, Haseel MS and Cavin WB (2011) The utility of the oral rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicological Sciences* 121(1), 11–30.
- Fornetti B and Poma AA (2005) The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 439–447.
- Frost H, Patilova E, Devissagat JP, Ananyou N and Benita S (1998) Nanoparticle formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 163, 1–6.
- Galindo-Rodriguez SA, Albornoz E, Frost H and Donker E (2005) Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of *in vivo* studies. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 23, 419–463.
- Holmgvist E, Thomas KL, Bruderkick S, Hoshall M, Singh D, Chittoff R, Shaw LK, Highland DD, Velazquez JF and Dandekar JP (2015) Clinical outcome as a function of the PR interval: there is virtue in moderation, data from the Atrial Fibrillation and Cardiovascular Disease (AF-CAD) study. *Journal of the American College of Cardiology* 65, 978–985.
- Ibra H, Ibrahim NE and Newton CR (2005) Pathogenesis, clinical features, and neurological outcomes of cerebral malaria. *Lancet Neurology* 4, 827–840.
- Jain A, Kaulik R and Kaulik RM (2016) Malarial hepatopathy, clinical profile and association with other malarial complications. *Acta Tropica* 159, 95–105.
- Kachong J, Na-Bangbang E, Chongsang S, Mahanta P and Thammathit A (1997) Pharmacokinetics and bioavailability of oral and intravenous artesether. *European Journal of Clinical Pharmacology* 52(4), 307–310.
- Khanji DS, Grewer D, Elliott Y, Sorn MSB, Thomas BS, James KR, Red SB, Arora RA, Singh JA, Gauthier RH, Akter J, Sekhon S, Haque A and Dandekar JP (2017) Characterizing the effect of antimalarial drugs on the maturation and clearance of murine blood stage Plasmodium parasites *in vivo*. *International Journal for Parasitology* 47, 913–922.
- Lanzini M, Bhambhani A, Melis S and Melis A (2015) Development and characterization of nanosuspension as carrier for the enhancement of bioavailability of artesether. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 43(5), 334–344.
- Legend P, Barrett G, Mosquito V, Frost H and Devissagat JP (1999) Polymeric nanosuspensions as drug delivery systems – a review. *STP Pharm Science* 9, 411–418.
- Leite EA, Galdo-Guimarães A, Guimaraes HM, Machado-Caêlo GLL, Barrett G and Mosquito VCP (2007) Cardiotoxicity reduction induced by lisdexamfetamine in nanosuspension devices. *Lip Science* 8, 1327–1336.
- Lourenco N, White N, Chantanasatikul P, Edwards G, Michell D, Busch C and Warrall DA (1986) Cardiovascular toxicity and distribution kinetics of intravenous chloroquine. *British Journal of Clinical Pharmacology* 23, 31–36.
- Maguire GP, Hasekija Y, Peto MCF, Kongsakorn Y, He N, Yijun E and Anany NM (2008) Lung injury in uncomplicated and severe Plasmodium malaria, a longitudinal study in Papua, Indonesia. *The Journal of Infectious Diseases* 197, 1966–1974.
- Maslovskaia SD, Sharma S, Pathak S and Patrovska VB (2008) Development of SM01305 using natural lipophilic application to artesether delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 363, 179–183.
- Mouning J, Vassachapong P, Lee C, Spring M, Su M, Sun D, Se Y, Sornthay S, Phansu ST, Chansu S, Sritichai S, Banthong N, Kongsakorn W, Mitprasit M, Siripakdeung R, Yajima-Inwalharn P, Suk S, Yimmaroon A, Lanteri C, Karwangsang J, Ananyou N, Tang D, Chant CM, Piro S, Haisang M, Castellana L and Sankaran D (2014) Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of a two-day regimen of dihydroartemisinin-piperaquine for malaria prevention halted for concerns over prolonged corrected QT interval. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 58, 6056–6060.
- McClain S, Proulx F, Mochari F, O'Malley D, Clarke N, Bastien S and Baptes D (1999) Binding and uptake of biodegradable poly DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 6(2), 153–163.
- Meca TH, Han J, Nash CB and Caldwell RW (1980)  $\alpha$ -Adrenergic blocking properties of quinine 19(3) 1. *European Journal of Pharmacology* 65, 159–166.
- Melton AD, Green ST, McKenzie MW and West JN (2001) Myocarditis associated with Plasmodium falciparum malaria, a case report and a review of the literature. *Journal of Travel Medicine* 8, 219–220.
- Mosquito VCP, Lemos M, Barão C, Legend P, Devissagat JP and Barrett G (2004) Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanoparticle formulations of lisdexamfetamine in Plasmodium falciparum infected mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(6), 1223–1228.
- Muganyizi B, Bawa JK, Ringold P, Kozlowski A and Bharti KN (2001) Cardiac effects of amoxicillin and sulfadiazine-pyrimethamine in malaria infected African patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65, 711–716.
- Patel RD (2007) Models of gender differences in cardiovascular disease. *Drug Discovery Today, Disease Models* 4(4), 227–232.
- Peters W, Zie-Lin L, Robinson B and Wachter DC (1984) The chemotherapy of rodent malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 78, 483–489.
- Plewa K, Kingston HWE, Ghose A, Munde RJ, Herdson MY, Leopold SJ, Ishioka H, Hasan MMU, Haider MS, Alam S, Piro KA, Chaturvedi S, Shant S, Yoo YW, Fain MA, Lee SJ, Mahala M, Turner GDH, Anany NM, Roberts LJ, White NJ, Day NPJ, Hensley A and Dandekar AM (2017) Cell free hemoglobin mediated oxidative stress is associated with acute kidney injury and renal replacement therapy in severe Plasmodium malaria, an observational study. *BMC Infectious Diseases* 17, 513–525.
- Pradhan P, Suryawanshi S, Pathak S, Sharma S and Patrovska V (2016) Artesether based biodegradable nanostructured lipid carriers for oral malaria therapy, enhanced efficacy at reduced dose and dosing frequency. *International Journal of Pharmaceutics* 511, 475–487.
- Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Potholanger S, Singh PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ and Haunswood YU (2003) Relationships between proarrhythmic cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovascular Research* 58, 32–45.
- Sadah WE and Udohara JO (2016) Electrocardiographic changes and troponin T levels in children with severe malaria anemia and heart failure. *Nigerian Journal of Clinical Practice* 20(5), 556–559.
- Sahil V, Karnad DR, Panicker GK and Kothari S (2010) Update on the evaluation of a new drug for effects on cardiac repolarization in humans, issues in early drug development. *British Journal of Pharmacology* 159, 34–48.
- Shant S, Newton PM, Yajima-Inwalharn P, Supattanasongkoll Y, Siriyasuda D, Rattanasomroj M, Pakritpakdee S and White NJ (2007) Artesether bioavailability after oral or intravenous administration in uncomplicated Plasmodium malaria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 47, 3797–3798.
- Shaw LK, Odundo AO, Owaro BO, Mihai EK, Opello MO and Wambuzi JN (2007) Loss of red blood cell complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. *Journal of Infectious Diseases* 197, 522–525.
- Sharma S, Chidambaram R, Dandekar J, Gattas DA, Bailey J and Gargula A (2007) Recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram. *Journal of the American College of Cardiology* 49, 1109–1127.
- Toro-Antón J, Kapadia S, Benedetti C, Oval H, Young JB and Mason DR (1996) Preclinical cytotoxic levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the studies of left ventricular

