



CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

RENATA GIACOMELI

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO
CURCUMINA**

Uruguaiana
2019

RENATA GIACOMELI

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO
CURCUMINA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Elisa Haas

Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Uruguiana

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

G429c Giacomeli, Renata

Caracterização biológica de nanopartículas contendo
curcumina / Renata Giacomeli.

74 p.

Tese(Doutorado) -- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM BIOQUÍMICA, 2019.

"Orientação: Sandra Elisa Haas".

1. Nanopartículas. 2. Curcumina. 3. Doença de Alzheimer. 4.
Gestação. I. Título.

RENATA GIACOMELI

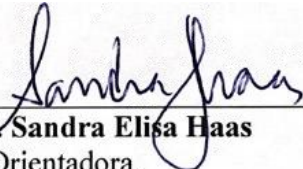
**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO
CURCUMINA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.


Área de concentração: Bioprospeção molecular

Tese apresentada e aprovada em 31 de agosto de 2019.

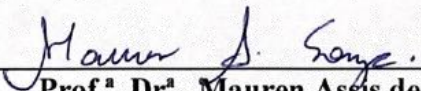
Banca examinadora:



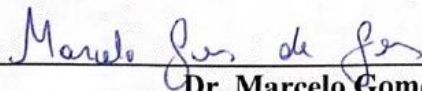
Prof.ª. Dr.ª. Sandra Elisa Haas
Orientadora
(UNIPAMPA)



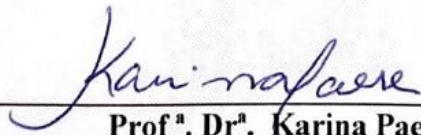
Prof.ª. Dr.ª. Francielli Weber Santos Cibin
(UNIPAMPA)



Prof.ª. Dr.ª. Mauren Assis de Souza
(UNIPAMPA)



Dr. Marcelo Gomes de Gomes
(UNIPAMPA)



Prof.ª. Dr.ª. Karina Paese
(UFRGS)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus queridos pais Paulo e Loreci, por todo apoio nesta caminhada, vocês são a base de tudo, amo infinitamente vocês!

Ao meu irmão, fonte de inspiração, quando eu crescer quero ser que nem tu! Te amo.

Ao meu namorado Vinicius, pelo apoio constante desde o início em todos os “altos e baixos” dessa caminhada. Obrigada por entender cada lágrima derramada. Tu és o melhor companheiro de vida que eu poderia escolher, te amo!

Ao Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse por ter aberto as portas do LAFTAMBIO e da pós-graduação pra mim.

A minha orientadora Prof.^a Dr^a Sandra Elisa Haas, por ter segurado essa “bomba” aqui aos 30 meses de doutorado, por ter me mostrado o caminho (ou me colocado nele). Espero que eu não tenha decepcionado! Obrigada por cuidar tão bem dos teus “amadinhos”.

Aos colegas do laboratório LABFAR (Flávia, Felipe, Camila, Renata B., Tamara, Kelly, Manoel, Gabi, Daniel e Ana) por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho (que não foi pouca), todas as infindáveis horas de experimento, mas muito mais do que isso, pela forma como vocês me acolheram no “419”. Flávia, Felipe e Camila vocês são os melhores IC’s do mundo! Obrigada pela amizade e várias horas de conversas reflexivas no lab. Vocês moram no meu coração!

Aos colegas e amigos do HUVet pelo apoio e compreensão nas horas de ausência.

Ao Laboratório Biotech, em especial à Juliana e ao Cristiano pela ajuda com a análise das interleucinas e ao Diogo pela ajuda com os hemogramas.

À UNIPAMPA pela oportunidade e por esses mais de 10 anos de aprendizado constante.

À banca examinadora pela disponibilidade em avaliar o meu trabalho.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO CURCUMINA

A aplicação da nanotecnologia na medicina é uma estratégia promissora. O uso de nanocarreadores visa modificar a biodistribuição e passagem transmembrana de fármacos a fim de melhorar seu desempenho em termos de eficácia e reduzir seus efeitos colaterais ao transportar seletivamente as moléculas ativas para os tecidos-alvo. A barreira sangue-cérebro é um sistema complexo e altamente regulatório cujo efeito restritivo acaba limitando a terapia de diversas neuropatologias, entre elas a Doença de Alzheimer (DA). Outra membrana importante e cujo estudo de fármacos nanoencapsulados e seus efeitos sobre o feto tem sido pouco estudada é a membrana placentária. A utilização de fármacos na gestação é arriscada, no entanto, o tratamento de doenças que acometem a mãe ou o feto é fundamental. A curcumina (CURC) é um polifenol extraído do rizoma da *Curcuma longa* L., cujas propriedades protetoras e terapêuticas são amplamente difundidas, mas apresenta baixa estabilidade e biodisponibilidade. Nesse intuito, a nanotecnologia pode ser uma alternativa para carrear a curcumina, modificando sua passagem através de membranas biológicas. Nesse contexto, esse trabalho avaliou os efeitos de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo CURC (CUR-LNC) em um modelo animal de DA e em um modelo animal de gestação. Primeiramente foram utilizados camundongos Swiss, os quais receberam injeção intracerebroventricular de $A\beta_{1-42}$. Os animais foram tratados via oral por 14 dias com Salina, CURC (50 mg/kg), LNC (10 mg/kg) e LNC (1 mg/kg). No 14º e 15º dia os animais foram submetidos ao teste comportamental e posteriormente à eutanásia. LNC exibiu neuroproteção significativa contra as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por $A\beta_{1-42}$ mesmo em doses 10 e 50 vezes menores que a curcumina livre. Esses dados sugerem que a nanoencapsulação da curcumina pode constituir uma alternativa preventiva e terapêutica promissora para DA. Posteriormente, foi avaliada a toxicidade pré-natal das LNC. As fêmeas grávidas foram submetidas a eutanásia no DG 20, seguida de exame materno e fetal. Os resultados mostraram que não houve diferença na evolução ponderal das fêmeas prenhes, assim como nos parâmetros hematológicos e hormonais, indicando a ausência de toxicidade materna. Não foram observadas anomalias externas ou atraso no desenvolvimento fetal. CURC e LNC reduziram os níveis de TNF- α na placenta. Da mesma forma, não foram observadas alterações histopatológicas na placenta. Mais estudos são necessários para avaliar a biodistribuição das nanopartículas durante o período gestacional. Este trabalho demonstrou que nanocápsulas do núcleo lipídico não causaram efeitos tóxicos maternos ou fetais, o que irá facilitar o desenvolvimento de futuras terapias destinadas a tratar e gerir gravidezes complicadas.

