

PONTÍFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

MAIANA PIOVESAN DE MELO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO DE
TACROLIMUS EM COMPÓSITOS DE PLGA E POLIPIRROL**

Porto Alegre, RS, Brasil

2015

MAIANA PIOVESAN DE MELO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO DE
TACROLIMUS EM COMPÓSITOS DE PLGA E POLIPIRROL**

Orientadora: Nara Basso
Co-Orientadora: Marlise Araújo

Dissertação de Mestrado
Profissional a ser apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Farmacêutica – PUCRS
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de **MESTRE**.

Porto Alegre,

2015

MAIANA PIOVESAN DE MELO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE
TACROLIMUS EM COMPÓSITOS DE PLGA E POLIPIRROL**

Dissertação de Mestrado
Profissional a ser apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia
Farmacêutica – PUCRS como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
MESTRE.

Porto Alegre

2015

*"A coragem é a primeira das qualidades
humanas porque garante
todas as outras."*

Aristóteles

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha avó Adélia (*in memoriam*), por ter me deixado a maior herança que uma avó pode deixar para uma neta: a inquietação pelo saber.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS pelo dom da vida, e a tudo que isso implica.

Agradeço a minha avó Adélia (*in memorian*), pelo incrível exemplo de mulher, mãe, avó e eterna incentivadora.

Agradeço aos meus pais, Ana Glória e João por terem confiado em mim e me proporcionarem a oportunidade de continuar estudando.

Agradeço a minha irmã, Gliciana e ao meu Cunhado Luis Augusto, pelos válidos conselhos, suporte emocional, palavras de apoio. Vocês são a minha base.

Agradeço a minha orientadora Nara, pela paciência, compreensão e por ter me acolhido tão bem em seu grupo de pesquisa.

Agradeço a minha co-orientadora Marlise pelas contribuições ao longo do projeto.

Em especial, agradeço a Cristhiane, uma vez que esse trabalho não teria sido realizado sem sua essencial contribuição. Muito obrigada por sua dedicação, paciência, conhecimento, pelos válidos conselhos, pela companhia nos dias de laboratório e pelas longas conversas. Às vezes DEUS coloca anjos em nosso caminho e você foi um deles.

Agradeço as amigas Rita, Fernanda e Renata pelo suporte técnico, pelo carinho, pelo interesse por meu trabalho, pelos abraços apertados de todos os dias e por estarem sempre prontas a me ajudar.

Em especial, agradeço a Marina pela sua inacreditável generosidade em dividir comigo um pouquinho de seu enorme conhecimento. Seu apoio e contribuição foram essenciais para meu trabalho.

RESUMO

A reparação de nervos periféricos lesionados é uma das tarefas mais difíceis na neurocirurgia. Entre as técnicas utilizadas destaca-se a utilização de tubos artificiais para orientar o nervo durante o processo de regeneração. A preparação de compósitos baseados em polímeros biodegradáveis e polímeros condutores, associados a fatores de crescimento, têm sido proposta como uma abordagem promissora para melhorar a regeneração de nervos periféricos lesionados. Porém, deve ser considerado que durante o processo de regeneração é necessário ter um controle sobre a dosagem e o tempo de liberação do fármaco em questão para não prejudicar o processo de recuperação. Assim, neste trabalho foram preparadas membranas baseadas em PLGA (poli-ácido láctico-co-glicólico), polipirrol (PPy) e Tacrolimus como fator de crescimento. Foi avaliado o processo de degradação e a relação entre a composição de membranas de PLGA/PPy/Tacrolimus com a liberação do fármaco nos primeiros dias de incubação. Foi verificado que membrana com maior quantidade de PLGA, mais espessa, resultou numa menor perda massa e retardou a liberação do tacrolimus. Neste trabalho de pesquisa membranas de PLGA contendo nanofibras de polipirrol (PPy) e Tacrolimus, como fator de crescimento, foram preparadas por meio da metodologia da evaporação do solvente. O processo de degradação e a liberação do fármaco foram avaliados durante 28 dias de incubação. Foi observado que membranas com uma maior concentração do PLGA.

Palavras Chaves: Regeneração Nervosa, Tubulização, PLGA, Tacrolimus, Polipirrol.

Abstract

The repair of injured peripheral nerves is one of the most difficult tasks in neurosurgery. Among the techniques used is distinguished using the artificial tube for nerve guidance during the regeneration process. The preparation of composites based on biodegradable polymers and conducting polymers related to growth factors, have been proposed as a promising approach for improving regeneration of injured peripheral nerves. However, it should be considered that during the regeneration process is necessary to have a control over the dosage and the time of release of the drug in question not to jeopardize the recovery process. In this work were based membranes prepared PLGA (lactic-co-glycolic poly-acid), polypyrrole (PPy) and Tacrolimus as a growth factor. Was reported as a factor of the process of degradation and the relationship between the composition of membrane PLGA / PPy / Tacrolimus with the release of the drug in the first days of incubation. It was found that membranes with higher PLGA thicker, resulting in a lower weight loss and delayed release of Tacrolimus. In this work PLGA membranes containing search polypyrrole nanofibers (PPy) and Tacrolimus, as a growth factor, were prepared by the solvent evaporation method. The process of degradation and drug release were assessed 28 days of incubation. It was observed that membranes with a higher concentration of PLGA.

Key Words: Nerve regeneration, tubing, PLGA, growth factor, Polypyrrole.

LISTA DE ABREVIATURAS

FCN - Fator de crescimento nervoso

FK506 - Tacrolimus

MEC - Matriz extracelular

PLGA - poli-ácido láctico-co-glicólico

PPy - polipirrol

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP- Sistema Nervoso Periférico

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema representativo do neurônio.....	14
Figura 2: Esquema representativo do impulso nervoso.....	15
Figura 3: Processo de regeneração nervosa.....	16
Figura 4: Representação da técnica de tubulização.....	19

SUMÁRIO

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Histologia do sistema nervoso periférico	14
1.2 Lesão e regeneração de nervo periférico	15
1.3 Técnicas de reconstrução	17
1.4 Tubulização	18
1.5 Biomateriais	20
1.5.1 PLGA - poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)	22
1.5.2 Polipirrol	23
1.6 Tacrolimus	24
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivos gerais	29
3.2 Objetivos específicos	29

Capítulo 2

4. ARTIGO CIENTÍFICO	31
----------------------------	----

Capítulo 3

5. DISCUSSÃO GERAL	50
6. REFERÊNCIAS.....	53

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histologia do Sistema Nervoso Periférico

O sistema nervoso periférico (SNP) está localizado fora do sistema nervoso central (SNC) e inclui os nervos cranianos, que emergem do encéfalo, os nervos espinhais, que partem da medula espinhal, e os gânglios associados a eles. O SNP é uma via de comunicação entre o SNC e o organismo e conduz tanto informações sensitivas (aférentes), como motoras (eferentes), sendo, portanto, classificados como nervos mistos (Amabis, *et. al.*, 2001; Rustemeyer, *et. al.*, 2010).

A unidade funcional do nervo periférico é o neurônio (Figura 1), constituído por: dendritos, corpo celular, axônio e terminais pré-sinápticos (Siqueira, 2007).

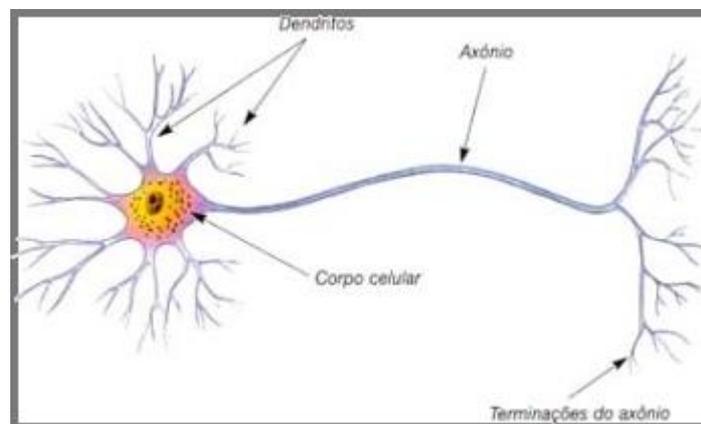


FIGURA 1. Esquema representativo do neurônio

Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Complete_neuron_cell_diagram_pt.svg Acessado em 18/10/2014.

Existem neurônios envoltos por uma camada de mielina, produzida pelas células de Schwann, e neurônios não mielinizados. Nos mielinizados existem estreitamentos denominados nódulos de Ranvier onde ocorrem as trocas iônicas na condução saltatória do estímulo nervoso (**figura 2**) (JUNIOR, R.M; AZZE, R.J).

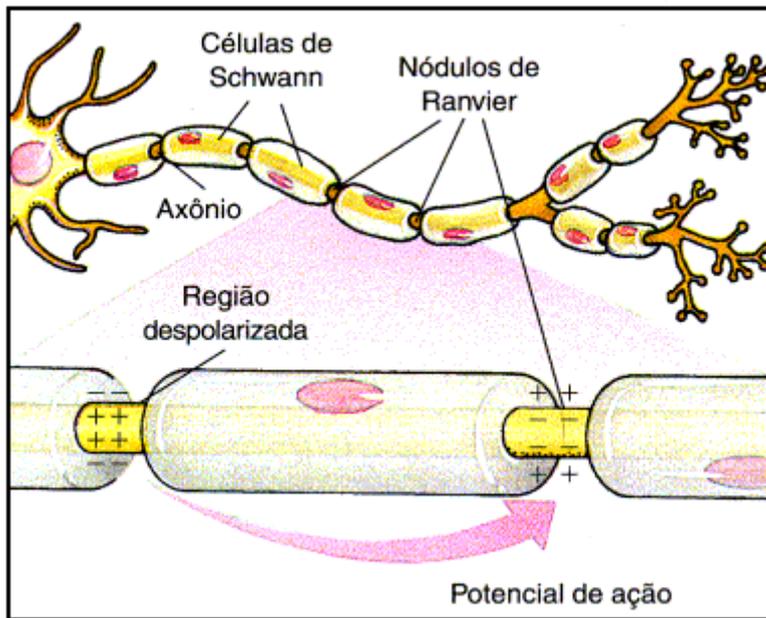


FIGURA 2. Esquema representativo do impulso nervoso.

Fonte: AMABIS, José Mariano; MARTHO, Gilberto Rodrigues. *Conceitos de Biologia*. São Paulo, Ed. Moderna, 2001. vol. 2.

1.2 Lesão e regeneração de Nervos Periféricos

Como os nervos do Sistema Nervoso Periférico são extensões do Sistema Nervoso Central e são responsáveis pela integração das atividades das extremidades, em suas funções sensitiva e motora, estes são suscetíveis aos mesmos traumas que afetam os outros tecidos. Por esse motivo, a interrupção da continuidade da estrutura do nervo por algum tipo de trauma, resulta na parada de transmissão de impulsos nervosos e na desorientação de suas atividades (JUNIOR, R.M; AZZE, R.J.).

Grupos de fibras nervosas, em diferentes níveis, podem ser lesados por trauma mecânico, térmico, químico, por isquemia entre outros; o prognóstico da lesão depende tanto do mecanismo do trauma, quanto do nível em que a estrutura nervosa foi lesada. Após o nervo sofrer um trauma, ocorre o processo degenerativo em alguns milímetros próximo ao local da lesão (JUNIOR, R.M; AZZE, R.J.).