- dyslexion (SOVD). *Journal of the American College of Cardiology* 27, 1301–1306.
- Yipshy S, Das S, Chakraborty SP, Saha SK, Pramanik P and Ray S (2012) Synthesis, characterization of chitosan triethylphosphate conjugated chitosan nanoparticle and its in vivo anti-malarial efficacy against rodent parasite: A dose and duration dependent approach. *International Journal of Pharmaceutics* 434, 292–305.
- Vidal-Dinis AT. (2014) Artemeter nanocapsules of physical-chemical characterization, cardiotoxicity, neurotoxicity and efficacy in experimental malaria. PhD thesis, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil.
- World Health Organization (2016) Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance, status report. Available at <http://www.who.int/teams/ncdr/100days/20160820>. (Accessed 2 September 2017).
- World Health Organization (2016b). Summary. Geneva, World Malaria Report, (2017) (WHO/HTM/GMP/2017.4). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at <http://apps.who.int/iris/>. (Accessed 27 August 2017).
- Yin JY, Wang HM, Wang QH, Deng YS, Han G, Guan YB, Zhou KY, Qiu WS, Yuan Y, Gao XX, Jing SP and Ding RH (2014) Subchronic toxicological study of two artemisinin derivatives in dogs. *PLoS ONE* 9(6), e104234.

#### 8.4.2. Artigo científico para submissão

Reduction of arthemeter adverse effects on cardiomyocytes after nanoencapsulation

Revista *Life Science*

Neurobehavioral evaluation of artemether and artemether polymeric nanocapsules in *Palmsodium berghei* infected mice.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

#### 8.5. Congressos

**SOUZA, A. C. M.**; MOSQUEIRA, V. C. F. ; RICHARD, S. ; Oliveira LT ; Silveira APA ; Rodrigues LA ; Castro QJT ; Guimarães, H. N ; Grabe-Guimarães, A . EFFECTS OF ARTEMETHER TREATMENT ON MICE ISOLATED CARDIOMYOCYTES CONTRACTILITY AND CALCIUM TRANSIENT. In: 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics / 21st Latin-American Congress of Pharmacology, 2016, Foz do Iguaçu. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics / 21st Latin-American Congress of Pharmacology, 2016.

**SOUZA, A. C. M.**; MOSQUEIRA, V. C. F. ; RICHARD, S. ; Vidal, A.T. ; Silveira APA ; Rodrigues LA ; Castro QJT ; Guimarães, H. N ; Grabe-Guimarães, A . EVALUATION OF CARDIOTOXIC ACTIVITY OF FREE ATM AND INTO A NANOCARRIER. In: 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and the 21st Latin American Congress of Pharmacology, 2016, Foz do Iguaçu. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and the 21st Latin American Congress of Pharmacology, 2016