Palavras-chave: curcumina; nanopartículas; nanocápsulas do núcleo lipídico; doença de Alzheimer, gestação;

ABSTRACT

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES CONTAINING CURCUMIN

The application of nanotechnology in medicine is a promising strategy. The use of safe, biocompatible and biodegradable nanocarriers aims at modifying the biodistribution and transmembrane passage of drugs in order to improve their efficacy performance and reduce their side effects by selectively transporting active molecules to target tissues. Blood-brain barrier is a complex and highly regulatory system whose restrictive effect ultimately limits the therapy of several neuropathologies, including Alzheimer's disease (AD). Another important membrane whose study of nanoencapsulated drugs and their effects on the fetus has been poorly studied is the placental membrane. The use of drugs during pregnancy is risky, however, the treatment of diseases that affect the mother or fetus is fundamental. Curcumin (CURC) is a polyphenol extracted from *Curcuma longa* L. rhizome, whose protective and therapeutic properties are widespread but have low stability and bioavailability. Thus, nanotechnology may be an alternative to carry curcumin by modifying its passage through biological membranes. In this context, this work evaluated the effects of CURC-containing lipid core nanocapsules (LNC) in an animal model of AD and in an animal model of gestation. First, Swiss mice were used, which received A β ₁₋₄₂ intracerebroventricular injection. Animals were treated orally for 14 days with Saline, CURC (50 mg/kg), LNC (10 mg/kg) and LNC (1 mg/kg). On the 14th and 15th day the animals were submitted to behavioral test and later to euthanasia. LNC showed significant neuroprotection against A β ₁₋₄₂-induced behavioral and neurochemical changes even at doses 10 and 50 times lower than free curcumin. These data suggest that curcumin nanoencapsulation may be a promising preventive and therapeutic alternative for AD. Subsequently, LNC prenatal toxicity was evaluated. Pregnant females were euthanized at GD 20, followed by maternal and fetal examination. The results showed that there was no difference in the weight evolution of the dams, as well as in hematological and hormonal parameters, indicating the absence of maternal toxicity. No external anomalies or delayed fetal development were observed. CURC and LNC reduced placental TNF- α levels. Similarly, no histopathological changes were observed in the placenta. Further studies are needed to evaluate nanoparticle biodistribution during pregnancy. This study showed that lipid-core nanocapsules did not cause maternal or fetal toxic effects, which will facilitate the development of future therapies to treat and manage complicated pregnancies.

Palavras-chave: curcumin; nanoparticles; lipid-core nanocapsules; Alzheimer's disease, pregnancy;

LISTA DE FIGURAS

CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

| | |
|--|----|
| Figura 1 - (i) Obstáculos enfrentados pelo fármaco livre após administração sistêmica. (ii) Os obstáculos enfrentados pelo fármaco livre são superados | 12 |
| Figura 2 - Estrutura barreira sangue-cérebro | 14 |
| Figura 3 - Fisiopatologia básica da doença de Alzheimer | 16 |
| Figura 4 - Estrutura barreira placentária | 18 |
| Figura 5 - Estrutura química da Curcumina | 23 |

ARTIGO

| | |
|---|----|
| Fig. 1. Effect of free or nanoencapsulated curcumin on sham or A β 1-42-induced memory impairment in the Morris water maze task | 28 |
| Fig. 2. Effect of free or nanoencapsulated curcumin on TNF- α mRNA expression | 28 |
| Fig. 3. Effect of free or nanoencapsulated curcumin on IL-1 β mRNA expression..... | 29 |
| Fig. 4. Effect of free or nanoencapsulated curcumin on IL-6 mRNA expression..... | 29 |
| Fig. 5. Effect of free or nanoencapsulated curcumin on IFN- γ mRNA expression | 30 |
| Fig. 6. Effect of free or nanoencapsulated curcumin on NF κ B mRNA expression | 31 |
| Fig. 7. Overview of study design. A β 1-42, amyloid-beta peptide 1-42; PBS, phosphate buffered saline FC50, free curcumin 50 mg/kg; LNC10, curcumin loaded nanocapsules mg/kg; LNC1: curcumin loaded nanocapsules 1 mg/kg | 33 |

MANUSCRITO

LISTA DE TABELAS

CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Estudos *in vivo* utilizando nanopartículas na gestação20

MANUSCRITO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β - *beta* amiloide

A β ₁₋₄₀ - Isoforma do peptídeo beta-amiloide com 40 aminoácidos

A β ₁₋₄₂ - Isoforma do peptídeo beta-amiloide com 42 aminoácidos

APP - Proteína precursora de amiloide

BBB - *Blood-Brain Barrier* (barreira sangue-cérebro)

BDMC - Bisdemetoxicurcumina

CDK5 - Quinase dependente de ciclina-5

DA - Doença de Alzheimer

DMC - Demethoxicurcumina

ERK2 - quinase regulada por sinal extracelular tipo 2

GD - Dia gestacional

GSK3 β - glicogênio sintase quinase 3-*beta*

HPLC - *High Performance Liquide Chromatography* = cromatografia líquida de alta eficiência