As lesões no tronco do nervo podem ter consequências funcionais e mudanças de vida para o indivíduo devido à perda sensorial e motora, dor e desconforto. Com a desnervação, o tecido muscular sofre alterações histológicas a partir da terceira semana e rapidamente se tem atrofia (Batista, 2009). Após 2 anos, as fibras podem

fragmentar e desintegrar. No primeiro mês há uma perda no peso muscular de 30% a 60% no segundo mês e, com a atrofia muscular, essa perda chega de 60% a 80% em 4 meses (Shaocheng zhang, et. al., 2012).

A Figura 3 mostra um nervo lesionado. Durante a regeneração, as células de Schwann em desenvolvimento formam as bandas de Büngner que são condutos longitudinais internos das células de Schwann que estão em crescimento. As células de Schwann são células que envolvem os axônios dos neurônios dentro dos nervos periféricos. Se o local não sofrer uma intervenção cirúrgica, as células do tecido endotelial, ou seja, células externas ao nervo irão fagocitar as células nervosas, dificultando a regeneração.

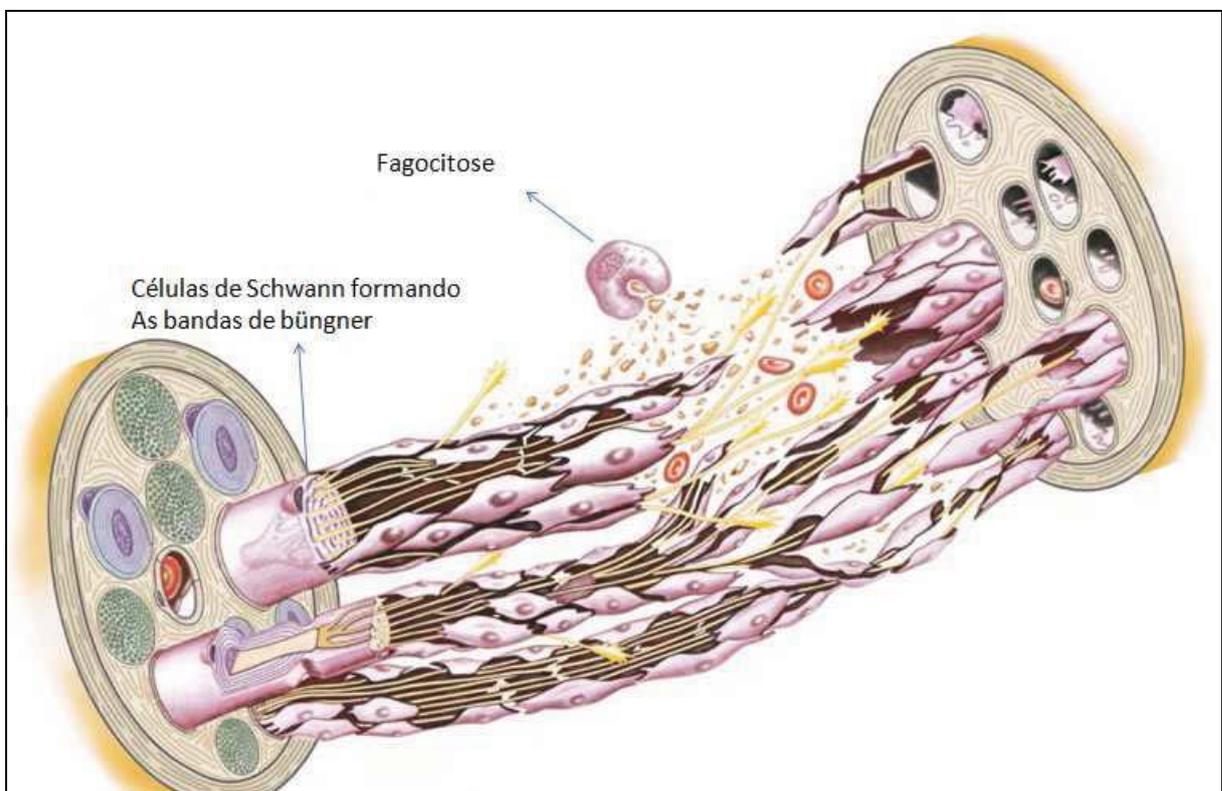


Figura 3. Processo de regeneração nervosa

Fonte: JUNIOR, R.M; AZZE, R.J. Atualização em Traumatologia do Aparelho Locomotor. Lesão dos Nervos Periféricos. Ceibra, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, pág 10. Disponível em: www.ronaldozze.com.br/fasciculo/fasciculo3.PDF Acessado em 24/11/2013

Sem um invólucro, ocorrerá o crescimento desordenado do nervo, formando neuromas, que são regiões com alta densidade de ramificações nervosas que causam dor ao paciente.

Um enxerto tubular juntamente com uma estrutura fibrilar é importante devido às semelhanças aos tecidos biológicos naturais, e essa semelhança pode vir a

favorecer o tratamento e a aceitação do material pelo organismo (Leung, V, 2011; Spivey, E.C. *et.al*, 2012).

1.3 Técnicas de Reconstrução

Quando a estrutura biológica de um órgão ou tecido não pode ser reparada, a alternativa viável para o restabelecimento das funções normais do paciente é repô-la com um implante construído a partir de um biomaterial (Shin, H. *et. al*, 2003).

Uma lesão de nervo periférico pode ser tratada através de reconstrução por neurólise, suturas, enxertos e outras formas. A neurólise é o procedimento cirúrgico de liberação e descompressão de um nervo periférico submetido à compressão que pode causar lesão mecânica ou isquêmica.

As reconstruções também podem ser realizadas através de suturas perineurais, epiperineurais e epineurais internas e externas. O método de sutura epineural é o mais tradicional, sendo de fácil realização e sem trauma, mas não assegura uma correta junção das estruturas internas fasciculares devido ao mau alinhamento destas.

O reparo neural, deve ser realizado logo após o trauma, preferencialmente nas primeiras seis horas. Toby et al. (2011) verificaram que o retardo no reparo neural de uma a duas semanas está associado a maior rigidez e, conseqüentemente, maior tensão na linha de sutura. Além disso, ocasionam piores resultados, maior tempo para recuperação e retorno às atividades de vida diária e trabalho.

Os enxertos de nervo também são muito utilizados para o reparo cirúrgico. Esse método é proposto como escolha, quando a sutura do nervo não for possível sem uma tensão indevida. Estes podem ser obtidos da mesma pessoa (autoenxerto), de outro ser humano (aloenxerto) ou de outra espécie (xenoenxerto). O nervo mais utilizado para enxerto é o nervo sural. Os enxertos são ligados aos fascículos correspondentes e suturados com monofilamento de *nylon* com suturas epineurais (Junior, R.M; Azze, R.J.; Dahlin, I. B, 2008).

Há vários tipos de enxerto de nervo: cabos, tronco e enxerto de nervo vascularizado, enxerto nervoso livre, enxerto de nervo interfascicular (Siqueira, R., 2007).

Quando o enxerto de nervo não é possível, um outro material a ser usado é o enxerto de músculo. Uma desvantagem da técnica é o local fornecedor de tecido, mas

essa técnica pode ser adicionada ao arsenal dos cirurgiões no reparo do nervo periférico, especialmente para se construir uma ponte sobre lesões curtas ou quando os autoenxertos de nervos não puderem ser empregados(Siqueira, 2007)..

Apesar dessas técnicas de reparo de uma lesão de nervo periférico serem ainda muito utilizadas, ainda há intercorrências comuns que podem ocorrer após uma intervenção cirúrgica. Neuroma doloroso no local doador de enxerto nervoso, tensão na linha de sutura levando a um aumento na formação de tecido cicatricial, dificultando a regeneração axonal e hematoma no local do enxerto podendo destruir o mesmo, sendo necessária, nesse caso, uma revisão do reparo para evacuação do hematoma e inspeção do enxerto para eventualmente repetir o procedimento cirúrgico (Shaochengzhang, *et. al.*; 2012) aumentando assim a agressão ao paciente.

Entretanto, quando ocorre a perda de tecido nervoso não é possível realizar a ligação terminal entre os cotos proximal e distal, pois origina-se um “gap” (espaço), sendo necessário tensionar o nervo, provocando microlesões no mesmo. Para Ljke-ma-Paassen (2004) as tensões elevadas nas extremidades unidas podem provocar efeitos inibitórios na regeneração neural, provavelmente devido à isquemia. Assim, muitas vezes a técnicas cirúrgicas supracitadas não podem ser aplicadas.

Sendo assim, para minimizar esses danos e proporcionar métodos mais precisos para as intervenções cirúrgicas, uma vez que a simples ligação dos cotos lesionados não garante o sucesso da reinervação, várias técnicas vêm sendo estudadas a fim de aumentar a taxa de regeneração nervosa, proporcionando assim maior assertividade na aproximação dos cotos e seu alinhamento. Dentre essas, estão disponíveis técnicas moleculares e celulares aliadas à nanotecnologia para produção de tubos, o que melhora consideravelmente as taxas de regeneração das técnicas operatórias (Sariguney *et. al.*, 2008; SHORES, 1996).

1.4 Tubulização

A técnica de tubulização vem sendo bastante estudada com a finalidade de minimizar as seqüelas de uma lesão muscular. A técnica de tubulização ou entubulação, consiste em um procedimento cirúrgico no qual os cotos do nervo seccionado são introduzidos e fixados em uma prótese tubular com uma lacuna mantida entre as extremidades nervosas para proporcionar um ambiente favorável

para o crescimento do nervo (Sebben, 2011), proporcionando ainda o direcionamento do crescimento nervoso das extremidades rompidas ou seccionadas (Oliveira, *et al.*, 2004; Ichihara *et al.*, 2008), conforme ilustrado na figura 4.

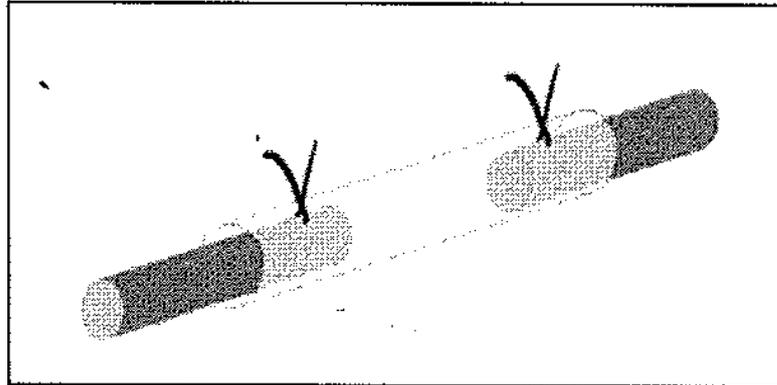


Figura 4 – Representação da técnica de tubulização. Ambas as extremidades nervosas são suturadas às paredes do tubo, que realiza a ligação entre os cotos seccionados.(OLIVEIRA; PIERUTI;PEREIRA, 2004)

O uso de tubos para guiar o crescimento axonal é hoje clinicamente aprovado e utilizado como método alternativo para autoenxerto podendo ser otimizado com a adição de fatores neurotróficos bem como componentes da matriz extracelular (MEC). Há várias vantagens da técnica de tubulização em relação ao uso de enxertos em geral, as quais pode-se citar: limitado número de infiltração miofibroblástica, reduzida formação de neuroma e tecido cicatricial, redução de crescimento lateral com espalhamento do material nervoso. Além disso, há a formação de um ambiente favorável para a concentração de fatores neurotróficos. É justamente esta última vantagem que chama a atenção e concentra os esforços de muitos pesquisadores atualmente, já que a elucidação de diferentes rotas de regeneração nervosa proporcionou e proporciona a descoberta e busca por novas drogas que atuem nessas vias (Dahlin, I. B., 2008; Rustemeyer *et al.*, 2010; Siqueira, R., 2007).