I.c.v. - intracerebroventricular

IFN- γ - Interferon-*gama*

IL-10 - Interleucina 10

IL-1 β - Interleucina 1-*beta*

IL-6 - Interleucina 6

LNC - *Lipid-core nanocapsule* =Nanocápsulas de núcleo lipídico

MWM - *Morris Water Maze* = Labirinto aquático de Morris

NF- κ B - Fator nuclear *kappa* B

NFT - Emaranhados neurofibrilares

NP - Nanopartículas

SNC - Sistema nervoso central

TNF- α - Fator de necrose tumoral-*alfa*

TSH - Hormônio Estimulante da Tireoide

T3 - Hormônio Triiodotironina

T4 – Hormônio Tiroxina

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | 8 |
| LISTA DE TABELAS..... | 9 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 10 |
| SUMÁRIO | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA | 13 |
| 2.1 Nanomedicina | 13 |
| 2.2 Barreira sangue-cérebro e Doença de Alzheimer..... | 14 |
| 2.3 Barreira placentária e farmacoterapia na gestação | 18 |
| 2.4 Curcumina..... | 23 |
| 3 OBJETIVOS..... | 26 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 26 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 26 |
| 4 ARTIGO - Neuroprotective effects of curcumin lipid-core nanocapsules in a model Alzheimer's disease induced by β-amyloid 1-42 peptide in aged female mice..... | 27 |
| 5 MANUSCRITO - | |
| Abstract | 38 |
| 1 Introduction | 39 |
| 2 Materials and methods..... | 40 |
| 3 Results..... | 44 |
| 4 Comment | 46 |
| 5 Acknowledgements | 48 |
| References..... | 48 |
| 6 DISCUSSÃO GERAL..... | 61 |
| 7 CONCLUSÕES | 66 |
| REFERÊNCIAS | 67 |
| ANEXOS | 73 |
| Parecer de aprovação do Comitê de ética no Uso de Animais da UNIPAMPA | 73 |

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência que se dedica ao estudo de materiais em escala nanométrica, podendo ser aplicada em diferentes áreas, tais como engenharia, ciência da computação, química, biologia e na medicina. Desta forma, na medicina a nanotecnologia pode ser aplicada com o objetivo preventivo, diagnóstico e terapêutico de doenças (Flühmann *et al.*, 2019). Uma dessas aplicações é o carregamento de fármacos em nanotransportadores, com o objetivo de entrega a tecidos específicos, vantagem que muitas vezes o fármaco livre não oferece (Bilia *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019). Nanopartículas poliméricas são nanotransportadores que têm sido intensivamente investigados na medicina devido as suas características de biocompatibilidade e biodegradação, além de apresentarem baixa toxicidade (Frank *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2019; Venditti, 2019). Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) são um tipo de nanopartículas poliméricas, apresentando-se como um veículo promissor com potencial para encapsulação de fármacos com alta lipofilicidade (Venturini *et al.*, 2011; Sandri *et al.*, 2019).

Nosso organismo apresenta diversas membranas biológicas, cuja a função é regular a passagem de substâncias para determinados tecidos (Doran *et al.*, 2013). Essas membranas acabam atuando como barreiras para a passagem de fármacos. Neste trabalho, demos atenção a duas barreiras biológicas a fim de avaliar o sistema de entrega de LNC: a barreira sangue-cérebro (BBB) e a placenta. BBB é uma membrana que separa o sangue do fluido extracelular do cérebro no sistema nervoso central (SNC), consistindo em uma contínua barreira celular quase impermeável, a qual regula o tráfego de substâncias (Argaw *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2012), representando uma estrutura essencial para a homeostase do SNC (Zhou *et al.*, 2018), porém seu efeito restritivo acaba representando um obstáculo para uma multiplicidade de fármacos terapêuticamente importantes para doenças neurodegenerativas, como é o caso da Doença de Alzheimer (DA). DA é a forma mais comum de demência, representando cerca de 60-70% de todos os casos, apresenta-se clinicamente com a perda progressiva da memória e das funções cognitivas. Patologicamente, DA caracteriza-se por vários eventos neuropatológicos, incluindo acúmulo de placas amiloides, emaranhados neurofibrilares, estresse oxidativo e neuroinflamação. Uma cura efetiva para a DA permanece elusiva. Portanto, o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas mais efetivas é uma necessidade urgente e também um grande desafio da ciência médica. Nesse sentido, sistemas de nanopartículas se mostram promissores, uma vez que podem facilitar a penetração da

barreira sangue cérebro, além de promover o efeito de direcionamento ao SNC (Kim *et al.*, 2018).

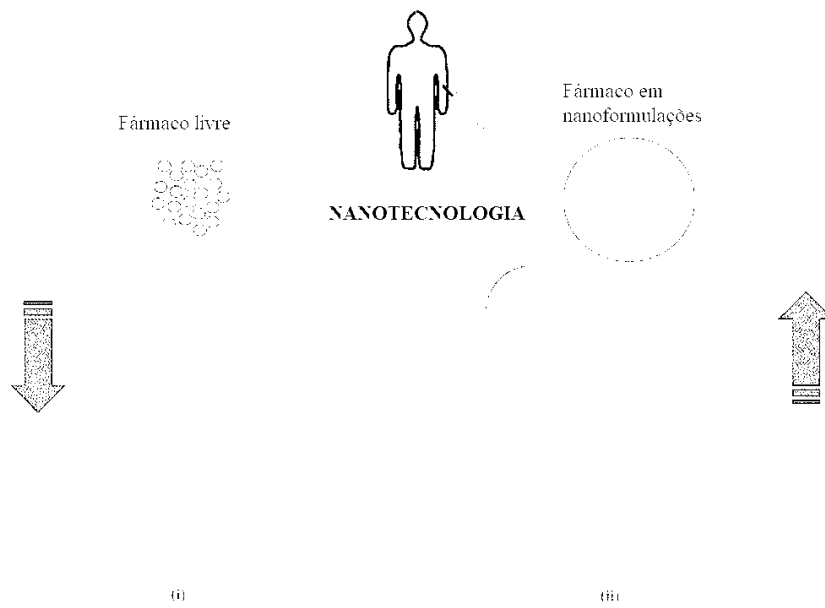
A placenta é o órgão de troca entre a circulação materna e fetal, na qual regula a respiração, nutrição e excreção do feto, desempenhando as funções dos órgãos fetais, além de atuar como órgão endócrino, promovendo a secreção de hormônios relacionados à reprodução (Menezes *et al.*, 2011). Além de atuar como uma barreira à transferência de substâncias, pode ser um local de absorção, acúmulo e toxicidade, afetando o desenvolvimento fetal de acordo com o estágio da gestação (Valero *et al.*, 2018). Diversas patologias (crônicas ou temporárias) podem acometer a gestante (Al-Enazy *et al.*, 2017), desta forma, é de extrema relevância o estudo sobre o uso de medicamentos na gestação. Sabe-se que 9 em cada 10 mulheres tomam pelo menos um medicamento durante a gravidez (CDC, 2018) e, apesar disso, as gestantes são excluídas da maioria dos ensaios clínicos devido aos riscos potenciais de exposição fetal (Keelan *et al.*, 2015). O principal desafio para o desenvolvimento de medicamentos seguros para uso na gestação é reduzir ou eliminar a exposição de tecidos indesejados (sejam maternos ou fetais) enquanto ainda fornece o efeito terapêutico necessário (Joshi, 2017). Levando-se em consideração a vantagem de nanotecnologia em direcionar o fármaco dentro do organismo, elevando a segurança no uso de medicamentos, ela se torna promissora no que tange a gestação. Sabe-se até então que a utilização de nanopartículas na gestação pode ter três diferentes enfoques: tratamento materno, placentário ou fetal (Muoth *et al.*, 2016). Estudos avaliando a penetração e consequente toxicidade de nanopartículas metálicas na placenta e no feto estão se tornando frequentes na literatura. Entretanto, aspectos relacionados a nanopartículas orgânicas como potenciais carreadores de ativos ainda são escassos na literatura, e até o momento não há nada descrito sobre o uso *in vivo* de LNC na gestação.

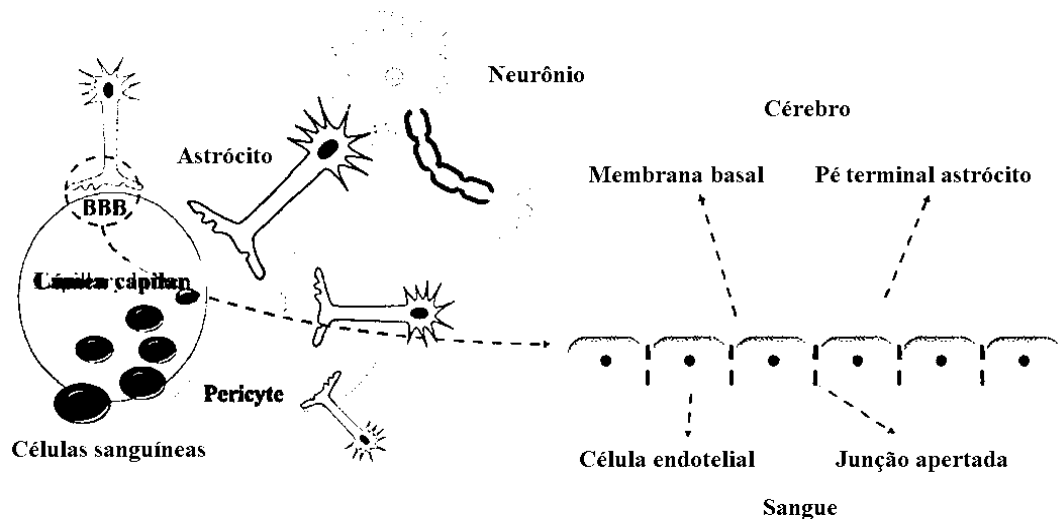
Considerando os trabalhos previamente desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (Nakama *et al.*, 2018; Velasques *et al.*, 2018) e a necessidade de utilizar um fármaco modelo para avaliar o comportamento biológico de nanocápsulas de núcleo lipídico, a curcumina foi escolhida. Extraída do rizoma da *Curcuma longa* L., a curcumina é um polifenol amarelado (Mahmood *et al.*, 2015), popularmente conhecida como açafrão-da-terra, utilizada há milhares de anos como fitoterápico em países asiáticos (Massimino *et al.*, 2017). Vários anos de pesquisa revelaram que a curcumina tem propriedades medicinais, sendo eficaz para o tratamento de diversas doenças, incluindo doenças que acometem o SNC (Del Prado-Audelo *et al.*, 2019). Além disso, foram descritos seus benefícios em condições obstétricas (Lim *et*

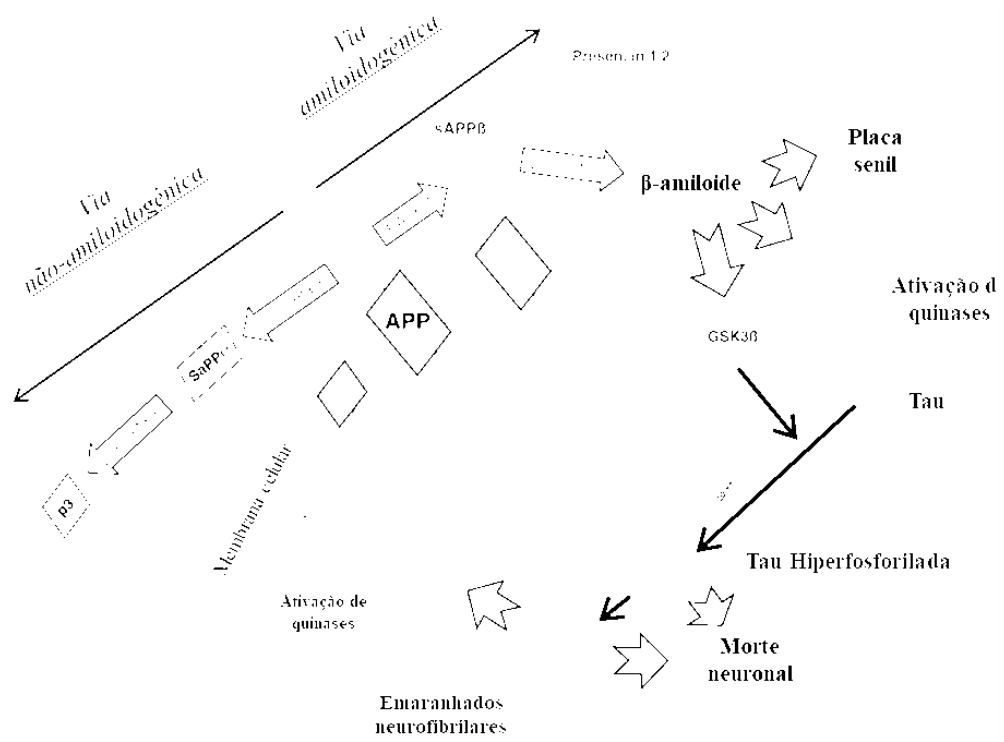
al., 2013; Gong *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2019). Ao se estudar os efeitos biológicos da curcumina, a principal preocupação é a sua biodisponibilidade, devido à sua solubilidade aquosa extremamente baixa, rápida remoção sistêmica e degradação em pH alcalino (Seyedzadeh *et al.*, 2014). Em vista disso, sua incorporação em nanocarreadores por diferentes técnicas é uma opção adequada e eficiente para melhorar sua solubilidade, estabilidade e funcionalidade (Rafiee *et al.*, 2019).