Desde a década de 1960, tubos confeccionados de polímeros bioreabsorvíveis, ganharam uma importância crescente na área médica, sendo utilizados em um amplo número de aplicações no corpo humano, tais como: suturas cirúrgicas, sistemas para liberação controlada de droga e dispositivos ortopédicos. Atualmente

fazem parte do cotidiano dos centros cirúrgicos no mundo inteiro (BARBANTI, S.H, 2005).

Ao encontro dos tubos confeccionados com polímeros bioreabsorvíveis, a técnica de tubulização também vem sendo associada ao uso de fármacos e também de células, que são introduzidas no interior do tubo com o objetivo de melhorar a taxa de regeneração. Quando os biomateriais poliméricos são combinados com fatores neurotróficos, ocorre a formação de um microambiente que estimula o processo de regeneração nervosa. Desse modo, o foco principal das pesquisas envolvendo regeneração nervosa e tubulização está na busca por alternativas que ofereçam resultados melhores ou semelhantes àqueles obtidos com o enxerto autólogo, porém livre de suas desvantagens (Oliveira *et. al.*, 2012).

Dessa forma, a tubulização proporciona um meio de concentrar esses fármacos diretamente no tecido nervoso lesado, sendo extremamente útil no sentido de chegar a taxas mais elevadas de regeneração nervosa. Mesmo assim, ainda não há resultados consistentes da tubulização, se comparada ao autoenxerto. Assim, com a finalidade de cada vez mais aumentar as taxas de regeneração nervosa a partir da melhora dos próprios tubos, alguns itens devem ser observados: apresentar baixa resposta imune, ser biodegradáveis (para evitar segundo acesso cirúrgico para retirada do tubo, inflamação crônica e dor), limitar infiltração tecidual, mas permitir entrada de nutrientes, se possível sem permitir sua saída, e ter um suporte mecânico adequado. É importante ressaltar que nos casos em que há extensa perda de substância nervosa, a técnica mais indicada é o transplante de enxerto autólogo, sendo considerado o procedimento padrão, mas sempre levando em consideração as desvantagens do uso desta técnica (Dahlin, I. B., 2008; Rustemeyer *et. al.*, 2010; Siqueira, R., 2007).

1.5 Biomateriais

A definição de biomateriais mais utilizada e aceita é da Conferência de Consenso de Biomateriais para aplicações clínicas, a qual define um biomaterial como toda substância (exceto drogas) ou combinações de substâncias, de origens sintéticas ou naturais, que durante um período de tempo indeterminado é empregada como um

todo ou em parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição para qualquer tecido, órgãos ou funções corporais (Williams DF, 2008).

A inexistência de materiais de sutura adequados que fossem comparados à auto enxertia de nervo levou a testes de vários tipos de materiais para a formação do tubo (Costa, 2001).

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos a fim de avaliar o material mais apropriado para a formação dos tubos. Através desses estudos, tornou-se evidente que o tipo de material formador do tubo teria influência direta na regeneração nervosa. Substitutos de nervos não absorvíveis permanecem no local levando a uma reação e conseqüentemente levando a formação de tecido cicatricial, o que dificulta a regeneração neural e a recuperação funcional do nervo (Mackinnon et al., 1984).

A alternativa encontrada, um substituto absorvível, teria o mesmo objetivo de unir os cotos proximais e distais e auxiliar o crescimento axonal, entretanto sem causar impactos negativos ao paciente. Nesse aspecto, torna-se essencial conhecer as propriedades dos materiais utilizados: tensão do material, toxicidade e tempo de absorção (Costa, 2001).

Os tubos podem ser de natureza sintética, podendo ser biodegradáveis ou não biodegradáveis, e biológicos. Entre biodegradáveis e não biodegradáveis, os tubos sintéticos geralmente são feitos de materiais como acrílicos, silicone, copolímero poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, polipirrol (PPy), entre outros. Já os tubos biológicos são geralmente provenientes de colágeno, submucosa de intestino delgado e veia (Dahlin, I. B., 2008; Makadia *et. al.*, 2011).

Em relação aos tubos fabricados com materiais não-absorvíveis, Merle et al, relataram casos clínicos com tubos de silicone onde os pacientes apresentaram evolução com piora da função neural por compressão, o que obrigou a retirada dos tubos por intervenção cirúrgica (Merle et al, 1989). Isso acontece, pois os tubos que não são absorvíveis permanecem no local ocasionando uma reação corpo-estranho no organismo, ocasionando assim, formação de tecido cicatricial o que dificulta a regeneração neural e a recuperação funcional do nervo (Cunha, 2013).

Já os materiais biodegradáveis, podem ser naturais ou sintéticos sendo degradados in vivo, são biocompatíveis e toxicologicamente seguros onde são eliminados pelas vias metabólicas normais. Quando os tubos são biodegradáveis, há a vanta-

gem, de que após o tempo de reabsorção não restará mais nenhum resíduo do tubo no local da lesão, evitando que se faça um segundo procedimento cirúrgico ou evitando complicações como a dor crônica (Dahlin, I. B., 2008; Makadia *et. al.*, 2011).

1.5.1 PLGA - Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

O PLGA é um copolímero sintético composto das unidades monoméricas de Poli (ácido glicólico) - (PGA) e poli (ácido láctico) - (PLA). É um polímero biodegradável, biocompatível e bioabsorvível. Devido a essas características, este polímero está muito presente nas pesquisas de liberação controlada de fármacos, como agente transportador de proteínas e até mesmo no transporte de moléculas de DNA (Makadia, H. K; Siegel, S. J, 2011). Seus componentes PGA e PLA são os materiais preferidos na fabricação de substratos para o transplante de células na engenharia de tecidos (Sultana, N.; Khan, T.H, 2012).

O uso de copolímero poli (láctico-co-ácido glicólico), PLGA, vem sendo bastante utilizado nas técnicas de tubulização para regeneração muscular, pois faz parte da família dos polímeros biodegradáveis com boa resistência mecânica e altamente biocompatível e bioabsorvível tornando-se bastante promissor, pois sofre degradação por hidrólise, não envolvendo atividade enzimática, gerando produtos que são absorvidos pelo organismo, seus monômeros o ácido láctico e o ácido glicólico. Este tem sido utilizado pela baixa toxicidade, baixa capacidade alergênica, além de ser facilmente processado em diferentes dispositivos (Makadia *et. al.*, 2011; Motta *et. al.*, 2006).

Além das vantagens citadas acima, o copolímero PLGA pode variar a proporção entre suas unidades monoméricas e assim variar e otimizar o tempo de degradação do material conforme a necessidade e especificidade da aplicação, já que o PLA é menos hidrofílico, absorve menos água e conseqüentemente degrada mais lentamente (Jain, 2000; Rezende *et al.*, 2005; Motta e Duek, 2006). Esse menor tempo de degradação, implica em uma menor probabilidade de reações adversas uma vez que o restante dos polímeros que possuem maior tempo de degradação podem liberar fragmentos cristalinos (Motta e Duek, 2006).

Essas características distintas dos monômeros constituintes do PLGA o fazem um atraente copolímero para a fabricação de “suportes” com os mais diferentes tempos

de degradação, permitindo explorar o melhor tempo para o efeito terapêutico do “suporte” conforme cada necessidade clínica, e assim, proporcionando a fabricação de materiais de rápida até lenta degradação (Fialho et al., 2003; Barbanti et al., 2005).

Os implantes absorvíveis, como os de PLGA, são importantes porque permitem que as células cresçam e se organizem enquanto o polímero se degrada. Posteriormente os produtos da degradação são eliminados do organismo pelas vias metabólicas, enquanto ocorre um crescimento natural do tecido, não sendo necessária uma nova intervenção cirúrgica para sua remoção do implante (Jain, R, 2000; Rezende, C.A, 2005).

1.5.2 Polipirrol

Os polímeros estruturados em forma de fibras estão se tornando cada vez mais atraentes, pois em geral a forma de fibra é uma estrutura que apresenta semelhança em relação aos tecidos biológicos fibrosos naturais. Essa semelhança pode vir a favorecer o tratamento e a aceitação do material pelo organismo (Leung, V. 2011). Assim sendo, as nanofibras são as estruturas mais desejáveis para as aplicações biomédicas, principalmente para a engenharia de tecidos (Yoo, H.S.2009).

A característica do tecido humano responder a estímulos elétricos faz dos polímeros condutores um material interessante para as mais variadas aplicações nas áreas biomédicas (Guimard, N.K.; 2007). Neste trabalho, escolhemos o emprego do polipirrol em forma de nanofibras devido a sua estrutura assemelhar-se a encontrada nos tecidos humanos e por ser considerado um polímero condutor, biocompatível e de baixa toxicidade.

O material Polipirrol (PPy) está sendo bastante explorado em virtude de suas propriedades físico-químicas como capacidade de troca-iônica, biocompatibilidade, fácil síntese, potencial para ter grande área superficial, além da possibilidade de ser polarizado eletricamente (Schmidt *et. al.*,2006) e potencial de alterar facilmente as suas propriedades elétricas, químicas e físicas para atender melhor a natureza da aplicação específica desejada. Estas características são úteis em muitas aplicações biomédicas, como, engenharia de tecidos, sondas neurais, dispositivos de liberação de drogas são alguns exemplos (Guimard *et al.*, 2007). O PPy pode ser sintetizado quimicamente ou eletroquimicamente, podendo apresentar-se em várias formas, in-

cluindo filmes finos, pós, partículas coloidais ou ocas e nanotubos (Slimane *et al.*, 2009; Jakab *et al.*, 2007).

Desse modo, o uso destes materiais de escala nanométrica está sendo bastante explorado porque fornece múltiplos estímulos para o processo de regeneração, como: guia de regeneração (topográfico), atividade neurotrófica em virtude da incorporação de substâncias que promovam o crescimento axonal às paredes do tubo, biodegradabilidade e atividade elétrica do tubo, atuando sinergicamente na regeneração nervos (Rustemeyer *et al.*,2010).

Ensaio em ratos demonstraram que a regeneração do nervo ciático de cobaias utilizando tubos de silicone revestidos com PPy apresentaram uma melhora mais significativa em relação aos que usaram tubo de silicone sem o PPy. Os resultados da pesquisa mostraram uma boa biocompatibilidade do PPy com o tecido nervoso periférico das cobaias, o que indica que o PPy pode ser um bom material para ser aplicado na regeneração de nervos periféricos danificados. O PPy não causou efeitos adversos sobre culturas celulares e animais testados. Os resultados não apontaram nenhuma evidência de toxicidade aguda e subaguda. As células de Schwann apresentaram uma melhor taxa de sobrevivência e proliferação quando em contato com o PPy (Wang, X.;2004).

1.6 Tacrolimus

O imunossupressor macrolídeo tacrolimus (FK506) é um poderoso e seletivo agente anti-linfócito T descoberto em 1984. Este é um fármaco freqüentemente utilizado por sua atividade imunossupressora em transplantes de órgãos. FK506 é uma molécula aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) purificada dos metabólitos do fungo *Streptomyces tsukubaensis* (Shores A., 1996). A FK506 atravessa a barreira hematoencefálica, e a descoberta de que há imunofilinas (como a FKBP-52) presentes no sistema nervoso introduz um novo nível de complexidade na regulação do processo de regeneração neural (Gold, B. G., 1997; Rustemeyer *et al.*,2010; Zheng *et al.*,2010).

A FK506 revela ações neuroprotetoras e neurotróficas em modelos experimentais por aumentar o alongamento nervoso e por acelerar a taxa de regeneração nervosa *in vivo* e *in vitro*. A administração sistêmica dose-dependente de FK506 também provou acelerar a resposta funcional em ratos pós-esmagamento de nervo ciático. Sua administração sistêmica, em conjunto com a técnica de tubulização ou utilização de enxerto autólogo, promove um aumento da taxa de regeneração do nervo e grau de recuperação funcional (Gold, B. G., 1997; Rustemeyer *et. al.*, 2010; Zheng *et. al.*, 2010). Chunasuwankul *et al.* investigou a aplicação sistêmica da droga com dose baixa (0,5mg.kg-1/dia) e demonstrou que o tacrolimus aumenta a recuperação de nervo periférico de roedor após transecção. Os dados apontam o tacrolimus como um eficaz agente neuroprotetor no reparo nervoso em pequenas concentrações.

Já foi descrito que a afinidade da FK506 é dependente de concentração. Ainda assim, os efeitos do espectro efetivo não são completamente conhecidos, mas há conclusões de que a administração intramuscular de baixa dose de FK506 após o transplante de enxerto nervoso pode fornecer regeneração nervosa funcional e morfométrica superior à verificada em isoenxertos ou aloenxertos sem tratamento com FK506 e quase comparável àquela em animais não-operados (RUSTEMEYER *et. al.*, 2010; GOLD, 1997; YU *et al.*, 2009).

O projeto de novos sistemas poliméricos biodegradáveis para a preparação de tubos artificiais, capazes de atuarem como guia para a regeneração nervosa exige que importantes características sejam consideradas: uma delas é que devem permanecer no organismo tempo suficiente para que o nervo lesado seja reconstruído, além de estimular a fibra nervosa a crescer de uma extremidade a outra a fim de acelerar a regeneração; outra característica importante é que durante o processo de degradação não deve ocorrer interação e compressão do nervo lesionado. Quando se tem a liberação de fatores de crescimento durante o processo de regeneração é necessário ter um controle sobre a dosagem e o tempo de liberação do fármaco em questão.

Assim, no presente estudo, foi realizada a incorporação do fármaco Tacrolimus em membranas poliméricas, que serão utilizadas em uma próxima etapa para confeccionar tubos e, desta forma, haverá uma liberação contínua do medicamento na medida em que o tubo for sendo degradado. Será avaliado o comportamento da libe-

ração *in vitro* do fármaco Tacrolimus/FK506, que atua como fator neurotrófico, a partir de membranas sintéticas de PLGA e PPy. O tubo, além de servir como matriz para o fármaco Tacrolimus, também auxiliará no processo de regeneração nervosa.

2. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho de pesquisa está inserido num projeto maior que está sendo executado desde 2012 em cooperação entre o grupo de pesquisa da FAQUI “Síntese de Materiais Nanoestruturado” e o da FAMED “Clínica Cirúrgica” coordenado pelo Prof. Jefferson Braga. O projeto de cooperação tem como objetivo desenvolver novos sistemas poliméricos para preparação de tubos que sirvam como guia e como estímulo para a regeneração de nervos periféricos.

O grupo de pesquisa já desenvolveu metodologia para a preparação de nanocompósitos de PLGA/PPy com o fator de crescimento FK506. Na continuidade do projeto é necessário fazer um estudo da cinética de liberação do fator de crescimento em função da espessura e estruturação das matrizes poliméricas preparadas

Espera-se preparar sistemas poliméricos capazes de promoverem a liberação contínua no local da lesão, que resulta num estímulo contínuo para a regeneração, considerando que a simples liberação do fármaco não garante a permanência do mesmo no sítio de lesão devido a difusão nos fluídos extracelulares.

Além do mais, na preparação dos sistemas poliméricos investigados neste projeto, tem sido considerada que a liberação do fármaco deve começar a partir do 14º dia. Nos primeiros quatorze dias após uma lesão com perda de substância ocorre uma tentativa de regeneração natural do corpo desencadeando um processo que chamamos de Degeneração Walleriana. Se o fator começar a ser liberado antes desse tempo, estudos mostram que isso afeta esse processo natural fazendo com que o fator atue, então, como inibidor da regeneração ao invés de estimular. Em outras palavras, faz-se necessário aguardar esse tempo para deixar o corpo reagir naturalmente e, após, atuar com fatores endógenos que possam auxiliá-lo nesse processo (Kline, et. al., 1982).

Para manter a concentração ideal dos fatores de crescimento durante todo o processo de regeneração do nervo, a liberação controlada destas proteínas - tanto ao que se refere à dosagem e ao tempo, quanto à localização exata das mesmas - é necessária para uma aplicação segura e mais eficiente.

Avaliar a relação da estrutura/morfologia com a taxa de liberação do fármaco é importante por que mostrará quais sistemas poliméricos são mais eficientes para preparação dos tubos que no futuro serão testados na regeneração de nervos periféricos *in vivo*.

4. Objetivos

4.1 Objetivos Gerais

Avaliar *in vitro* a biodegradação e o processo de liberação de fator de crescimento em membranas de compósitos de PLGA e nanofibras de PPy.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o processo de degradação de membranas de PLGA/PPy com a incorporação do fármaco FK506 por meio da variação na espessura e perda de massa da membrana .
- Relacionar o processo de liberação do fármaco Tacrolimus com a espessura e com a composição das membranas de PLGA/PPy-FK560.
- Avaliar a membrana mais adequada para utilização em tubos de reparo neural.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

4. Artigo Científico

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO DE TACROLIMUS EM COMPÓSITOS DE PLGA E POLIPIRROL

Manuscrito submetido à publicação no periódico Revista Brasileira de Ciências da Saúde

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO DE TACROLIMUS EM COMPÓSITOS DE PLGA E DE POLIPIRROL

Maiana P. Melo^a, Cristhiane A. Valente^c, Carlos E. Leite^d, Lucas D. Weber^b, Marlise A. Dos Santos^e, Jefferson B. da Silva^f, Nara R.S. Basso^{a,b*}

^aPrograma de Pós-graduação Profissional em Biotecnologia Farmacêutica, Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, 90160-092 Porto Alegre – RS, Brasil

^bFaculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, 90160-092 Porto Alegre – RS, Brasil

^cInstituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, 90160-092 Porto Alegre – RS, Brasil

^dInstituto de Toxicologia e Farmacologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grandedo Sul, 90160-092 Porto Alegre – RS, Brasil

^eFaculdade de Fármacia, Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, 90160-092 Porto Alegre – RS, Brasil

^fFaculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, 90160-092 Porto Alegre – RS, Brasil

A reparação de nervos periféricos lesionados é uma das tarefas mais difíceis na neurocirurgia. Entre as técnicas utilizadas destaca-se a utilização de tubos artificiais para orientar o nervo durante o processo de regeneração. A preparação de materiais baseados em polímeros condutores biodegradáveis associados com um fator de crescimento têm sido proposta como uma abordagem promissora para melhorar a regeneração de nervos periféricos lesionados. Este estudo investiga a liberação do fármaco (Tacrolimus) a partir de sistemas poliméricos baseados no PLGA (ácido poli-láctico-co-glicólico) e polipirrol visando o desenvolvimento de tubos artificiais para regeneração de nervo periférico.

Descritores: Regeneração nervosa, PLGA, fator de crescimento, polipirrol.

IN VITRO STUDY OF TACROLIMUS RELEASE FROM PLGA AND POLYPYRROLE COMPOSITES

Abstract

The repair of injured peripheral nerves is one of the most difficult tasks in neurosurgery. Among the techniques used there is the artificial tubes that guide the nerve during the regeneration process. The preparation of material based on biodegradable conducting polymers and a growth factor has been proposed as a promising approach for improving regeneration of injured nerves. This study investigates the drug (Tacrolimus) release from polymeric systems based on PLGA (poly-láctic-co-glicólico acid) and polypyrrole for development of artificial tubes for peripheral nerve regeneration.

Descriptors: Nerve Regeneration, PLGA, growth factor, Polypyrrole.

Introdução

A lesão de um nervo periférico gera muitos impactos negativos, tanto na vida profissional do paciente quanto nas atividades relacionadas ao lazer do mesmo. Embora os custos de lesões nervosas sejam um fardo para a saúde pública, principalmente a perda de produtividade, uma vez que um grande número de pacientes com lesões de nervos está em idade produtiva e esse tipo de lesão causa déficits na movimentação, sensibilidade e alterações autonômicas, originadas da interrupção funcional dos prolongamentos do nervo. Levando-se em consideração essas características, a recuperação de um nervo lesado leva tempo¹. Perante esse quadro, a regeneração nervosa tem sido amplamente estudada nas últimas décadas².

Troncos nervosos são estruturas muito delicadas, onde sua regeneração torna-se bastante complexa³, uma vez que compreende grande número de células nervosas e vasos sanguíneos que reagem à lesão. Várias técnicas de reconstrução são utilizadas, onde podemos citar a sutura direta, que visa à aproximação dos cotos a fim de proporcionar a passagem das fibras em regeneração e é sem dúvida a melhor e a mais simples maneira de reparar uma lesão de nervo periférico⁴. Entretanto, quando não é possível a aproximação direta dos cotos, devido a uma grande perda de substância do nervo, a técnica de auto enxerto é indicada. O enxerto implica na utilização de segmento de nervo retirado de um nervo sensitivo, geralmente o nervo sural, que sofrerá um processo de degeneração e funcionará apenas como conduto para que os axônios em regeneração atinjam o coto distal do nervo lesado^{5,6}.

Entretanto a simples ligação das extremidades lesionadas não é a garantia de uma boa reinervação, uma vez que esta não garante a orientação precisa dos cotos. Outro ponto a ser citado é o tamanho da lesão exposta, pois o sucesso da regeneração nervosa é inversamente proporcional ao tamanho da lesão⁷.

Nesse contexto, a técnica de tubulização ou entubulação, que consiste em um procedimento cirúrgico no qual os cotos do nervo seccionado são introduzidos e fixados em uma prótese tubular com uma lacuna mantida entre as extremidades nervosas para proporcionar um ambiente favorável para o crescimento do nervo, vem sendo cada vez mais estudada⁸. A regeneração dentro da prótese tubular é dependente da formação precoce de uma ponte não celular para ligar os dois cotos.