Diante do exposto, no presente trabalho avaliamos o comportamento biológico da curcumina nanoencapsulada em modelo animal de DA e em modelo animal de gestação.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA









3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos biológicos da curcumina nanoencapsulada como resultado da sua passagem através da membrana sangue-cérebro e placentária.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar os efeitos da curcumina nanoencapsulada e compara-la à forma livre sobre o comportamento cognitivo em modelo de DA em camundongos;

b) Avaliar os efeitos da curcumina nanoencapsulada e compara-la à forma livre em estruturas encefálicas (córtex pré-frontal e hipocampo) e soro de camundongos em parâmetros de neuroinflamação induzida;

c) Avaliar os efeitos da curcumina nanoencapsulada e compara-la à forma livre quando administradas durante o período de organogênese em modelo de rata prenhe;

d) Avaliar possível toxicidade da formulação de nanocápsulas sem ativo (brancas);

e) Monitorar o peso dos animais tratados, bem como o consumo de água e ração;

f) Avaliar parâmetros hematológicos (hemograma) e hormonais (hormônio estimulante da tireoide – TSH, triiodotironina - T3 e tiroxina - T4) das ratas prenhes;

g) Avaliar alterações morfométricas dos fetos após exposição materna ao tratamento;

h) Realizar avaliação histológica das placentas;

i) Determinar os níveis citocinas inflamatórias na placenta e fígado dos fetos;

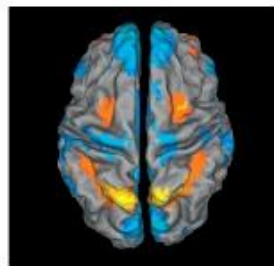
j) Quantificar os níveis de curcumina no fígado materno e conceptos, a fim de avaliar o sistema de entrega das nanocápsulas;

4 ARTIGO - Neuroprotective effects of curcumin lipid-core nanocapsules in a model Alzheimer's disease induced by β -amyloid 1-42 peptide in aged female mice

Publicado no periódico "*Brain Research*"

2019 Jul 17:146325. doi: [10.1016/j.brainres.2019.146325](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146325)

Brain Research



ELSEVIER

¹ A ser submetido no periódico “European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology”

7 CONCLUSÕES

A primeira parte do presente estudo demonstrou os efeitos neuroprotetores da curcumina, bem como seu desempenho *in vivo* melhorado através da sua encapsulação em nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico. O tratamento via oral por 14 dias com curcumina, foi eficaz em atenuar os seguintes efeitos prejudiciais induzidos por $A\beta_{1-42}$:

- O comprometimento cognitivo dos camundongos;
- O aumento dos níveis e expressão proteica de interleucinas inflamatórias;
- O aumento dos níveis de NF κ B fosforilado e expressão proteica de NF κ B;

Em conjunto, estes achados fornecem uma visão sobre a ação neuroprotetora da curcumina, seus efeitos benéficos em distúrbios neurodegenerativos crônicos e sua nanoencapsulação como uma abordagem promissora para a aplicação de um agente neuroprotetor na prevenção da DA.

Apesar de mais estudos se fazerem necessários para avaliar a biodistribuição das nanopartículas durante o período gestacional, este trabalho demonstrou que nanocápsulas do núcleo lipídico não causaram efeitos tóxicos maternos ou fetais, o que irá facilitar o desenvolvimento de futuras terapias destinadas a tratar e gerir gravidezes complicadas.

REFERÊNCIAS

- AL-ENAZY, S. et al. Placental control of drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 116, p. 63-72, 2017.
- ALBEKAIRI, N. A. et al. Transport of digoxin-loaded polymeric nanoparticles across BeWo cells, an in vitro model of human placental trophoblast. **Ther Deliv**, v. 6, n. 12, p. 1325-34, 2015.
- ALI, H. et al. Preparation, characterization, and transport of dexamethasone-loaded polymeric nanoparticles across a human placental in vitro model. **Int J Pharm**, v. 454, n. 1, p. 149-57, 2013.
- ALJUNAIDY, M. M. et al. Maternal treatment with a placental-targeted antioxidant (MitoQ) impacts offspring cardiovascular function in a rat model of prenatal hypoxia. **Pharmacological Research**, v. 134, p. 332-342, 2018.
- ANAND, A. et al. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. **Eur J Pharmacol**, v. 815, p. 364-375, 2017.
- ANDRE, E. M. et al. Nano and microcarriers to improve stem cell behaviour for neuroregenerative medicine strategies: Application to Huntington's disease. **Biomaterials**, v. 83, p. 347-62, 2016.
- ANSARI, J. et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Drugs Commonly Used in Pregnancy and Parturition. **Anesth Analg**, v. 122, n. 3, p. 786-804, 2016.
- ARGAW, A. T. et al. IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. **J Immunol**, v. 177, n. 8, p. 5574-84, 2006.
- AUSTIN, C. A. et al. Distribution and accumulation of 10 nm silver nanoparticles in maternal tissues and visceral yolk sac of pregnant mice, and a potential effect on embryo growth. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 6, p. 654-61, 2016.
- BALDUCCI, C.; FORLONI, G. In vivo application of beta amyloid oligomers: a simple tool to evaluate mechanisms of action and new therapeutic approaches. **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 15, p. 2491-505, 2014.
- BALLARD, C. et al. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 377, n. 9770, p. 1019-31, 2011.
- BASSANI, T. B. et al. Decrease in Adult Neurogenesis and Neuroinflammation Are Involved in Spatial Memory Impairment in the Streptozotocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Rats. **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 5, p. 4280-4296, 2018.
- BEGUM, A. N. et al. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 326, n. 1, p. 196-208, 2008.
- BERNARDI, A. et al. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by Abeta1-42 in Alzheimer's disease models. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 4927-42, 2012.
- BILIA, A. R. et al. Improving on Nature: The Role of Nanomedicine in the Development of Clinical Natural Drugs. **Planta Med**, v. 83, n. 5, p. 366-381, 2017.
- BRONZUOLI, M. R. et al. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease. **J Inflamm Res**, v. 9, p. 199-208, 2016.
- CASTELLANI, R. J. et al. Alzheimer disease pathology as a host response. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 67, n. 6, p. 523-31, 2008.
- CHAMBON, C. et al. Behavioural and cellular effects of exogenous amyloid-beta peptides in rodents. **Behav Brain Res**, v. 225, n. 2, p. 623-41, 2011.
- COSTANTINE, M. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 65, 2014.