Esta ligação é composta por uma matriz que fornece o substrato inicial para a migração das células não-neuronais⁷.

Para garantir o sucesso da técnica, o material constituinte do tubo deve conter algumas características para assegurar que a regeneração nervosa seja realizada corretamente. O material deve ser biocompatível, uma vez que não deve causar nenhuma interação com o nervo, garantindo assim sua regeneração. Outra característica importante a ser citada é que o material deve durar o tempo necessário, em torno de 90 dias, para que todo o nervo lesado seja reconstruído novamente e deve estimular a fibras nervosas a migrarem de uma extremidade a outra, de modo a acelerar a regeneração. O tubo pode ser constituído de vários materiais, como por exemplo silicone associado à ácido poliglicólico, sendo estes os mais comumente utilizados na clinica médica, entretanto este tipo de material pode trazer alguns resultados indesejáveis, uma vez que o próprio tubo pode comprimir o nervo lesionado, causando uma degeneração tardia através da desmielinização do axónio⁷.

Vindo de encontro aos efeitos negativos desta técnica, polímeros bioabsorvíveis sintéticos vêm sendo cada vez mais estudados como agentes promissores na regeneração, uma vez que não interagem com o nervo lesado e são absorvidos pelo organismo após a reconstrução nervosa causando o mínimo ou nenhum dano as células neurais⁸.

Vários polímeros estão sendo testados para este fim, um deles é o PLGA (poli-ácido láctico-co-glicólico), pertencente à família dos polímeros biodegradáveis aprovados pelo FDA, sendo altamente biocompatível, que tem sido amplamente estudado na engenharia de tecidos. PLGA é mais popular entre os vários disponíveis polímeros biodegradáveis. Este polímero possui propriedades favoráveis de degradação e vem sendo explorado para a entrega de fármacos, bem como na regeneração de tecidos⁷.

Recentemente tem sido relatado que compósitos biocompatíveis preparados a partir de PLGA e do polímero condutor polipirrol (PPy) são materiais promissores para aplicação na engenharia neural, isto por que combinam a vantagem da condutividade elétrica e a biodegradabilidade, além de melhorar as propriedades mecânicas do PPy⁷.

O PPy é biocompatível, apresenta boa condutividade elétrica e fácil síntese. É um dos polímeros condutores mais estudados nos estudos *in vitro* e *in vivo* para regeneração nervosa e outras aplicações em engenharia de tecido, pois é capaz de gerar sinais elétricos para locais alvo e pode simultaneamente proporcionar suporte físico para o crescimento celular⁷.

Somando-se aos benefícios dos polímeros supracitados, uma abordagem promissora que vem ganhando espaço para melhorar a regeneração nervosa é a funcionalização do(s) polímero(s) condutor(es) com um fator de crescimento nervoso (FCN)⁹.

O fármaco Tacrolimus (TK560), muito utilizado como imunossupressor em pacientes transplantados, vem sendo bastante estudado na engenharia de tecidos uma vez que possui propriedades neuroregenerativas e neuroprotetoras. Portanto o desenvolvimento de Condutores Artificiais de Orientação Nervosa, associados a fatores de crescimento nervoso, vem tornando-se uma alternativa bastante atraente, pois são materiais que proporcionam múltiplos estímulos, tais como: orientação de contato, atividade neurotrófica, porosidade e atividade elétrica, contribuindo para a regeneração de feridas em tecidos nervosos⁹.

Porém, a dificuldade da ação do FCN está relacionada com a cinética de liberação, pois alguns sistemas exibem uma elevada taxa de liberação inicial o que pode prejudicar a regeneração. Nos primeiros dias da lesão já começam a aparecer os primeiros sinais da degeneração do nervo e a maior parte degenerada é removida até o 12-14º dia após a lesão¹. A presença do FCN nesse período inicial, pode provocar a contração do nervo ao invés de guiar a regeneração do mesmo através do tubo.

O nosso grupo de pesquisa vem preparando compósitos de PLGA e nanofibras de PPy contendo o fator de crescimento, o fármaco Tacrolimus (TK560), com o objetivo de preparar tubos que funcionem como guias para a regeneração de nervos. Tubos de biopolímero com nanofibras de polímero condutor e fator de crescimento permite a formação de microambiente que estimula o processo de regeneração nervosa. Pretende-se que a degradação do biopolímero controle a liberação do fármaco diretamente no tecido nervoso no período de tempo mais adequado durante o processo de recuperação.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o processo de degradação e a relação entre a composição de membranas de PLGA/PPy/Tacrolimus com a liberação do fármaco nos primeiros dias de incubação.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparação da Membrana

Síntese química do PPy

As reações para obtenção de nanofibras de polipirrol (foi destilado antes de sua utilização) ocorreram por meio da polimerização química oxidativa¹⁰⁻¹¹ e os detalhes do procedimento experimental são dados em VALENTE, C. A. 2014¹². Uma solução contendo $7,2 \times 10^{-3}$ mol de pirrol (Py) e $3,2 \times 10^{-2}$ mol do dopante APTS (ácido p-toluenosulfônico monohidratado), sob agitação na temperatura de 0°C, recebeu gota a gota uma solução de $12,3 \times 10^{-3}$ mol do agente oxidante (FeCl_3). Após 24h de reação o produto é filtrado e lavado com água destilada e etanol para a remoção das impurezas. O sólido preto de PPy é seco em estufa (80°C) e armazenado em dessecador. Todos os reagentes foram adquiridos através da Sigma-Aldrich.

Preparação dos filmes de PLGA/PPy/FK506

Filmes de PLGA/PPy/FK506 foram preparados por meio da metodologia da evaporação de solvente¹³ e o procedimento experimental adaptado de VALENTE, C. A. 2014¹². O PLGA utilizado foi o de razão 85:15 fornecido pela PURAC (PURASORB® PLG 8531; Holanda). Foram preparadas soluções de PLGA em clorofórmio (Sigma-Aldrich) com concentrações de 0,11 g/mL e 0,033g/mL para obter filmes com diferentes espessuras. Nas soluções de PLGA adiciona-se 10% de nanofibras de PPy (m/m) previamente sintetizadas. As soluções de PLGA/PPy são dissolvidas e misturadas em banho de ultrassom de 40 kHz (Unique, modelo USC-1600) por sete horas. Após, adiciona-se em cada solução de PLGA/PPy uma solução em clorofórmio do fármaco tacrolimus (FK506; pureza > 98,0%; Sigma-Aldrich) de concentrações

0,26 µg/mL ou 1,22 µg/mL. A solução final fica por mais uma hora em banho de ultrassom e depois de totalizar oito horas no banho de ultrassom as soluções de PLGA/PPy/FK506 são vertidas em placas de vidro petri (Ø 5,5 cm) e o solvente evaporado por 48h em temperatura ambiente em bancada de nível horizontal. Todos os materiais foram utilizados conforme recebidos.

Tabela 1: Membranas de PLGA/PPy/FK506 preparadas por evaporação do solvente

Amostras	Massa de PLGA	Massa de PPy	Massa de FK506
A	0,20 g	0,02g	1,30 µg
B	0,20 g	0,02g	6,09 µg
C	1,00 g	0,10g	1,30 µg

Degradação hidrolítica

Para uma avaliação mais próxima do comportamento de degradação de um material com potencial aplicação na área médica se faz necessário o uso de um protocolo que leve em consideração as condições mais próximas de pH do ambiente *in vivo*. Portanto, os testes de degradação *in vitro* hidrolítica dos materiais foram baseados na norma ASTM F1635 - 11 (2011)¹⁴.

A partir de cada uma das membranas preparadas (A, B e C) foram recortadas amostra com 0,5 cm de diâmetro, em triplicata, para cada um dos tempos avaliados. As amostras foram mantidas em 2 mL de solução tampão fosfato salino, PBS (pH = 7,4; Sigma -Aldrich), à 37 °C dentro de tubos de polipropileno de 15 mL em uma incubadora termostatzada com agitação de 60 rpm. As amostras foram removidas em tempos pré-determinados (1, 4, 7, 14, 21, 28 dias). A Tabela 2 apresenta a média das massas e espessuras iniciais das amostras incubadas.

Tabela 2: Massa e espessura inicial das membranas incubadas PLGA/PPy/FK506

Amostras	Massa (g)	Espessura (µm)
A	0,00263 ± 0,00028	102,4 ± 13,8

B	0,00288 ± 0,00052	112,3 ± 10,3
C	0,01266 ± 0,00207	384,5 ± 60,1

Adaptou-se uma mesa agitadora, modelo MA-140/CF e marca Marconi, para simular uma incubadora com controle da temperatura e poder manter os níveis de agitação e temperatura no interior do equipamento durante os testes.

Para medir as espessuras dos filmes pré e pós-períodos de degradação utilizou-se o aparelho medidor digital de espessura (MDE), marca Hanatek e modelo nº 8020. A incerteza estatística foi reduzida tomando um mínimo de dez medidas para cada amostra.

Para medir o pH das soluções utilizou-se pHmetro, marca Digmed e modelo DM-20.

Para as medidas das massas dos filmes utilizou-se uma balança analítica de 5 casas decimais, marca Mettler Toledo e modelo AG285, para uma maior precisão.

A perda de massa foi calculada através da Equação 1:

$$\% \text{ Perda de Massa} = \left(\frac{P_0 - P_t}{P_0} \right) \times 100$$

(1)

Sendo P₀ correspondente ao peso da massa antes do teste de degradação e P_t o peso da massa seca após cada tempo de degradação avaliado¹⁵.

Extração

Após a incubação, alíquotas do meio de incubação em cada um dos períodos avaliados em triplicata foram preparadas para análise em HPLC. Numa preparação típica, foram retirados 500 µL de amostra em um tubo de 2,0 mL e adicionados 1 mL de Acetato de Etila (grau HPLC; Merck). O tubo foi mixado por 1min e após foi centrifugado por 10 min a uma velocidade de 5000 rpm. Separou-se 0,8 mL da fase orgânica e a essa foram adicionadas 0,8 mL de Metanol (grau HPLC; Merck) sendo mi-

xado por 1min. Novamente centrifugou-se por 10min a uma velocidade de 5000 rpm onde separou-se 1,5 mL (2 x 0,750 mL). A amostra foi evaporada e reconstituída com 500 µL de metanol. Após a reconstituição as amostras foram mixadas por 1 minuto, filtrando-se as mesmas em membrana 0,45 µm (Durapore, Millipore®, Billerica, Estados Unidos) e transferindo 200 µL para vial para posterior injeção.

Para a preparação a obtenção da solução estoque de 5 µg/mL, pesou-se 500 µg do fármaco Tacrolimus em balança de 7 casas e colocou-se a barca de metal em um balão de 100 mL. Completou-se o volume com metanol grau HPLC. Tratou-se a solução estoque com a mesma técnica descrita acima para injeção.

Condições Cromatográficas

A determinação do analito de interesse, foi realizada através de Cromatografia Líquida de alta eficiência, utilizando HPLC, do inglês High-Performance Liquid Chromatography - UHPLC 1290/ MS 6460 TQQQ – Agilent Technologies no Instituto de Toxicologia e Farmacologia da PUCRS..

A coluna utilizada foi Zorbax-SB-C18 2,1x50mm 1.8 Micron (Agilent Technologies). As condições iniciais foram de 50:50 (v / v) fase móvel A: B. Após a injeção da amostra, a eluição foi realizada por meio de um gradiente de 50 a 100% de fase móvel B durante 1 min, seguido de 100% de fase móvel B, realizada por 30 segundos. Manteve-se a fase móvel a 0,6 mL / min, a uma temperatura de em 55 °C.

Após a corrida, a coluna foi reequilibradas para as condições iniciais e mantida durante 1,5 minutos antes da injeção seguintes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio de Degradação

O PLGA 85:15 é um polímero biocompatível adequado para ser utilizado como suporte na regeneração de nervo periférico pois permanece tempo suficiente para a recuperação nervosa, conforme trabalhos encontrados na literatura^{16,17}. Porém, quando é incorporado na membrana um fator de crescimento é desejável que a liberação comece somente a partir do 12-14^o, pois a liberação do fármaco antes

desse período pode prejudicar a recuperação da lesão. Assim, acompanhar a variação da massa e a espessura das membranas durante o período de degradação serve como um guia para conhecer a melhor composição a fim de que a liberação do fármaco seja impedida ou minimizada durante os primeiros dias de incubação.

Foram realizados ensaios de degradação em solução de PBS com as membranas A, B e C, com as especificações conforme exposto na tabela 1. A solução de PBS possui característica de simular o pH do corpo humano, assim pode-se aproximar de resultados *in vivo*¹⁸. Após cada período de incubação (1,4, 7, 14, 21 e 28 dias), o processo de degradação foi avaliado por meio da medida de espessura, perda de massa das membranas, bem como determinação do pH da solução de PBS.

As espessuras dos sistemas poliméricos preparados foram aferidas antes e após a degradação. A concentração de PLGA utilizada para preparar os compósitos de PLGA/PPy pode ser relacionada com a espessura das membranas e portanto pode ser usado como critério para avaliar a membrana mais adequada para a preparação dos tubos. As membranas A e B apresentaram praticamente a mesma espessura, enquanto que a C apresentou uma maior espessura. A partir dos resultados apresentados na Tabela 3 observa-se que para as 3 membranas ocorre um aumento da espessura até o 14º dia e depois uma diminuição. O processo de degradação do PLGA ocorre por uma reação de hidrólise, onde o mecanismo de degradação hidrolítica pode ser classificado como degradação de superfície, com perda de massa¹⁰ e redução de espessura. Porém a característica hidrofílica do PLGA, e a exposição em meio aquoso pode levar ao intumescimento das amostras na etapa inicial do processo, pois ao absorver água o filme acaba por dilatar. Um maior percentual no aumento da espessura foi verificado para a membrana que apresentou uma maior concentração do fármaco, indicando que a presença do FK506 pode facilitar o processo de intumescimento.

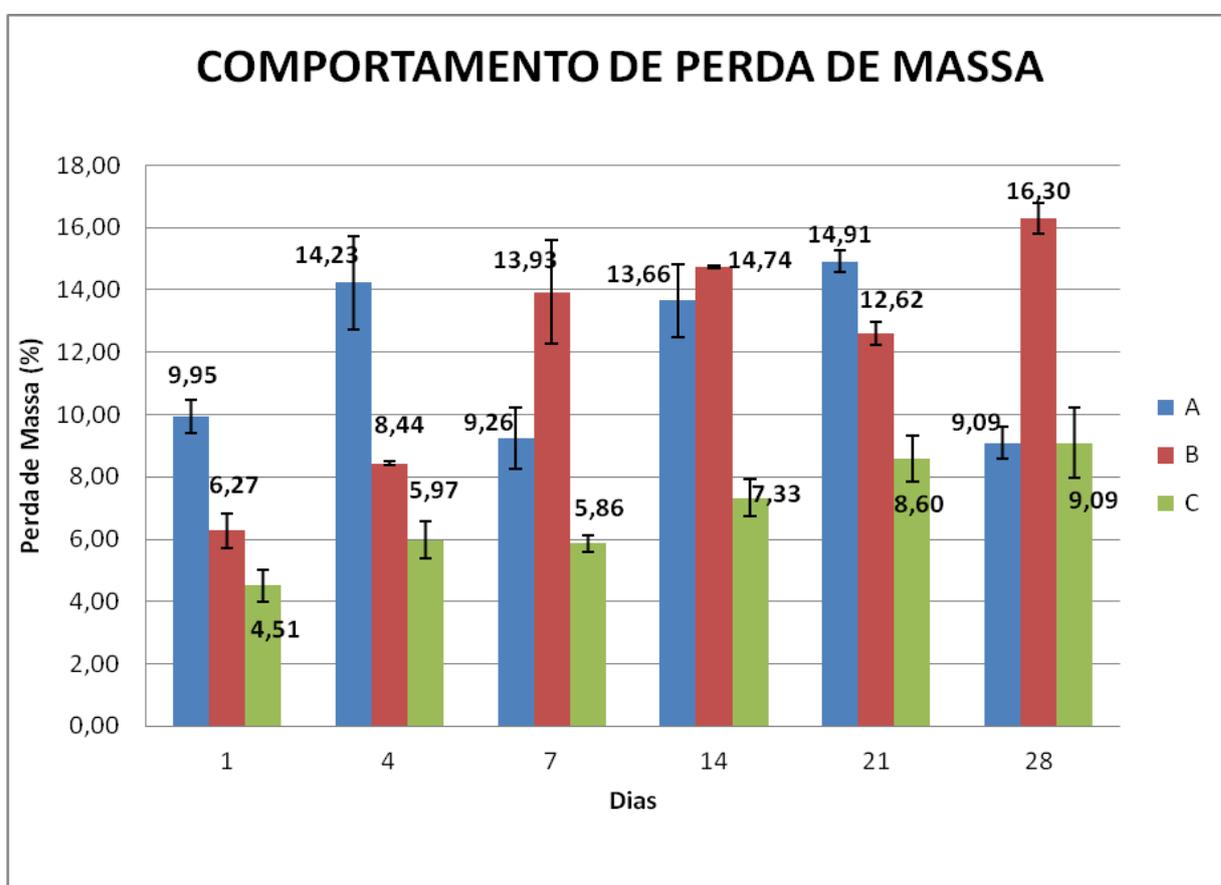
Tabela 3: Espessuras membranas A, B e C em micrometros (μm)

Dias	Membrana A	Membrana B	Membrana C
0	102,4 \pm 13,8	112,3 \pm 10,3	384,5 \pm 60,1
1	108,7 \pm 8,1	160,7 \pm 62,0	398,4 \pm 54,2
4	132,8 \pm 14,4	132,8 \pm 14,4	339,5 \pm 20,4

7	101,1 ± 7,6	119,0 ± 14,6	402,7 ± 41,6
14	110,1 ± 12,9	115,8 ± 15,6	411,2 ± 17,7
21	99,9 ± 7,3	127 ± 13,2	433,6 ± 92,5
28	97,2 ± 8,7	100,4 ± 9,5	360,4 ± 24,6

A figura 1 apresenta o gráfico da perda de massa das membranas A, B e C durante o período de degradação hidrolítica.

Figura 1: Comportamento de perda de massa



O desvio padrão associado às medidas de perda de massa é variado. Este resultado pode ser relacionado com a dificuldade de preparação das amostras de compósitos poliméricos por evaporação do solvente. Para as soluções mais diluídas, uma diferença de massa nas diferentes regiões de uma mesma membrana pode resultar num maior desvio padrão ou num comportamento anômalo da perda de massa, conforme foi verificado para as membranas A e B.

Uma maior concentração de PLGA (1,0g) resultou em membranas mais uniformes devido à facilidade de distribuição da solução polimérica na placa e assim uma tendência no gráfico de perda de massa é mais facilmente verificada. Porém, é possível verificar que a perda de massa da membrana C é cerca de 50% menor do que a verificada para as membranas A e B no 14º dia. Esse comportamento está diretamente ligado à espessura já que a membrana C, por apresentar uma maior concentração de polímero, conseqüentemente demora mais tempo para se degradar.

Os filmes foram degradados em 2 ml de solução tampão fosfato salino (PBS; pH ~7,4; à 37 °C e 60 rpm) e o pH do meio foi acompanhado em função do tempo de degradação. Os valores médios, de cada amostra em cada período de tempo são exibidos na Tabela 4.

Tabela 4: Evolução do pH da solução de degradação

pH	DIA(S)					
Amostras	1	4	7	14	21	28
A	7,40±0,04	7,39±0,02	7,60±0,02	7,53±0,02	7,51±0,01	7,44±0,14
B	7,39±0,01	7,38±0,03	7,55±0,01	7,52±0,02	7,49±0,02	7,41±0,12
C	7,43±0,07	7,39±0,02	7,32±0,07	7,29±0,07	7,23±0,12	7,42±0,13
BRANCO	7,46±0,02	7,48±0,01	7,59±0,01	7,56±0,01	7,55±0,01	7,54±0,01

Analisando a tabela 4 observa-se que não ocorreu mudanças significativas nos valores de pH das soluções de PBS após os períodos de degradação. O comportamento da solução PBS na presença dos filmes foi similar a solução branco, logo a degradação dos filmes até o período avaliado não acarretou em mudanças ao pH do meio. Diminuição acentuada no valor de pH é verificado somente após o início da clivagem das ligações dos grupos ésteres da cadeia principal do polímero resultando em ácido láctico e ácido glicólico¹⁹. Para o PLGA 85:15 este processo deve começar em torno da 8 semana¹⁷.

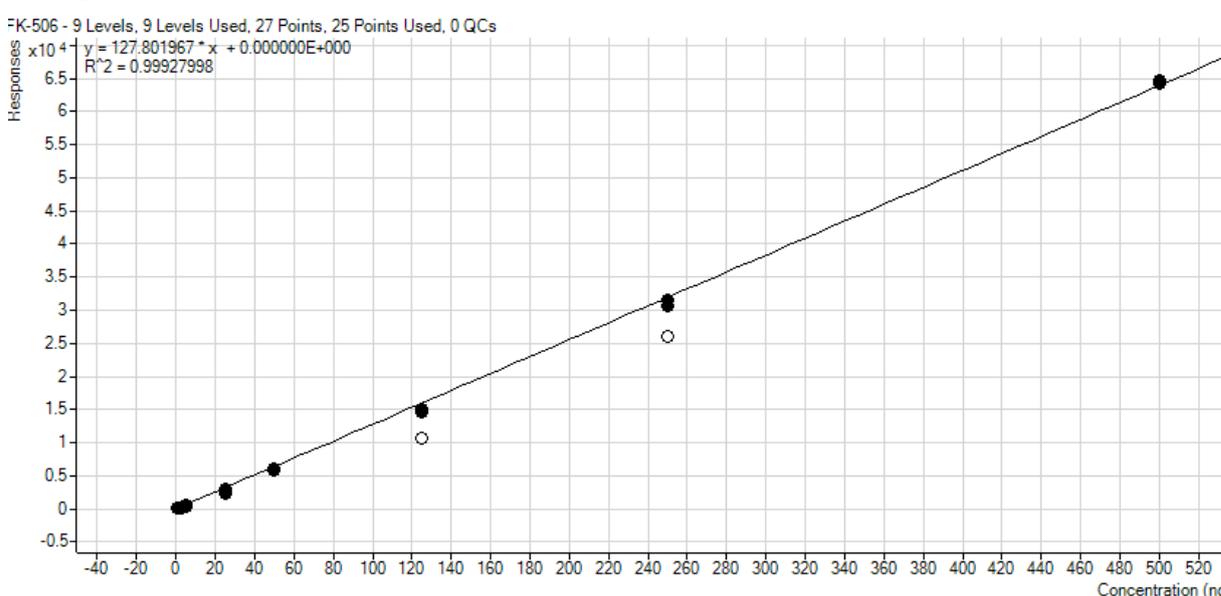
Avaliação da Liberação In Vitro de Tacrolimus

A liberação de Tacrolimus in vitro a partir das membranas foi avaliada por meio da determinação da concentração do fármaco na solução de PBS durante o período de

incubação. A análise da concentração de Tacrolimus liberada foi realizada por HPLC.