- CUNNINGHAM, C.; HENNESSY, E. Co-morbidity and systemic inflammation as drivers of cognitive decline: new experimental models adopting a broader paradigm in dementia research. **Alzheimers Res Ther**, v. 7, n. 1, p. 33, 2015.
- DEL PRADO-AUDELO, M. L. et al. Formulations of Curcumin Nanoparticles for Brain Diseases. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, 2019.
- DILNAWAZ, F.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Recent trends of nanomedicinal approaches in clinics. **Int J Pharm**, v. 538, n. 1-2, p. 263-278, 2018.
- DIMER, F. A. et al. Nanoencapsulation Improves Relative Bioavailability and Antipsychotic Effect of Olanzapine in Rats. **J Biomed Nanotechnol**, v. 11, n. 8, p. 1482-93, 2015.
- DORAN, K. S. et al. Concepts and mechanisms: crossing host barriers. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 7, 2013.
- DU PREEZ, R. et al. Low-Dose Curcumin Nanoparticles Normalise Blood Pressure in Male Wistar Rats with Diet-Induced Metabolic Syndrome. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 2019.
- EMA, M. et al. Teratogenic evaluation of di-n-butyl phthalate in rats. **Toxicol Lett**, v. 69, n. 2, p. 197-203, 1993.
- FATEMI, M. et al. Effects of Silver Nanoparticle on the Developing Liver of Rat Pups after Maternal Exposure. **Iran J Pharm Res**, v. 16, n. 2, p. 685-693, 2017
- FLÜHMANN, B. et al. Nanomedicines: The magic bullets reaching their target? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 128, p. 73-80, 2019.
- FRANK, L. A. et al. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 7, n. 5, p. 623-39, 2015.
- FROZZA, R. L. et al. Neuroprotective effects of resveratrol against Abeta administration in rats are improved by lipid-core nanocapsules. **Mol Neurobiol**, v. 47, n. 3, p. 1066-80, 2013.
- GANGULY, E. et al. Sex-Specific Effects of Nanoparticle-Encapsulated MitoQ (nMitoQ) Delivery to the Placenta in a Rat Model of Fetal Hypoxia. **Front Physiol**, v. 10, p. 562, 2019.
- GAZAL, M. et al. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 724, p. 132-139, 2014.
- GONG, P. et al. Curcumin improves LPS-induced preeclampsia-like phenotype in rat by inhibiting the TLR4 signaling pathway. **Placenta**, v. 41, p. 45-52, 2016.
- GONZALEZ-REYES, R. E. et al. Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. **Front Mol Neurosci**, v. 10, p. 427, 2017.
- GRAFMUELLER, S. et al. Transfer studies of polystyrene nanoparticles in the ex vivo human placenta perfusion model: key sources of artifacts. **Sci Technol Adv Mater**, v. 16, n. 4, p. 044602, 2015.
- GUO, Y. Z.; HE, P.; FENG, A. M. Effect of curcumin on expressions of NF-kappaBp65, TNF-alpha and IL-8 in placental tissue of premature birth of infected mice. **Asian Pac J Trop Med**, v. 10, n. 2, p. 175-178, 2017.
- HAO, Y. et al. Molecular evidence of offspring liver dysfunction after maternal exposure to zinc oxide nanoparticles. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 329, p. 318-325, 2017.
- HE, F. Q. et al. Tetrandrine attenuates spatial memory impairment and hippocampal neuroinflammation via inhibiting NF-kappaB activation in a rat model of Alzheimer's disease induced by amyloid-beta(1-42). **Brain Res**, v. 1384, p. 89-96, 2011.