A fim de avaliar a linearidade do método, foi obtida a equação da curva analítica, com 7 pontos, por meio de regressão linear, no intervalo de concentração entre 0,5 a 500 ng/mL. O Coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,99928, Figura 2. Este valor indica a boa linearidade de resposta uma vez que demonstra que o método que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo específico.

Figura 2: Curva de linearidade



A Tabela 5 apresenta a quantidade de Tacrolimus que foi detectada na solução de PBS à medida que as membranas degradaram durante o período de incubação.

Tabela 5: Avaliação da liberação de FK506 nas membranas A, B e C em ng/mL

Dias	Membrana A	Membrana B	Membrana C
1	1,429295 ± 1,380091	18,67733 ± 4,469058	Não foi detectado
4	1,70356 ± 0,597626	14,6294 ± 3,380169	Não foi detectado
7	1,795071 ± 0,626278	14,16514 ± 1,683151	Não foi detectado
14	1,39278 ± 0,066853	16,04566 ± 1,871608	Não foi detectado
21	0,39123 ± 0,094868	5,505914 ± 1,522491	Não foi detectado

28	4,070535 ± 1,55445	2,63056 ± 2,097138	1,420666± 0,911478
----	--------------------	--------------------	--------------------

As membranas A e B tiveram uma perda de massa mais acentuada nos primeiros dias de incubação e, portanto tiveram o máximo de liberação nesse período. O processo de degradação da membrana C, observada por meio da perda de massa e da variação de espessura, não foi suficiente para iniciar a liberação do fármaco antes do 14º dia. Esse resultado é promissor quando se considera a necessidade da preparação de um material em que se tenha o controle na liberação dos fármaco nos primeiros dias do implante.

Conclusão

A avaliação do processo de degradação de membranas de PLGA\PPy\Tacrolimus indicaram que é possível relacionar a espessura da amostra com o retardamento da liberação do fármaco nos primeiros dias de incubação. As membranas A e B com espessuras iniciais de aproximadamente 107 µm liberaram o fármaco a partir do primeiro dia de incubação. Já a membrana C com 385 µm de espessura iniciou o processo de liberação no 28º dia, sendo, portanto, o sistema mais adequado para a preparação de tubos que serão avaliados in vivo.

Agradecimentos

PUCRS e CNPq pelo apoio estrutural e financeiro.

Referências

1. Kline DG, Nulsen FE: Acute Injuries of Peripheral Nerves. Neurological Surgery. 2º Ed., Vol 3, Philadelphia WB Saunders, 1982.
2. BOYD JG, GORDON T. **Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury.** Mol Neurobiol. 2003 Jun;27(3):277-324.
3. DAHLIN, I. B; **Techniques of peripheral nerve repair.** Department of Hand Surgery, Malmö University Hospital, Malmö, Sweden, 2008.
4. Millesi H: **Progress in peripheral nerve reconstruction.** World J Surg 14:733 – 747, 1990.
5. Millesi, H : Nerves Grafts: indications, techniques, and prognosis. **Management of Peripheral Nerves Problems.** Philadelphia, Saunders, 1980;
6. OMER, GE: The evaluation of Clinical Results following peripheral nerve suture. . **Management of Peripheral Nerves Problems.** Philadelphia, Saunders, 1980;
7. OLIVEIRA, R. L. A.; PIERUCCI, A.; PEREIRA, K. **Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique.** Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas, (UNICAMP), PO Box 6109, 13083-865, Campinas, SP, Brazil, 2004;
8. SEBEN, D, A; LICHTENFELS, M; SILVA, L,J; **Regeneração de nervos periféricos: terapia celular e fatores neurotróficos.** Rev. bras. ortop. vol.46 no.6 São Paulo 2011.

9. LEE, J.Y.; Bashur, C.A.; Milroy, C.A.; Forciniti, L.; Goldstein, A.S.; Schmidt, C.E. Nerve growth factor-immobilized electrically conducting fibrous scaffolds for potential use in neural engineering applications. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 11, p. 15-21, 2012;
10. Goel, S.; Mazumdar, N. A.; Gupta, A., Synthesis and characterization of polypyrrole nanofibers with different dopants, *Polym. Adv. Technol*, **21** (2010) 205- 210. 10
11. Xia, X.; Yin, J.; Qiang, P.; Zhao, X., Electrorheological properties of thermo-oxidative polypyrrole nanofibers. *Polymer*, **52** (2011) 786-792.
12. Valente, C. A.; Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, 2014.
13. Rezende, C.A.; Luchesi, C.; Barbo, M^aL.P.; Duek, E.A.R. Membranas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele: degradação *in vitro* e *in vivo*, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **15** (2005) 232-238.
14. ASTM F 1635-11 – Standard test method for in vitro degradation testing of hydrolytically degradable polymer resins and fabricated forms for surgical implants. West Conshohocken, PA PA19428-2959, United States. ASTM- American Society for Testing and Materials International; 2011.
15. LI, H.; Chang, J. pH-compensation effect of bioactive inorganic fillers on the degradation of PLGA. **Composites Science and Technology**, v. 65, p. 2226-2232, 2005.

16. YOSHIOKA, T. Kawazoe, N.; Tateishi, T.; Chen, G. In vitro evaluation of biodegradation of poly(lactic-co-glycolic acid) sponges. **Biomaterials**, v. 29, p. 3438-3443, 2008.
17. WU, L.; Ding, J. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, p. 5821-5830, 2000.
18. VEY, E.; Roger, C.; Meehan, L.; Booth, J.; Claybourn, M.; Miller, A.F.; Saiani, A. Degradation mechanism of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, p. 1869-1876, 2008.
19. OH, S. H.; KANG, S. G.; Lee, J. H. Degradation behavior of hydrophilized PLGA scaffolds prepared by melt-molding particulate-leaching method: Comparison with control hydrophobic one. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 17, p. 131-137, 2006.

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO GERAL

5. Discussão geral

Traumatismo em nervos periféricos resultam em déficit sensitivo e disfunção funcional, e raramente o reparo nervoso ocorre sem a intervenção cirúrgica. Quando há perda de substância nervosa, as sequelas são mais graves e muitas vezes permanentes; observa-se o aumento da dor e morbidade dos pacientes, diminuindo substancialmente sua qualidade de vida, ocasionando incapacitação física, perda parcial ou total das atividades produtivas e gerando grande impacto socioeconômico.

Nos casos em que a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos, uma técnica de reparo disponível e vastamente empregada é a tubulização. Essa técnica, também chamada entubulação, é um procedimento cirúrgico em que os cotos nervosos seccionados (Oliveira, et al., 2004) são introduzidos e fixados dentro de uma câmara tubular, com a finalidade de propiciar um ambiente favorável à regeneração. Proporciona, ainda, o direcionamento do crescimento nervoso das extremidades rompidas ou seccionadas, protegendo as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitando a formação de neuroma. A tubulização apresenta outra característica interessante: ela pode ser otimizada com acréscimo de fatores regenerativos (Mauri, *et. al.*, 2010).

Há uma grande variedade de materiais, biodegradáveis ou não, que podem ser utilizados como alternativas terapêuticas para promover a regeneração por meio da tubulização, dentre eles podemos citar acrílicos, silicone, copolímero poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, polipirrol (PPy), entre outros, entretanto, nem todos apresentam características favoráveis a regeneração neural, como por exemplo o silicone, que pode vir a comprimir o nervo, causar resposta inflamatória etc.

Adicionalmente, a utilização de um guia artificial permite a criação de um microambiente favorável a utilização de substâncias neurotróficas e neuroprotetoras, enriquecendo a câmara de regeneração. Atualmente os estudos têm se concentrado na escolha dessas substâncias e vias de aplicação que possam maximizar seu efeito localmente. A combinação do polímero PLGA e do fármaco tacrolimus se encaixa

nesse contexto, podem otimizar o crescimento axonal e recuperação funcional de lesões em nervos periféricos.

O presente trabalho avaliou diferentes filmes contendo PLGA e PPy, com a adição do fármaco Tracrolimus, quanto a sua taxa de biodegradação, correlacionou a taxa de liberação do FK506 com a espessura dos filmes em um período de degradação hidrolítica em um período de 1, 4, 7, 14, 21, 28 e 35 dias a fim de verificar qual seria a membrana mais adequada para a utilização em tubos para reparo neural.

Em relação à morfologia, as membranas A e B apresentaram um comportamento não linear em relação à perda de massa. Isso pode ser justificado uma vez que, como há uma conhecida dificuldade na preparação dos filmes, uma vez que a suspensão não deposita-se uniformemente na placa, e como as amostras de cada membrana foram retiradas de pontos diversos da mesma, conseqüentemente a perda de massa apresentou-se desuniforme ao longo da degradação.

A membrana C que apresenta concentrações dos polímeros PLGA e PPy maiores se comparados com a membrana A e B, apresentou perda de massa uniforme. Observa-se que no décimo quarto dia, a membrana C apresentou cerca de 50% menos perda de massa se comparado com as membranas A e B. Esse resultado está de acordo com dados previamente descritos na literatura que reportam ao uma perda de massa maior em filmes contendo maior concentração de PLGA (Lichun *et. al.*, 2000; Linbo *et. al.*, 2004). Esse resultado também torna-se importante uma vez que o fármaco só deve ser liberado a partir do 14º dia, uma vez que a maior parte dos restos da mielina regenerada é removida até o 12º ao 14º dia (Kline *et. al.*, 1982) e, se for liberado antes desse período, o fármaco pode provocar a contração do nervo ao invés de guiar a regeneração através do tubo.

Em relação à espessura avaliou-se que não houve uma diferença significativa na variação da mesma. Observa-se também que em alguns dias do período de degradação, há um aumento na espessura das membranas. Isso pode ser justificado uma vez que o polímero PLGA apresenta característica hidrofílica (Linbo *et. al.*, 2004), e a exposição em meio aquoso pode levar ao intumescimento das amostras, pois ao absorver água o filme acaba por dilatar.

Em relação ao pH, os filmes foram degradados em 2 ml de meio de solução tampão fosfato salino (PBS; pH ~7,4; à 37 °C e 60 rpm) e o pH do meio foi

acompanhado em função do tempo de degradação. Observou-se que o pH não foi sofreu alteração significativa.

Quanto à liberação, as membranas A e B apresentaram picos do fármaco Tacrolimus desde o primeiro dia de degradação até o último, uma vez que a variação apresentada entre as duas membranas foi da concentração do fármaco. A membrana C apresentou liberação apenas no 28º dia, não apresentando liberação nos demais dias de degradação, o que vem de encontro à perda de massa a qual também apresentou menor perda de massa em relação ao restante dos filmes, concluindo-se ser a membrana mais apropriada para ser utilizada em tubos de reparação neural.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMABIS, JOSÉ MARIANO; MARTHO, GILBERTO RODRIGUES. **Conceitos de Biologia**. São Paulo, Ed. Moderna, 2001. vol. 2.

BARBANTI, S.H., Zavaglia, C.A.C., Duek, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p.13-21, 2005

BOYD JG, GORDON T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. **Mol Neurobiol**. 2003 Jun;27(3):277-324.

CHIONO, V.; TONDATURO, C.; CIARDELLI, G. 2009 CHAPTER 9: Artificial scaffolds for peripheral nerve reconstruction. In international review of neurobiology. 173-198. Academic press.

Chunasuwankul R, Ayrout C, Dereli Z, Gal A, Lanzetta M, Owen E. Low dose discontinued FK506 treatment enhances peripheral nerve regeneration. *Int Surg*.2002;87(4):274-8

COSTA, M.P; Emprego de tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. Estudo experimental em ratos (tese). São Paulo. Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 2001.

CUNHA, S.A. Reconstrução de defeito de nervo fibular em ratos com veia glicerolada: análise histológica e funcional (tese). São Paulo. Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 2013.

DAHLIN, I. B; Techniques of peripheral nerve repair. Department of Hand Surgery, Malmö University Hospital, Malmö, Sweden, 2008.

FIALHO, S.L.; Rego, M.G.B.; Cardillo, J. A.; Siqueira, R.C.; Jorge, R.; Jr Cunha, A. S. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 891-896, 2003.

GUIMARD, N.K.; Gomez, N.; Schmidt, C.E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 876-921, 2007.

GOLD, B. G. - **FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration**, 1997.

ICHIHARA, S; INADA, Y; NAKAMURA, T; Artificial nerve tubes and their applications for repair of peripheral nerves injuries: and update of current concepts. *Injury*. 2008, 29- 39.

IJKEMA-PAASSEM, J. et. Al. Transection of Peripheral Nerve, Bridging strategies and effect evaluation. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1583-1592, 2004.

LEE, J.Y.; Bashur, C.A.; Milroy, C.A.; Forciniti, L.; Goldstein, A.S.; Schmidt, C.E. Nerve growth factor-immobilized electrically conducting fibrous scaffolds for potential use in neural engineering applications. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 11, p. 15-21, 2012.

LEUNG, V.; Ko, F. Biomedical applications of nanofibers. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 22, p. 350-365, 2011.

LICHUN, L.; PETER, S.; LYMAN.; HUI-LIN, L.; LEITE, T. A.; UYAMA, S.; VACANTI, L. R.; MIKOS, A. In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. **Biomaterials**, 2000.

LINBO, W.; DING, J. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, 2004.

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

Jakab, E.; Mészáros, E.; Omastová, M. Thermal decomposition of polypyrroles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.88, p. 515-521, 2007.

JUNIOR, R.M; AZZE, R.J. Atualização em Traumatologia do Aparelho Locomotor. Lesão dos Nervos Periféricos. Celebra, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, pág 10. Disponível em: www.ronaldoazze.com.br/fasciculo/fasciculo3.PDF Acessado em 24/11/2013

KANG, H.C.; Geckeler, K.E. Enhanced electrical conductivity of polypyrrole prepared by chemical oxidative polymerization: effect of the preparation technique and polymer additive. **Polymer**, v. 41, p. 6931-6934, 2000.

Kline, D. G.; Nulsen FE: Acute Injuries of Peripheral Nerves. **Neurological Surgery**. 2^o Ed., Vol 3, Philadelphia WB Saunders, 1982.

MAKADIA, H K.; SIEGEL, J.S.; Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Materials Science and Engineering**, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA, 2011.

MACKINNON SE,DELLON AL, HUDSON AR, HUNTER DA. Chronic nerve compression: An experimental model in the rat. **Annal of Plastic Surgery**. 1984; 13:112-20.

Madduri S, Feldman K, Tervoort T, Papaloïzos M, Gander B. Collagen nerve conduits releasing the neurotrophic factors GDNF and NGF. **Control Release**. 2010;143(2):168-74.

MERLE, M; DELLON, A.L; CAMPELL, J.N; CHANG, P.S; Complications from silicon polymers intubations of nerves. **Microsurgery**. 1989.

Millesi, H : Nerves Grafts: indications, techniques, and prognosis. **Management of Peripheral Nerves Problems**. Philadelphia, Saunders, 1980;

MILLESI H. **The current state of the peripheral nerve surgery in the upper limb**. Ann Chir Main. 1984; 3:18-34.

Millesi H: **Progress in peripheral nerve reconstruction**. World J Surg 14:733 – 747, 1990.

MOTTA, A.C., DUEK, E.A.R., Síntese, Degradação e Caracterização, do poli(L-ácido- láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, v.11, n.3, p.340-350,2006.

OLIVEIRA, R. L. A.; PIERUCCI, A.; PEREIRA, K. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas,(UNICAMP), PO Box 6109, 13083-865, Campinas, SP, Brazil,2004.

OMER, GE: The evaluation of Clinical Results following peripheral nerve suture. . **Management of Peripheral Nerves Problems**. Philadelphia, Saunders, 1980;

REZENDE, C.A.; Luchesi, C.; Barbo, M^aL.P.; Duek, E.A.R. Membranas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele: degradação *in vitro* e *in vivo*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 3, p. 232-238, 2005.

RUSTEMEYER, J,R; KEIPERT,C; DICKE,U; Administration of low-dose FK 506 accelerates histomorphometric regeneration and functional outcomes after allograft nerve repair in a rat model, 2010.

SARIGUNEY Y, YAVUZER R, ELMAS C, YENICESU I, BOLAY H, ATABAY K. Effect of platelet-rich plasma on peripheral nerve regeneration. **J Reconstr Microsurg**. 2008 Apr;**24(3):159-67**.

SCHMIDT, E,C; GOMEZ, C; Nerve Growth factor-immobilized polypyrrole: bioactive electrically conducting polymer for enhanced neurite extension. **Wiley InterScience**, 2006.

SEBEN, D, A; LICHTENFELS, M; SILVA, L,J; Regeneração de nervos periféricos: terapia celular e fatores neurotróficos. **Rev. bras. ortop**. vol.46 no.6 São Paulo 2011.

SHAOCHENG ZHANG; FANG JI; DAKE TONG; MING LI. ACTA NEUROCHIR (WIEN). Side-to-side neurorrhaphy for high-level peripheral nerve injuries; 154(3): 527–532. March 2012

SHORES A. LESÃO E REPARO DO NERVO PERIFÉRICO In: Bojrab MJ, editor. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3^o ed. São Paulo: Roca; 1996. p. 49-56.

Shin, H.; Jo, S. & Mikos, A. G. – **Biomaterials**, 24, p.4353 (2003).

SPIVEY, E.C.; Khaing. Z.Z.; Shear, J.B.; Schmidt, C.E. The fundamental role of subcellular topography in peripheral nerve repair therapies. **Biomaterials**, v. 33, p.4264-4276, 2012.

SIQUEIRA,R. Peripheral Nerve Injury: A Review. Departamento de Fisioterapia UNEP, SP, Brasil, 2007.

Slimane, A. B.; Connan, C.; Vaulay, M. J.; Chehimi, M. M. Preparation and surface analysis of pigment@polypyrrole composites. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 332, p. 157–163, 2009.

SOUZA,M. Desenvolvimento de sistemas poliméricos de implantação intraocular contendo tacrolimus para o tratamento de uveítes crônicas. Dissertação de mestrado apresentada à UFMG, 2012.

SULTANA, N.; KHAN, T.H. In Vitro Degradation of PHBV Scaffolds and nHA/PHBV Composite Scaffolds Containing Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

ZHENG,H; SHIPU,L; JUFENG,H; DEZHONG, L; QIONGJIAO,Y; **Evaluation of PRGD/FK506/NGF conduits for peripheral nerve regeneration in rats**, 2010.

Daly, W; Yao, L; Zeugolis, D; Windebank, A; Pandit, A. A biomaterial approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. **J. R. Soc. Interface** (2012) 9, 202-221.

[HTTP://PT.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/FICHEIRO:COMPLETE_NEURON_CELL_DIAGRAM_PT.SVG](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Complete_Neuron_Cell_Diagram_pt.svg) ACESSADO EM 13/11/2012.

WANG, X.; Gu, X.; Yuan, C.; Chen, S.; Zhang, P.; Zhang, T.; Yao, J.; Chen, F.;Chen, G. Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 68, p. 411-422, 2004.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**. 2008;29(20):2941-53

WONGTRAKUL S, BISHOP AT, FRIEDRICH PF. Vascular endothelial growth factor promotion of neoangiogenesis in conventional nerve grafts. **J Hand Surg Am**. 2002 Mar;27(2):277-85

YOO, H.S.; Kim, T.G.; Park, T.G. Surface-functionalized electrospun nanofiber for tissue engineering and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p.1033-1042, 2009.

Revista Brasileira de Ciências da Saúde

[CAPA](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#) [PESQUISA](#) [ATUAL](#) [ANTERIORES](#)
 NOTÍCIAS

Capa > Usuário > Autor > Submissões > #24473 > **Resumo**

#24473 Sinopse

RESUMO [AVALIAÇÃO](#) [EDIÇÃO](#)

Submissão

Autores	Majana Piovesan De Melo, Cristhiane Alvim Valente, Carlos Eduardo Leite, Lucas Weber Dias, Marlise Araújo Dos Santos, Jefferson Braga Da Silva, Nara Regina De Souza Basso
Título	AVALIAÇÃO IN VITRO DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO DE TACROLIMUS A PARTIR DE COMPÓSITOS DE PLGA E POLIPIRROL
Documento original	24473-49902-1-SM.DOC 2015-06-02
Docs. sup.	24473-49903-1-SP.PDF 2015- INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR 06-02
Submetido por	Nara Regina De Souza Basso 
Data de submissão	junho 2, 2015 - 05:59
Seção	Pesquisa
Editor	Nenhum(a) designado(a)

Situação

Situação	Aguardando designação
Iniciado	2015-06-02
Última alteração	2015-06-02

[OPEN JOURNAL SYSTEMS](#)

[Ajuda do sistema](#)

USUÁRIO

Logado como:

nbasso

- [Meus periódicos](#)
- [Perfil](#)
- [Sair do sistema](#)

AUTOR

Submissões

- [Ativo \(1\)](#)
- [Arquivo \(0\)](#)
- [Nova submissão](#)

IDIOMA

Português (Brasil) ▼

CONTEÚDO DA REVISTA

Pesquisa

Todos ▼

Procurar

- [Por Edição](#)
- [Por Autor](#)
- [Por título](#)
- [Outras revistas](#)