- HO, D. et al. Maternal-placental-fetal biodistribution of multimodal polymeric nanoparticles in a pregnant rat model in mid and late gestation. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 2866, 2017.
- HOPPE, J. B. et al. Free and nanoencapsulated curcumin suppress beta-amyloid-induced cognitive impairments in rats: involvement of BDNF and Akt/GSK-3beta signaling pathway. **Neurobiol Learn Mem**, v. 106, p. 134-44, 2013.
- HUANG, F. et al. Curcumin inhibits gastric cancer-derived mesenchymal stem cells mediated angiogenesis by regulating NF-kappaB/VEGF signaling. **Am J Transl Res**, v. 9, n. 12, p. 5538-5547, 2017.
- HUANG, J.-P. et al. Nanoparticles can cross mouse placenta and induce trophoblast apoptosis. **Placenta**, v. 36, n. 12, p. 1433-1441, 2015.
- IN'T VELD, R. H. et al. The Potential of Nano-Vehicle Mediated Therapy in Vasculitis and Multiple Sclerosis. **Curr Pharm Des**, v. 23, n. 13, p. 1985-1992, 2017.
- ISHRAT, T. et al. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 9, p. 636-47, 2009.
- JAGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **J Biomed Nanotechnol**, v. 5, n. 1, p. 130-40, 2009.
- JIA, J. et al. Amelioratory effects of testosterone treatment on cognitive performance deficits induced by soluble Abeta1-42 oligomers injected into the hippocampus. **Horm Behav**, v. 64, n. 3, p. 477-86, 2013.
- JIANG, S. et al. Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases. **Pharmacol Res**, v. 119, p. 373-383, 2017.
- JOSHI, M. D. Drug delivery during pregnancy: how can nanomedicine be used? **Ther Deliv**, v. 8, n. 12, p. 1023-1025, 2017.
- KAHKHAIE, K. R. et al. Curcumin: a modulator of inflammatory signaling pathways in the immune system. **Inflammopharmacology**, 2019.
- KEELAN, J. A. et al. Therapeutic and safety considerations of nanoparticle-mediated drug delivery in pregnancy. **Nanomedicine (Lond)**, v. 10, n. 14, p. 2229-47, 2015.
- KIM, K. T. et al. Nanodelivery systems for overcoming limited transportation of therapeutic molecules through the blood-brain barrier. **Future Med Chem**, v. 10, n. 22, p. 2659-2674, 2018.
- LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 59-70, 2018.
- LELLI, D. et al. Curcumin use in pulmonary diseases: State of the art and future perspectives. **Pharmacol Res**, v. 115, p. 133-148, 2017.
- LEYVA-GOMEZ, G. et al. Nanoparticle technology for treatment of Parkinson's disease: the role of surface phenomena in reaching the brain. **Drug Discov Today**, v. 20, n. 7, p. 824-37, 2015.
- LIM, R. et al. Dietary phytochemicals curcumin, naringenin and apigenin reduce infection-induced inflammatory and contractile pathways in human placenta, foetal membranes and myometrium. *Mol Hum Reprod*, v. 19, n. 7, p. 451-62, 2013.
- LIU, Y.; LI, H.; XIAO, K. Distribution and Biological Effects of Nanoparticles in the Reproductive System. **Curr Drug Metab**, v. 17, n. 5, p. 478-96, 2016.
- LIU, Y. et al. Quercetin-modified gold-palladium nanoparticles as a potential autophagy inducer for the treatment of Alzheimer's disease. **J Colloid Interface Sci**, v. 552, p. 388-400, 2019.

- LOFFLER, T. et al. Neuroinflammation and related neuropathologies in APPSL mice: further value of this in vivo model of Alzheimer's disease. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 84, 2014.
- LOPALCO, A. et al. Oxcarbazepine-loaded polymeric nanoparticles: development and permeability studies across in vitro models of the blood-brain barrier and human placental trophoblast. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 1985-96, 2015.
- LOPEZ-LAZARO, M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. **Mol Nutr Food Res**, v. 52 Suppl 1, p. S103-27, 2008.
- LU, X. et al. Curcumin ameliorates gestational diabetes in mice partly through activating AMPK. **Pharm Biol**, v. 57, n. 1, p. 250-254, 2019.
- MAHMOOD, K. et al. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 877-890, 2015.
- MANIKANDAN, R. et al. Ameliorative effects of curcumin against renal injuries mediated by inducible nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B during gentamicin-induced toxicity in Wistar rats. **Eur J Pharmacol**, v. 670, n. 2-3, p. 578-85, 2011.
- MARTIN-RAPUN, R. et al. Targeted Nanoparticles for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Curr Pharm Des**, v. 23, n. 13, p. 1927-1952, 2017.
- MASSIMINO, L. C.; FARIA, H. A. M.; YOSHIOKA, S. A. Curcumin bioactive nanosizing: Increase of bioavailability. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 493-497, 2017.
- MENEZES, V.; MALEK, A.; KEELAN, J. A. Nanoparticulate drug delivery in pregnancy: placental passage and fetal exposure. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, n. 5, p. 731-42, 2011.
- MONROY, A.; LITHGOW, G. J.; ALAVEZ, S. Curcumin and neurodegenerative diseases. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 122-32, 2013.
- MUOTH, C. et al. Nanoparticle transport across the placental barrier: pushing the field forward! **Nanomedicine (Lond)**, v. 11, n. 8, p. 941-57, 2016.
- NAEIMI, R. et al. Curcumin-loaded nanoparticles ameliorate glial activation and improve myelin repair in lyolecithin-induced focal demyelination model of rat corpus callosum. **Neurosci Lett**, v. 674, p. 1-10, 2018.
- OECD (2018), *Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070820-en>.
- PEREIRA, M. P. et al. Cationic and anionic unloaded polymeric nanocapsules: Toxicological evaluation in rats shows low toxicity. **Biomed Pharmacother**, v. 116, p. 109014, 2019.
- PEREIRA, N. R. C. et al. Mechanisms of the effectiveness of poly(epsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules loaded with methotrexate on glioblastoma multiforme treatment. **Int J Nanomedicine**, v. 13, p. 4563-4573, 2018.
- PHILLIPS, T. J. et al. Treating the placenta to prevent adverse effects of gestational hypoxia on fetal brain development. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 9079, 2017.
- RAFIEE, Z. et al. Application of curcumin-loaded nanocarriers for food, drug and cosmetic purposes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 445-458, 2019.
- REFUERZO, J. S. et al. Liposomes: a nanoscale drug carrying system to prevent indomethacin passage to the fetus in a pregnant mouse model. **Am J Obstet Gynecol**, v. 212, n. 4, p. 508.e1-7, 2015.

- RIBEIRO, F. M. et al. Animal models of neurodegenerative diseases. **Braz J Psychiatry**, v. 35 Suppl 2, p. S82-91, 2013.
- RODRIGUES, S. F. et al. Lipid-Core Nanocapsules Act as a Drug Shuttle Through the Blood Brain Barrier and Reduce Glioblastoma After Intravenous or Oral Administration. **J Biomed Nanotechnol**, v. 12, n. 5, p. 986-1000, 2016.
- SACHDEVA, A. K.; CHOPRA, K. Lycopene abrogates Abeta(1-42)-mediated neuroinflammatory cascade in an experimental model of Alzheimer's disease. **J Nutr Biochem**, v. 26, n. 7, p. 736-44, 2015.
- SALEHI, B. et al. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 163, p. 527-545, 2019.
- SANDRI, S. et al. Direct effects of poly(epsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules on human immune cells. **Nanomedicine (Lond)**, 2019.
- SAUNDERS, M. Transplacental transport of nanomaterials. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 1, n. 6, p. 671-84, 2009.
- SEYEDZADEH, M. H. et al. Study of curcumin immunomodulatory effects on reactive astrocyte cell function. **Int Immunopharmacol**, v. 22, n. 1, p. 230-5, 2014.
- SEZGIN-BAYINDIR, Z. et al. Investigations on clonazepam-loaded polymeric micelle-like nanoparticles for safe drug administration during pregnancy. **J Microencapsul**, v. 35, n. 2, p. 149-164, 2018.
- SHAW, J. et al. Inflammatory processes are specifically enhanced in endothelial cells by placental-derived TNF-alpha: Implications in preeclampsia (PE). **Placenta**, v. 43, p. 1-8, 2016.
- SIVIERO, A. et al. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 57-70, 2015.
- SUN, X. et al. Recent Advances of Curcumin in the Prevention and Treatment of Renal Fibrosis. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 2418671, 2017.
- TAKAHASHI, Y. et al. Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice. **J Toxicol Sci**, v. 35, n. 5, p. 749-56, 2010.
- TENG, C. et al. Size-dependent maternal-fetal transfer and fetal developmental toxicity of ZnO nanoparticles after oral exposures in pregnant mice. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109439, 2019.
- TIAN, X. et al. Intrauterine inflammation increases materno-fetal transfer of gold nanoparticles in a size-dependent manner in murine pregnancy. **Small**, v. 9, n. 14, p. 2432-9, 2013.
- TRAESEL, G. K. et al. Evaluation of embryotoxic and teratogenic effects of the oil extracted from Caryocar brasiliense Cambess pulp in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 110, p. 74-82, 2017.
- Treating for two: data and statistics. (2018). <https://www.cdc.gov/pregnancy/meds/treatingfortwo/index.html>
- VAF AEI-POUR, Z. et al. Embryo-Protective Effects of Cerium Oxide Nanoparticles against Gestational Diabetes in Mice. **Iran J Pharm Res**, v. 17, n. 3, p. 964-975, 2018.
- VAKILINEZHAD, M. A. et al. Nicotinamide loaded functionalized solid lipid nanoparticles improves cognition in Alzheimer's disease animal model by reducing Tau hyperphosphorylation. **Daru**, v. 26, n. 2, p. 165-177, 2018.
- VALERO, L. et al. Nanomedicine as a potential approach to empower the new strategies for the treatment of preeclampsia. **Drug Discov Today**, v. 23, n. 5, p. 1099-1107, 2018.

- VELASQUES, K. et al. Co-nanoencapsulation of antimalarial drugs increases their in vitro efficacy against *Plasmodium falciparum* and decreases their toxicity to *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Pharm Sci*, v. 118, p. 1-12, 2018.
- VENDITTI, I. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. *Journal of King Saud University - Science*, v. 31, n. 3, p. 398-411, 2019.
- VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 375, n. 1, p. 200-208, 2011.
- VIEIRA, S. M. et al. A surface modification of clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: A study of formulation development and biological assessment. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 145, p. 748-756, 2016.
- WOHLFART, S.; GELPERINA, S.; KREUTER, J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Control Release*, v. 161, n. 2, p. 264-73, 2012.
- WONG, H. L.; WU, X. Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 64, n. 7, p. 686-700, 2012.
- World Health Organization. Dementia fact sheet. April 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- YANG, H. et al. Effects of nanoparticle size and gestational age on maternal biodistribution and toxicity of gold nanoparticles in pregnant mice. *Toxicol Lett*, v. 230, n. 1, p. 10-8, 2014.
- YU, Y. et al. Anti-inflammatory Effects of Curcumin in Microglial Cells. *Front Pharmacol*, v. 9, p. 386, 2018.
- YU, W. J. et al. Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *Nanotoxicology*, v. 8 Suppl 1, p. 85-91, 2014.
- ZENG, J. et al. A nanoencapsulation suspension biomimetic of milk structure for enhanced maternal and fetal absorptions of DHA to improve early brain development. *Nanomedicine*, v. 15, n. 1, p. 119-128, 2019.
- ZHANG, F.; JIANG, L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, v. 11, p. 243-56, 2015.
- ZHANG, L. et al. Curcumin Improves Amyloid beta-Peptide (1-42) Induced Spatial Memory Deficits through BDNF-ERK Signaling Pathway. *PLoS One*, v. 10, n. 6, p. e0131525, 2015.
- ZHANG, L. et al. Gestational exposure to titanium dioxide nanoparticles impairs the placentation through dysregulation of vascularization, proliferation and apoptosis in mice. *Int J Nanomedicine*, v. 13, p. 777-789, 2018.
- ZHAO, Z. et al. Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019.
- ZHOU, J. et al. Curcumin inhibits placental inflammation to ameliorate LPS-induced adverse pregnancy outcomes in mice via upregulation of phosphorylated Akt. *Inflamm Res*, v. 66, n. 2, p. 177-185, 2017.
- ZHOU, Y. et al. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J Control Release*, v. 270, p. 290-303, 2018.

ANEXOS

Parecer de aprovação do Comitê de ética no Uso de Animais da UNIPAMPA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200. E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 011/2018

Título: Investigação dos efeitos de nanocápsulas poliméricas sobre o sistema reprodutivo de machos e fêmeas e sobre a gestação em roedores.

Data da aprovação: 12/06/2018

Período de vigência do projeto: 12/06/2020

Pesquisadores(a): Sandra Elisa Haas

Campus: Uruguaiiana

Telefone: (55) 996511984

E-mail: sandra.haas@gmail.com

| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa |
|-----------------------|---------------------------|
| Espécie/Linhagem/Raça | Ratos Wistar |
| Nº de animais | 150 e 104 |
| Peso/Idade | 250 g / 60 dias |
| Sexo | Machos e Fêmeas |
| Origem | Biotério Central da UFSM |

Vanusa Manfredini
Profª. Drª. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA