



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ESTUDO DA GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DA INDOMETACINA NANOENCAPSULADA *IN VITRO*

JULIANO GABRIEL FRODER

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO DA GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DA
INDOMETACINA NANOENCAPSULADA *IN VITRO*

JULIANO GABRIEL FRODER

PROF. DR. EDSON LUIS MAISTRO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU – UNESP BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Froder, Juliano Gabriel.

Estudo da genotoxicidade e citotoxicidade da Indometacina Nanoencapsulada *in vitro* / Juliano G. Froder – Botucatu, 2016

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2016.

Orientador: Edson Luis Maistro

Assunto CAPES: 20206003

1. Mutagênese.

Palavras-chave: Genotoxicidade; HepG2; Linfócitos humanos; Indometacina nanoencapsulada.

Dedico este trabalho aos meus Pais, Nilsa Marisa Froder e Milton Osvaldo Froder (in memoriam), que me apoiaram em todos os momentos de minha vida.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Deus, por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades impostas em meu caminho.

Agradeço também à minha mãe e meu irmão, que sei que posso contar com eles sempre, e vão me apoiar em todas minhas decisões. Ao meu pai (in memoriam), que sei que, independentemente de onde ele estiver, está cuidando de mim.

Agradeço à minha namorada, Dayane Ramos, que desde que a conheci, sempre me apoiou e me deu forças para tudo que eu faça, independentemente do que eu escolhesse, sempre está ali por mim.

Ao meu orientador, Prof. Edson Luís Maistro, pela orientação, confiança, apoio, e pelas várias dicas e ensinamentos que me passou.

Aos meus colegas de laboratório, que sempre me ajudaram quando necessário, Eduardo Marques, Ana Paula Quadros, Tháís B. de Queiroz.

À técnica, Larissa Zochio, que sempre me ajudou em todos os experimentos, me ensinando, e me passando todas as técnicas necessárias para desenvolvimento de minha dissertação.

À esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje

*vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada
confiança no mérito e ética aqui presentes.*

*Agradeço ao Davi Muller, por todas as dúvidas que
me foram tiradas, por tantos e-mails que enviei para
pedir informações e sempre foram respondidas de forma
educada, e rápida.*

*À CAPES, pela bolsa que me proporcionou pela
dedicação exclusiva que tive com meus experimentos.*

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1:	Tipos de sistemas para distribuição de drogas.....	21
Figura 1:	Microscopia fluorescente de células Caco-2.....	21
Figura 2:	Tamanho de Nanopartículas com relação à outras escalas.....	22
Figura 3:	Estrutura química da indometacina.....	23
Figura 4:	Diferentes caminhos de uma droga mutagênica.....	32
ARTIGO - Figure 1:	Effect of the Indomethacin-loaded with Eudragit nanocapsules in cell viability of (a) human lymphocytes and (b) HepG2 cells based on trypan blue test.....	56
ARTIGO - Figure 2:	Cytotoxicity based on the colorimetric MTT assay in HepG2 cells exposed to different concentrations of indomethacin-loaded with Eudragit nanocapsules.....	57
ARTIGO - Figure 3:	Effect of Indomethacin-loaded with Eudragit nanocapsules in human lymphocytes and HepG2 cells by comet assay.....	58
ARTIGO - Table 1:	The micronucleus frequency and nuclear division index in human lymphocytes treated with Indomethacin-loaded with Eudragit nanocapsules (NI).....	59
ARTIGO - Table 2:	The micronucleus frequency and nuclear division index in HepG2 cells treated with Indomethacin-loaded with Eudragit nanocapsules (NI).....	60
ANEXOS - Figura 1	Classes observadas de cometas em Linfócitos humanos e HepG2.....	61
ANEXOS - Figura 2.	Teste do Micronúcleo em linfócitos humanos.....	62
ANEXOS - Figura 3	Teste do Micronúcleo em HepG2.....	63
ANEXOS - Figura 4:	Microscopia eletrônica da Indometacina Nanoencapsulada.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- °C – Grau Celsius
- µg/mL – Microgramas por mililitro
- µm – micrometro
- µM - Micromolar
- AA – Ácido araquidônico
- ANOVA – *one-way analysis of variance*
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- ATL 313 – Agonista do receptor da adenosina A2A
- Bap – Benzo (a) Pireno
- BE – Brometo de etídio
- BER – *Base excision repair*
- BN – Células Binucleadas
- Caco-2 – Linhagem celular continua de um adenocarcinoma epitelial humano de colorretal.
- CGI – Complicações gastrointestinais
- CHO – Linhagem celular derivada de ovário de hamster chinês
- Cm² - Centímetros quadrados
- COX – Ciclooxygenase
- CYP – Citocromo P450
- DDS - Sistemas de entrega de drogas “*Drug delivery systems*”
- DMEM - *Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium*
- DMSO – Doxorrubicina dimetilsulfóxido
- DNA –Ácido Desoxirribonucleico
- DSBR – *Double strand break repair*
- EnC– Ensaio Cometa
- FBS – Soro bovino fetal
- FISH – Hibridização fluorescente *in situ*
- GI - Gastrointestinal
- GST - Glutathione s-transferases
- HeLa – Linhagem celular derivada de câncer de cólon uterino
- HepG2 – Hepatoma Humano
- IDN - Índice de divisão nuclear
- LHSP – Linfócitos humanos de sangue periférico
- LMPA –*Low melting point agarose*

LOX – Lipoxigenase
mA – Milliampère
mg – miligramas
mg/kg – miligramas por quilograma
mL- Mililitro
MMR – *Mismatch Repair*
MMS - Metanossulfato de metila
MN – Micronúcleo
MNS_tB - Micronúcleo *in vitro* com bloqueio da citocinese
MTT - (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium)
NC – Controle negativo
NER – *Nucleotide excision repair*
NI – Indometacina Nanoparticulada
nm – Nanômetro
NMPA – Normal melting point agarose
NO – Óxido nítrico
nsNSAIDs – Anti-inflamatórios não esteroides não seletivos
NSAIDs – Anti-inflamatórios não esteroides
PACA - poli (alquil-cianocrilato)
PC – Controle positivo
PGs– Prostaglandinas
PHA–Fitohemaglutinina
PI – Propídio iodado
RNA – Ácido ribonucleico
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*
SCGE - *Single cell gel electrophoresis*
TXA - Tromboxanos
V – volts

RESUMO

Os anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs) estão entre os medicamentos mais amplamente utilizados no mundo inteiro. Isso se deve à medicina curativa implantada principalmente no ocidente. Com frequência os NSAIDs são usados para aliviar queixas musculoesqueléticas, artrite, bursite, dor de dentes, dismenorrea, dor de estados pós-parto e na dor de metástases de câncer no osso, sendo todas essas enfermidades associadas ao aumento da síntese de prostaglandinas. Os efeitos farmacológicos dos NSAIDs são devidos à inibição da ciclooxigenase (COX) e a subsequente diminuição da síntese de prostaglandinas (PGs), levando a uma diminuição da inflamação, dor e febre. Essa diminuição de PGs leva a uma larga escala de efeitos colaterais que são associados à NSAIDs, incluindo complicações gastrointestinais (CGI), problemas cardiovasculares, toxicidade renal, hipertensão e retenção de líquidos. Devido a essas características dos NSAIDs, justificam-se estudos envolvendo a utilização de outros meios para a entrega oral de fármacos anti-inflamatórios. Uma opção muito pesquisada, que vem crescendo de maneira significativa é o uso de nanopartículas, com potencial para constituir uma nova geração de “sistemas de entrega de drogas”. Nanopartículas apresentam uma série de características, tais como: detectar, monitorar e tratar doenças; proteger o fármaco de ácidos estomacais e enzimas do trato gastrointestinal; e proteger o estômago e intestino do próprio fármaco. A indometacina é um poderoso agente NSAID, utilizado para tratamento de artrite e osteoartrite. Como inibidora não seletiva da ciclooxigenase, principalmente no caso de inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2), que é muito relacionada às lesões da mucosa gástrica. Por esta razão, é de grande importância que a indometacina seja objeto de estudo para novos métodos e formas de distribuição desse fármaco. Considerando que não há dados na literatura sobre a análise da biossegurança do uso da Indometacina Nanoencapsulada (NI) sobre o material genético e sua toxicidade em células de mamíferos, este estudo tem por objetivo avaliar a viabilidade celular deste medicamento nanoencapsulado pelo teste de coloração com o azul de Tripán, e sua citotoxicidade pelo ensaio do MTT, e sua genotoxicidade por intermédio do ensaio cometa e teste do micronúcleo com bloqueio na citocinese. Todos os ensaios foram feitos com o uso de culturas de linfócitos humanos de sangue periférico (células não metabolizadoras) e de células do hepatoma humano (HepG2) (células metabolizadoras) (exceto o MTT). Os ensaios dos testes de viabilidade foram realizados com tempo de exposição à substância teste por 24 horas, com as seguintes concentrações: 5, 10, 50, 125, 250, 500 e 1250 µg/ml. Os resultados obtidos permitiram a seleção de seis concentrações (5, 10, 50, 125, 250 e 500 µg/ml)

onde foi observado uma viabilidade celular $\geq 80\%$. Também foi possível realizar o ensaio de citotoxicidade utilizando as células HepG2, com as mesmas concentrações e pelo mesmo período de tempo usado no teste de exclusão azul de tripan. Os resultados foram bastante semelhantes resultados com o azul de tripan, onde apenas a concentração de 1250 $\mu\text{g/ml}$ obteve uma viabilidade menor que 80%. Para o teste de genotoxicidade as células foram tratadas com as concentrações que obtiveram uma viabilidade maior que 80%, por um período de 24 horas para o teste do micronúcleo e por 4 horas para o teste do cometa. Os resultados obtidos mostraram que apenas a concentração máxima nas células metabolizadoras (HepG2), no teste do micronúcleo, foi observado um aumento estatisticamente significativo de células micronucleadas quando comparado ao controle negativo. Nas outras concentrações testadas, a NI não causou efeito genotóxico e/ou mutagênico significativo em ambas as linhagens celulares. Os resultados obtidos indicam que o nanoencapsulamento da indometacina pode ser um processo bastante promissor no sentido de desenvolver uma forma de administração deste medicamento, menos nociva a mucosa gástrica dos pacientes. Por outro lado, os resultados também apontam para a necessidade de realização de mais estudos relacionados com o potencial genotóxico de concentrações mais altas da NI, bem como de sua metabolização.

ABSTRACT

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the drugs most widely used worldwide, mainly by curative medicine that is implanted. Commonly NSAIDs are used to relieve muscle-skeletal complaints, arthritis, bursitis, toothache, dysmenorrhea, postpartum states of pain and pain of cancer metastases in the bone. Such diseases and complications are associated with increased prostaglandin synthesis. Pharmacological effects of NSAIDs are due to inhibition of cyclooxygenase (COX) and subsequent decrease of prostaglandin synthesis (PGs), causing a decrease in inflammation, pain and fever. PGs decrease leads to a wide range of side effects that are associated with NSAIDs, including gastrointestinal complications (CGI), cardiovascular disorders, renal toxicity, hypertension and water retention. Because of these characteristics of NSAIDs are justified studies involving the use of other means for oral delivery. A solution that is very researched, and has been growing significantly is the use of nanoparticles with potential to constitute a new generation of “drug delivery systems”. Nanoparticles have many characteristics, such as: detect, monitor and treat diseases; protecting the drug from stomach acids and enzymes in the gastrointestinal tract; and protect the stomach and intestines of the drug itself. Indomethacin is a potent NSAIDs agent used to treat arthritis and osteoarthritis. It has the ability to inhibit not selectively cyclooxygenase, particularly cyclooxygenase – 2 (COX-2) that is closely associated with gastric mucosal injury. For this reason, it is important that the Nanocoated Indomethacin (NI) is the subject of this study, to ensure the safety of new methods and forms of distribution of this type of drugs. There are no data in the literature on the analysis of biosafety using Nanocoated Indomethacin of the genetic material and its toxicity in mammalian cells. This study aims to assess cell viability of this medicine nanocoated by Trypan blue exclusion test, and cytotoxicity by MTT assay, and genotoxicity through the comet assay and micronucleus test with block in cytokinesis. All assays were performed using cultures of human lymphocytes from peripheral blood (not metabolizing cells) and human hepatoma cells (HepG2) (metabolizing cells) (except MTT assay). Tests of viability were performed by treatment of 24 hours with the following concentrations: 5, 10, 50, 125, 250, 500 and 1250 µg/ml. Results obtained enabled the selection of six concentrations (5, 10, 50, 125, 250 and 500 µg/ml) which was observed cell viability $\geq 80\%$. Was possible to perform cytotoxicity assay using the HepG2 cells with same concentrations and same period of treatment as trypan blue exclusion test. Results were quite similar with trypan blue, only the concentration of 1250 µg/ml achieved $< 80\%$ viability. In genotoxicity assay cells were

treated with the following concentrations: 5, 10, 50, 125, 250 and 500 µg/ml, for a period of 24 hours for micronucleus test and 4 hours for the comet assay. Results showed that only the maximum concentration in the metabolizing cells (HepG2), on micronucleus test, there was a statistically significant increase in micronucleated cells compared to the negative control. Other tested concentrations, NI did not cause any genotoxic and/or mutagenic effect, significantly, in both cell lines. The results indicate that Nanocoated Indomethacin can be a very promising method to develop an administration form of the drug, less harmful to the gastric mucosa of patients. However, the results also point to the need for further studies related to the genotoxic potential of higher concentrations of NI as well as your metabolism.

Sumário

1	Introdução	15
1.1	Nanotecnologia.....	17
1.1.1	Distribuição de Drogas e Nanopartículas	19
1.2	Considerações gerais sobre Indometacina.....	22
1.3	Cultivo celular e HepG2.....	26
1.4	Avaliação da viabilidade e citotoxicidade celular	27
1.5	Mutagênese e nanotoxicologia	28
1.5.1	Ensaio cometa	29
1.5.2	Teste do Micronúcleo.....	31
2.	Objetivos gerais.....	33
2.1	Objetivos específicos.....	33
3.	Referências.....	33
4.	Artigo	43
5.	Anexos.....	61
5.1	Prancha da classificação do Ensaio Cometa, elaborado pelo Autor.....	61
5.2	Prancha de Classificação do Teste do Micronúcleo em linfócitos humanos, elaborado pelo autor.....	62
5.3	Prancha de Classificação do Teste do Micronúcleo em Células de Hepatoma Humano (HepG2), elaborado pelo autor.....	63
5.4	Microscopia eletrônica da Indometacina Nanoencapsulada usada no trabalho.	64
5.5	Anexo 1 – Carta de submissão do artigo “ <i>In vitro</i> study of the cytotoxic and genotoxic potential of indomethacin-loaded with Eudragit® L-100 nanocapsules”	65
5.6	Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética.....	66

1 Introdução

Não há nenhuma molécula cuja integridade seja tão importante e vital para a célula e o organismo vivo como o DNA. O material genético está sujeito a constantes mudanças, durante a sua replicação, transcrição do RNA e mesmo quando em seu estado inativo, ou em repouso, também pode ocorrer danos. Tudo isso é amplificado quando o DNA está exposto a algum agente que é considerado mutagênico ou carcinogênico. A maioria das mutações são potencialmente perigosas, levando a um bloqueio na replicação do DNA ou à produção de proteínas defeituosas (MALACINSKI, 2005). Certos tipos de mutações resultam em carcinogênese. A sequência do DNA afetada codifica uma proteína que está envolvida na regulação do crescimento, necessitando apenas de uma mutação em uma única célula para levar a um câncer (RANG et al., 2007).

No planeta, há uma grande quantidade de produtos que podem causar danos à nível cromossômico, ou ao DNA. Esse fato ocorre, principalmente, por ações e atividades do próprio ser humano. Afetando assim futuras gerações, tanto humanas, quanto animais, plantas e microrganismos em geral. Diversas são as técnicas usadas em biologia molecular, que apresentam capacidade de estudar de maneira detalhada e minuciosa tais danos ao material genético, mostrando seus modos de ação e meios para prevenção dessas mutações (RIBEIRO et al., 2003).

Grande parte dos carcinógenos genotóxicos, que comprovadamente causam algum tipo de tumor em seres humanos, são considerados pré-carcinógenos, esses compostos são estáveis em pH fisiológico e incapazes de reagir com o DNA por, até que sejam metabolizados, essa metabolização acontece principalmente por células hepáticas. Esses compostos mutagênicos são biotransformados por enzimas como citocromo P450 (CYP) e glutatona-transferases (GST), em compostos hidrossolúveis, portanto, passíveis de serem excretados. Esses produtos finais são extremamente eletrofílicos e podem reagir com centros nucleofílicos das células, como o DNA (RIBEIRO et al., 2003).

Os agentes anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs) estão entre os medicamentos mais amplamente utilizados no mundo inteiro. Isso ocorre devido a uma medicina curativa que é implantada, principalmente no ocidente, e uma subsequente utilização desses medicamentos, acarretando até em uma automedicação por pacientes, sem qualquer prescrição médica (MAcDONALD et al., 1997). Esse tipo de fármaco é principalmente eficaz contra a dor associada à inflamação ou lesão tecidual, pois, apresentam a capacidade de diminuir a produção das prostaglandinas. Com frequência esse tipo de medicamento é usado para aliviar queixas musculoesqueléticas

“reumáticas”, artrite, bursite, dor de dentes, dismenorrea, dor de estados pós-parto e na dor de metástases de câncer para o osso, todas essas enfermidades são associadas com o aumento da síntese de prostaglandinas. (RANG et al., 2007).

Henry e colaboradores (1996) realizaram uma meta-análise colaborativa, que mostra uma estimativa de riscos para complicações gastrointestinais com o uso de NSAIDs. Foram usados 12 estudos individuais onde foi constatado que o uso desse tipo de medicamento apresenta riscos para o desenvolvimento de doenças gastrointestinais, como, gastrite e úlceras gástrica. Os NSAIDs que apresentam um maior risco são o azapropazona, tolmetina, cetoprofeno e piroxicam. A indometacina, aspirina, naproxeno e o sulindaco apresentam risco intermediário, onde a indometacina pode provocar esse tipo de dano até em doses baixas (75-100 mg).

Para que não ocorram danos no trato gastrointestinal (GI), causados por NSAIDs, é necessário o desenvolvimento de novos métodos para a distribuição de drogas. Esses novos sistemas de liberação de fármacos precisam ter a capacidade de alterar perfis biológicos de agentes terapêuticos, como a sua biodistribuição, absorção pelo tecido, e farmacocinética. Por essas características, esses novos sistemas de distribuição são de grande importância para pesquisas biomédicas e na indústria farmacêutica (KOSTARELOS, 2003).

Uma opção muito pesquisada, que vem crescendo de maneira significativa é o uso de nanopartículas. Apresentando um potencial para constituir uma nova geração de “sistemas de entrega de drogas” (DDS). Nanopartículas podem ser muito versáteis, apresentando mecanismos para: Detectar, monitorar e tratar doenças; proteger o fármaco de ácidos estomacais, enzimas do trato gastrointestinal; e proteger o estômago e intestino do próprio fármaco (LEUCUTA 2010; KADAM et al., 2012).

Como o sistema de nanopartículas é um método eficiente, há um crescente número de publicações em relação ao seu entendimento devido a algumas características: como a utilização de materiais orgânicos e inorgânicos para sua fabricação; manuseio fácil para melhor direcionar a nanopartícula; entrega de maneira eficaz para os alvos, aumentando a eficácia terapêutica; e uma maneira de controlar a liberação de drogas por estímulos externos e internos (DUNCAN 2006; MINCHINTON & TANNOCK, 2006; LOBATTO et al., 2011; LIM et al., 2013). Entretanto, ainda poucos estudos em relação a sua citotoxicidade e/ou genotoxicidade são encontrados na literatura.

1.1 Nanotecnologia

De acordo com a *National Science Foundation*, Nanotecnologia é a habilidade de entender, controlar e manipular matéria a um nível de átomos e moléculas (WILLIAM et al. 2007). Nanotecnologia apresenta uma proposta para a construção de aparelhos e componentes de tamanho molecular (BHATTACHARYYA et al. 2009).

A nanotecnologia pode apresentar vários usos, nas mais diversas áreas do conhecimento. Podemos citar a Eletrônica, que ela vem sendo usada para o desenvolvimento de aparelhos nanoeletrônicos, reduzindo o tamanho de transistores, e circuitos integrados. Pode ser a resposta, também, para fazer viagens ao espaço, fazendo com que elas se tornem mais práticas, diminuindo o tamanho dos materiais usados, deixando-os mais leves e mais eficazes. Também ela está muito presente na medicina, com técnicas de entregas de drogas mais eficazes e com nanorobôs e micro aparelhos para auxílio em cirurgias e tratamentos médicos (BHATTACHARYYA et al. 2009).

Na última década tem se usado cada vez mais a nanotecnologia para a distribuição de drogas, e principalmente as nanopartículas, as quais são usados materiais orgânicos ou inorgânicos para a sua arquitetura (LIM et al., 2013). Apesar das nanopartículas sempre terem existido no planeta, a nanociência é um subcampo novo da ciência da matéria sendo muito promissora e podendo revolucionar todos os campos das ciências naturais (USKOKOVIC, 2013). O progresso da humanidade através da história vem caminhando para um aumento gradual do melhoramento das habilidades para controlar e modificar substratos de materiais ao nosso redor (USKOKOVIC, 2008).

As nanopartículas são usadas cada vez mais para o benefício da humanidade. Como exemplos podemos citar a tentativa de uma mais específica e precisa distribuição de drogas dentro do organismo humano; tentativas de um aumento da estabilidade de drogas que estão envoltas por nanopartículas, como é o caso de nanopartículas contendo paclitaxel (quimioterápico), que é estável na água apenas por 48 horas em temperatura ambiente. Paclitaxel foi então nanoparticulado com Nanocristais, e estabilizado com o surfactante Pluronic F68, produzindo uma solução aquosa, passível de ser injetada de forma intravenosa. Cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada nas amostras e mostrou que após 4 anos a nanosuspensão obteve uma recuperação maior que 99% (MULLER & KECK, 2004). Nanopartículas que estão envolvendo fármacos possibilitam a biodistribuição dessas drogas que são insolúveis em água, acarretando em um aumento de sua farmacocinética e meia vida da droga. (USKOKOVIC, 2013).

O tamanho das nanopartículas é determinante para os mecanismos de transportes através das membranas celulares e dos metabólitos. O qual acaba sendo muito importante para a área alvo da droga (SINGH et al., 2009). A absorção celular e

respostas globais dos fármacos nanoencapsulados dependem de seu tamanho e, em grande parte, se diferem de agregados e de partículas únicas da mesma composição (ALBANESE & CHAN, 2011). Um exemplo disso é o caso de uma nanopartícula de ouro feita para se agregar em meios intracelulares levemente ácidos (NAM et al., 2009). Após a entrada desse composto na célula, a partícula se agrega nos endossomos, contribuindo assim para a destruição das células alvo (KNEIPP et al., 2006).

Diferentes tamanhos de partículas têm rotineiramente mostrado a produção de vários tipos de efeitos aplicados em diferentes métodos de distribuição de drogas (CALDORERA-MOORE et al., 2010; OH et al., 2010; ZHAO et al., 2011). Se uma nanopartícula, que é guiada magneticamente pelo meio externo, for muito grande, ela pode não ser capaz de passar efetivamente pelos vasos sanguíneos e pelo espaço intracelular. Normalmente para esse tipo de entrega de drogas, o tamanho da nanopartícula é necessário ser menor que 10 nm. Essas nanopartículas precisam ser influenciadas apenas por um campo magnético externo, e assim que esse campo for cessado ocorre a inatividade da nanopartícula. É comum que diferentes alvos do corpo precisem de diferentes tamanhos de partículas, para uma melhor penetração e distribuição da droga (USKOKOVIC, 2013; MODY, et al., 2014).

Há certos tipos de materiais de nanopartículas que causam citotoxicidade em alguns tipos de células específicos, como a partícula de prata, que é mais tóxica para macrófagos do que para células epiteliais do pulmão, enquanto hidroxapatita de cobalto é tóxica para osteoblastos e não tóxica para células do epitélio intestinal (IGNJATOVIĆ et al., 2012; SURESH et al., 2012).

Se for controlado o formato da nanopartícula, o contato com a superfície pode ser adaptado para diferentes aplicações, como para uma maior duração na corrente sanguínea, onde o formato esférico tem um menor contato com a superfície, e não ficará aderido ao epitélio do vaso sanguíneo (USKOKOVIC et al., 2012). Já partículas que são alongadas e planas são melhores para drogas que precisam ser aderidas na superfície biológica (DECUZZI et al., 2009; LEE et al., 2009). Formas que são irregulares são mais efetivas para agir através do epitélio, tendo um maior contato com a superfície do mesmo, conseqüentemente, maior adesão e, a partir do epitélio poderão liberar seu conteúdo (USKOKOVIC et al., 2012).

Há drogas que precisam produzir efeitos terapêuticos em doses constantes, tendo que ser tomadas várias vezes ao dia, e nos mesmos horários todos os dias. Nesses casos, uma ótima alternativa seriam as nanopartículas com múltiplos estágios de liberação, liberando o fármaco de forma devagar e constante, sem apresentar altos e baixos como é o método tradicional. Para que isso desse certo, os mecanismos são mais complexos e

mais específicos, dependendo muito do gradiente de concentração da droga, pois altas doses lançadas são consideradas indesejadas nesses casos, mas em algumas situações esse efeito é desejado, como no caso da administração de antibióticos para erradicar a fonte da infecção em uma área específica, de forma mais eficaz (QUINTILIANI & QUINTILIANI, 2008; USKOKOVIC, 2013).

Para a liberação da droga em doenças que envolvam dor e desordem hormonal, é necessária a liberação instantânea da droga com períodos de mínimas liberações, até nenhuma liberação da droga (USKOKOVIC, 2013). Um efeito que pode ser alcançado por um método baseado em diferentes tipos de liberação da droga, dependentes do meio em que a nanopartícula irá passar, como, por exemplo: Alteração do pH (LIM et al., 2011), presença de marcadores da doença (HE et al., 2011), temperatura (LIU et al., 2009), ultrassom (TINKOV et al., 2009), por campos eletromagnéticos externos (VOLODKIN et al., 2009; WELLS et al., 2010), ou até por múltiplas camadas de nanopartículas (SOKOLOVA et al., 2006).

Há pesquisas empregando nanopartículas *in vivo* para o tratamento de diferentes tipos de câncer, como mieloma múltiplo, onde é utilizada uma nanopartícula multifuncional em combinação à tradicional quimioterapia, com capacidade de atingir uma célula alvo e tendo ainda uma função de anti-adesão. Essa função é a capacidade de inibir a adesão de tumores no tecido, eles apresentam uma grande expressão dessas moléculas de adesão, tais como, integrinas, selectinas, entre outras. Esse mecanismo serve para proteger os tumores de radiação e quimioterápicos genotóxicos (SCHMIDMAIER & BAUMANN, 2008; KIZILTEPE et al., 2012). Em outro exemplo, o câncer tratado é o câncer de mama, em que a nanopartícula usada é composta de aço oxidado paramagnético, que então é direcionado para células cancerígenas em camundongos *in vivo* e células de câncer humano *in vitro* (YANG et al., 2009b).

Mas como toda nova tecnologia, o uso das nanopartículas tem que ser profundamente analisado com relação ao seu potencial toxicológico e genotóxico, que devem atestar ou não o uso seguro do produto.

1.1.1 Distribuição de Drogas e Nanopartículas

O desenvolvimento de um sistema de distribuição de drogas para ser eficaz é preciso ter a capacidade de mudar perfis biológicos (biodistribuição, farmacocinética, farmacodinâmica, e absorção do tecido) de agentes terapêuticos, sendo considerado de grande importância para pesquisas biomédicas e na indústria farmacêutica (PROKOP & DAVIDSON, 2013).



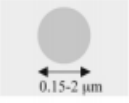




Desde que no fim dos anos 70, quando foi descrito uma nanopartícula de poli alquil-cianocrilato (PACA) que apresentou capacidade de ligar-se à uma droga anticancer, a nanotecnologia avançou muito no campo da distribuição de drogas, que tem como um de seus objetivos criar diferentes tipos de transportadores de fármacos (LIM et al., 2013).

Uma controlada distribuição de drogas para a entrega de fármacos, proporciona algumas vantagens com relação às formas convencionais, pois, esses sistemas apresentam uma maior eficiência, menor toxicidade, e maior conveniência para os pacientes (BARZEGAR-JALALI et al., 2012).

Com isso em mente, a rota oral continua sendo a mais desejável e conveniente para a administração da droga, mas como alguns agentes terapêuticos causam irritação estomacal, podendo levar a gastrite, que é o caso da indometacina e da aspirina, o uso de nanopartículas apresenta um potencial para a diminuição desses efeitos indesejáveis para os pacientes, sendo um ótimo método para a distribuição desse tipo de fármaco (CARUSO & PORRO, 1980; HAO et al., 2013).

Como já foi dito, o tipo do material e o tamanho usado para distribuição da droga é importante. Na tabela 1 pode ser observado os vários tipos de sistemas de distribuição de drogas. A nanopartícula apresenta o tamanho ideal para a absorção gastrointestinal, sendo um fator importante, pois, apenas as nanopartículas são apropriadamente absorvidas de forma significativa, muitos mecanismos dessa absorção já foram relatados, tais como, absorção por células epiteliais intestinais e coleta por gânglios linfáticos no íleo (Placas de Peyer) (HUSSAIN et al., 2001; TANG et al., 2011).

Tabela 1: Tipos de sistemas para distribuição de drogas (KOSTARELOS, 2003).

Delivery system types and typical mean particle diameter	Representative systems of each type	Characteristic applications
 0.5-20 μm	alginate, gelatin, chitosan, PLGA microspheres Synthetic, biodegradable, polymer hydrogels	<ul style="list-style-type: none"> • sustained release of therapeutics • scaffolds for cell delivery in tissue engineering
 0.2-5 μm	Polystyrene, microspheres	targeted delivery of therapeutics
 0.15-2 μm	o/w, w/o/w, lipid, emulsions o/w microemulsions	controlled and targeted delivery of therapeutics
 30 - 1000 nm	phospholipid and polymer-based bilayer vesicles	targeted delivery of therapeutics
 3 - 80 nm	natural and synthetic surfactant micelles	targeted delivery of therapeutics
 2 - 100 nm	lipid, polymer, inorganic nanoparticles	<ul style="list-style-type: none"> • targeted delivery of therapeutics • in vivo navigation devices
 2 - 100 nm	quantum dots	imaging agents

Hao et al. (2013) mostra que nanocapsulas da EUDRAGIT[®] podem ser absorvidas por células Caco-2, que é uma linhagem celular heterogênea de um adenocarcinoma de cólon humano, mostrando a absorção desse tipo de nanopartícula (figura 1). Os resultados iniciais mostram que este nanomaterial pode ser bastante promissor no sentido de distribuir medicamentos evitando danos ao trato digestivo.

Na figura 2 pode ser visto vários tipos de nanopartículas com relação à outras escalas.

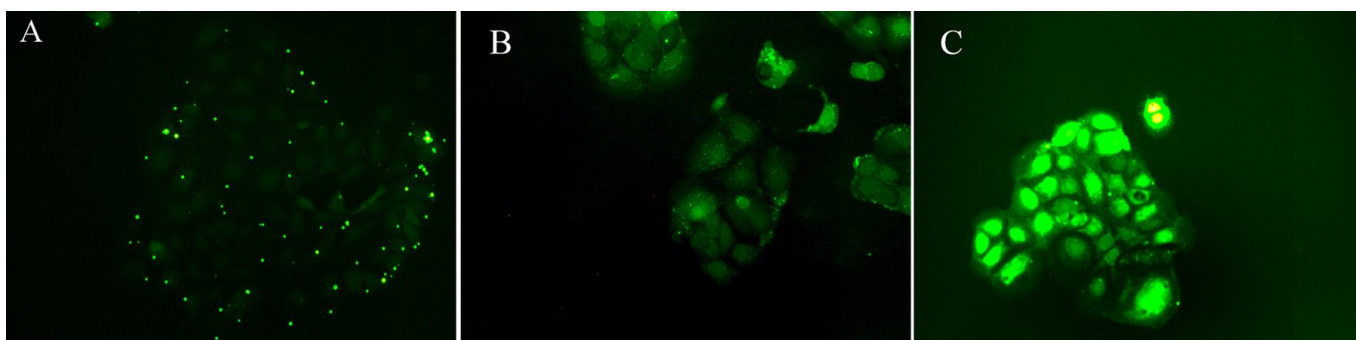


Figura 1: Microscopia fluorescente de células Caco-2 após, 30 minutos (a), 2 Horas (b) e 4 horas (c) de incubação com a nanopartícula EUDRAGIT[®] EL 100-55 (HAO et al. 2013).

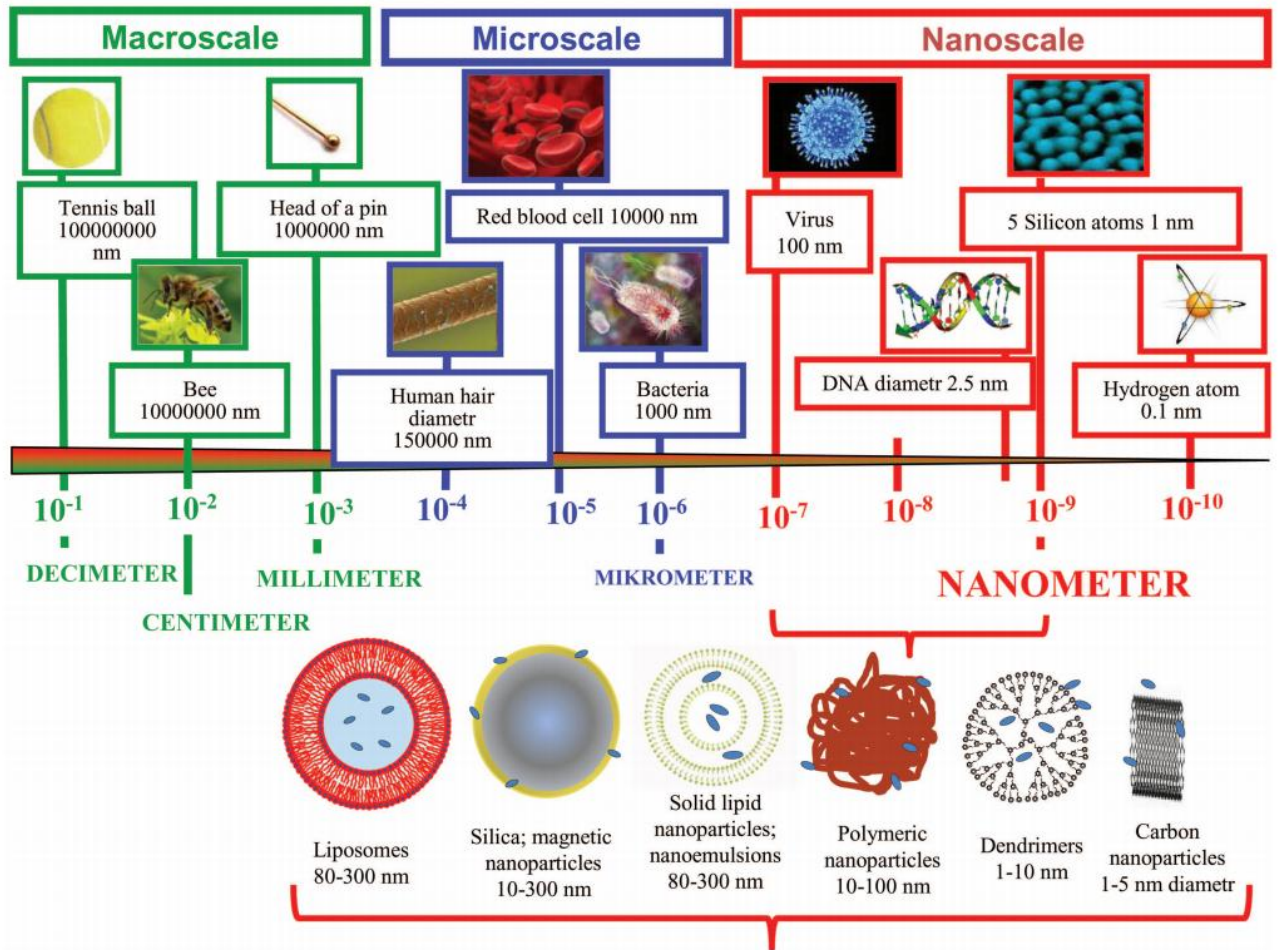


Figura 2: Tamanho de Nanopartículas com relação à outras escalas (WILCZEWSKA, et al., 2012).

1.2 Considerações gerais sobre Indometacina

A indometacina (figura 3) é um poderoso anti-inflamatório não esteroide (NSAIDs). Esta classe de medicamento é muito utilizada principalmente para aliviar dores, febre e processos inflamatórios em pacientes com osteoartrite, artrite reumatóide, espondiloartropatias, osteíte deformante, bursite, tendinite e nevralgia (RANG et al., 2007).

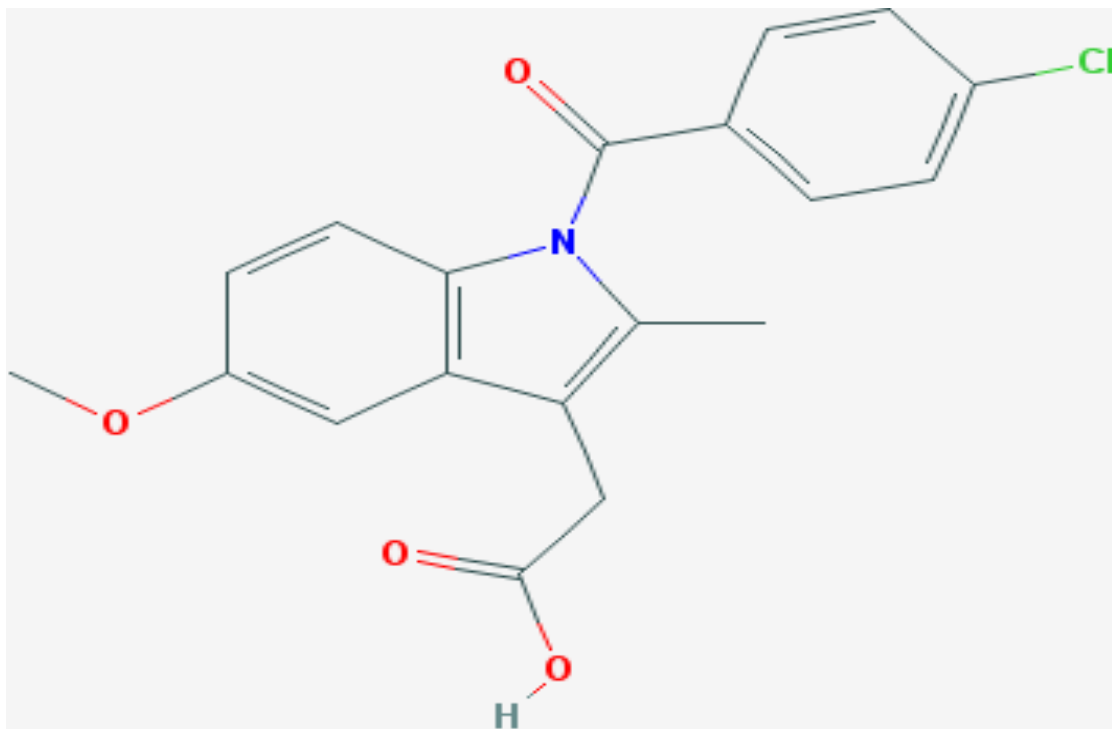


Figura 3: Estrutura química da indometacina (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/indomethacin#section=Top>; acesso em: 12/11/2015).

Os NSAIDs têm a capacidade de suprimir a produção de prostaglandinas (PGs) inibindo a Ciclooxygenase -1 e Ciclooxygenase-2 (COX-1 e COX-2). Essa inibição é muito associada com a indução de injúrias na mucosa gástrica (TAKEUCHI et al., 1991; BECK et al., 2000). No estômago, as PGs, especialmente as prostaglandinas E2 (PGE2), têm um papel importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica, por vários mecanismos, incluindo a regulação do fluxo sanguíneo, renovação do epitélio celular, síntese de muco e inibição da secreção de ácidos gástricos (WALLACE, 1992).

A afinidade de um NSAIDs com a COX-1 ou COX-2 é o que define sua seletividade, e podem ser classificados em quatro grupos. O grupo 1 produz uma inibição total de ambas as COX, e sua dose usada está muito relacionada com complicações gastrointestinais (CGI). O grupo 2 consiste em inibidores principalmente da COX-2. O grupo 3 inibe de forma muito fraca a COX-2, e de maneira mais forte a COX-1, produzindo maiores complicações gastrointestinais quando comparados com o grupo 2. O grupo 4 inibe de forma fraca tanto a COX-1 quanto a COX-2. No caso da indometacina, ela está enquadrada no grupo 1, onde estão os NSAIDs que são fracamente seletivos, inibem totalmente tanto a COX-1 quanto a COX-2 (WARNER et al., 1999; BACCHI et al., 2012).

As PGs são os produtos finais do ácido araquidônico (AA), liberado por fosfolípídeos da membrana celular, produzidos via COX. O AA é um ácido graxo essencial, da família ômega-6, formado por uma cadeia de 20 carbonos com quatro ligações duplas nas posições 5, 8, 11 e 14. Quando esse AA é liberado em resposta a

uma variedade de estímulos, é convertido *via* COX e lipoxigenase (LOX), até chegar a um mediador lipídico conhecido como eicosanoide. A *via* COX, que apresenta duas isoformas (COX-1 e COX-2), é o primeiro passo para a biossíntese das PGs e tromboxanos (TxA) (VANE et al., 1998; SMITH et al., 2000.; BACCHI et al., 2012).

Os efeitos farmacológicos dos NSAIDs ocorrem devido à inibição da COX e a subsequente diminuição da síntese de PGs, levando à diminuição da inflamação, dor e febre (SIMMONS et al., 2004). Essa diminuição de PGs leva a uma larga escala de efeitos colaterais que são associados com os NSAIDs, incluindo complicações gastrointestinais, problemas cardiovasculares, toxicidade renal, hipertensão e retenção de líquidos (JONES, 2001; BACCHI et al., 2012).

Esses efeitos são maiores nos NSAIDs não seletivos (nsNSAIDs), pois como não inibem apenas a COX-2, mas também a COX-1, que está relacionada a manutenção e integridade da mucosa GI e a citoproteção do trato gastrointestinal (GI). Essa inibição aumentada é a principal causa da alta incidência de úlceras GI e potencialmente levando o paciente a morte devido a perfuração e sangramento da parte superior da região GI (HERNANDEZ-DIAZ & RODRIGUEZ, 2000; BACCHI et al., 2012).

O uso do composto ATL-313 (agonista do receptor de adenosina A2a) em ratos, antes do uso da indometacina, que induz à úlceras gástricas, mostrou que esse composto reduziu de forma significativa essas ulcerações, e esse efeito é completamente bloqueado com a adição de um equimolar chamado ZM241385, que é um antagonista do receptor de adenosina A2a (KOIZUMI et al., 2009). Outro composto que também é capaz de diminuir significativamente a ulceração provocada por indometacina é a tioredoxina, usada antes da administração da indometacina (NAKAJIMA et al., 2012).

Existem estudos que analisam os efeitos de vários inibidores da COX, incluindo a indometacina administrada intracisternalmente, em gânglios trigeminais em compressão, onde a resposta para a dor alodinia foi inibida (YANG et al., 2009a). Em outro estudo, a indometacina teve a capacidade de inibir a vasodilatação dural por estímulos elétricos, tendo este medicamento acarretando uma menor duração dessa vasodilatação em comparação com naproxeno e ibuprofeno. A indometacina também é capaz de inibir a vasodilatação induzida por óxido nítrico (NO), fato que separa a indometacina de outros fármacos, como, naproxeno e ibuprofeno (SUMM et al., 2010).

Outros estudos realizados com culturas de células mostram que a indometacina promove adipogênese e diminui a osteogênese, aumentando a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros (WILLIAMS & POLAKIS, 1977; VERRANDO et al., 1981; KNIGHT et al., 1987; KELLY & GIMBLE, 1998), isso significa que pode ocorrer atraso na cura de uma fratura se nesse processo for utilizado um inibidor da

COX2, que é o caso da indometacina, como já foi evidenciado em coelhos, camundongos e ratos (GOODMAN et al., 2002; SIMON et al., 2002; NAIK et al., 2009).

Como vários trabalhos mostram, a indometacina é muito usada *in vivo* para induzir lesões gástricas em ratos, bastando apenas 20 mg/kg e 6 horas para que haja a indução de lesões gastrointestinais (JUNG et al., 2012; ANTONISAMY et al., 2014; YAMAMOTO et al., 2014).

Segundo Manjanna et al. (2010), há um grande interesse que esse tipo de tecnologia de nanoencapsulamento seja desenvolvido para criação de novos veículos de transporte para os NSAIDs, melhorando a sua distribuição, mas permanecendo com a sua rota oral. Nesse método há uma redução da dosagem, ocorrendo a diminuição da irritação gastrointestinal e melhorando também a adesão do paciente ao tratamento.

A Indometacina, quando não nanoencapsulada pode causar problemas gastrointestinais, problemas cardiovasculares, toxicidade renal, entre outros; como já foi visto anteriormente. Bernardi et al. (2009) mostra que a Indometacina quando nanoencapsulada por nanopartículas poliméricas (poly (ϵ -caprolactone), que apresenta uma estrutura parecida com a nanopartícula usada no presente trabalho; pode, de forma significativa, levar a Indometacina até os locais de inflamação e melhorar sua eficiência, diminuindo a dose usada. Também é observado que há uma diminuição, através desse composto, de complicações gastrointestinais, sendo uma alternativa de tratamento para doenças inflamatórias crônicas.

Pirozzi et al. (1989) mostra que a Indometacina, em doses baixas (2mg/kg), não causa genotoxicidade na medula óssea de camundongos, através do teste do micronúcleo. Nesse trabalho, também, na mesma dose administrada, a Indometacina pode diminuir a quantidade de micronúcleos que foi induzido pelo controle positivo, o benzeno. Mas, em doses mais altas (36 mg/kg) pode levar à uma genotoxicidade na medula óssea e em espermatozóides (DEVI & POLASA, 1987).

Como a Indometacina sozinha pode causar genotoxicidade e a Indometacina Nanoencapsulada pode ser mais eficiente, e apresenta uma diminuição de seus efeitos colaterais sob o trato gastrointestinal, é importante realizar também uma análise de sua genotoxicidade, para ver se a interação com a Indometacina e uma nanopartícula pode levar a um aumento de sua genotoxicidade.

1.3 Cultivo celular e HepG2

O cultivo de células de tecido teve início no final do século XIX. Esse procedimento tem sido muito usado para estudos fisiológicos, mecanismos de ação de drogas, resposta imune, sinalização celular, produção de vacinas, entre outros. Tal cultivo deve ser realizado em condição asséptica, sendo esse um dos grandes desafios de se cultivar células. Outro desafio dessa metodologia é que para o cultivo de células *in vitro*, há uma necessidade de mimetizar as mesmas condições nutricionais encontradas *in vivo*. Deve-se garantir condições físico-químicas, como pH e osmolaridade adequada e um sistema de tamponamento para não ocorrer uma brusca variação do pH.

As culturas celulares podem ser divididas em três tipos: cultivo primário, cultivo secundário e linhagem contínua. No cultivo primário as células são diplóides e foram extraídas de órgãos ou tecidos, a sua multiplicação é de 3 a 20 passagens *in vitro*. No cultivo secundário, as células também são diplóides, mas as passagens podem chegar de 60 a 80 *in vitro*. A principal linhagem é da linhagem contínua, onde as células são heteroplóides, e são capazes de se propagar em um número indefinido, *in vitro* (BROCK, 2010; MURRAY, 2010; TORTORA, 2011).

Muitos testes genotóxicos normalmente são feitos com bactérias ou células de mamíferos não metabolizadoras (CHO, linfócitos, células HeLa), células que não apresentam enzimas para realizar o metabolismo de mutágenos indiretos (pré-carcinógenos), que precisam sofrer algum tipo de mudança na sua estrutura para que sejam capazes de causar algum tipo de mutação ao DNA. Então, para contornar isso, são usadas enzimas em forma de uma mistura, conhecida como “fração S9” (KUGLER et al., 1987; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003), ou então são usadas células que apresentam de forma endógena as enzimas necessárias para a metabolização de xenobióticos.

As células da linhagem de um hepatoma celular, conhecido como HepG2, são um tipo de linhagem contínua, onde a sua multiplicação é indefinida. Essa linhagem se assemelha ao epitélio e ao parênquima hepático, tendo também, a capacidade de produzir e liberar a maioria das proteínas plasmáticas características das células hepáticas humanas, sendo consideradas metabolizadoras (KNASMULLER et al., 1998).

Para que essa metabolização ocorra, a HepG2 precisa conservar sua atividade enzimática de fase I, como, citocromo p450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, e de fase II, glutathione-S-transferases, sulfotransferases, N-Acetiltransferases e glucoranosiltransferases. Essas enzimas estão envolvidas no metabolismo de pré-

carcinógenos (UHL, HELMA & KNASMULLER, 1999; LAMY et al., 2004; CHEQUER et al., 2009).

No trabalho de Valentin-Severin e colaboradores (2003) foram testados mutágenos diretos e indiretos a fim de avaliar quais são os melhores controles a serem usados com a HepG2, usando o ensaio cometa (EnC) e teste do micronúcleo (MN). Os estudos mostraram que no ensaio cometa, o composto metanossulfato de metila (MMS) apresenta uma maior capacidade de fragmentação do DNA. Já para o teste do micronúcleo é necessário usar outro controle, o benzo-alfa-pireno (bap), o qual é considerado um pré-carcinógeno, ou seja, precisa ser metabolizado para causar genotoxicidade. A diferença entre efeitos no EnC e no teste do MN é basicamente, a variação de mutações no DNA e em cromossomos que o sistema detecta. No EnC são lesões passíveis de serem reparadas, e no teste do MN são detectadas lesões irreparáveis, como quebras em cromossomos e/ou efeitos aneugênicos.

Outros trabalhos mostram que o EnC e o teste do MN de forma conjunta, com células metabolizadoras e não metabolizadoras, podem detectar se o alvo da pesquisa é ou não mutagênico, ou se pode proteger de algum composto que comprovadamente já promova um genotoxicidade (SCOLASTICI et al., 2008; BARCELOS et al., 2009; BENHUSEIN et al., 2010).

Essas poucas considerações mostram que, a linhagem celular HepG2 é muito importante para realização de pesquisas, uma vez que mimetiza *in vitro* a metabolização de fármacos que ocorrera *in vivo*. No caso específico desta pesquisa, o uso desta linhagem foi fundamental para a verificação de algum tipo de genotoxicidade e citotoxicidade, permitindo a comparação da ação da substância teste sobre o genoma de linfócitos humanos, que são células não metabolizadoras.

1.4 Avaliação da viabilidade e citotoxicidade celular

Antes se começar os experimentos de genotoxicidade há a necessidade de realizar experimentos para avaliar qual a concentração mínima e máxima para ocorrência de uma viabilidade celular maior que 80%. Esse tipo de ensaio mostra se o composto a ser testado tem algum efeito sobre a proliferação celular ou mostram a citotoxicidade de forma direta, levando às células a morte (RISS et al., 2013).

Tradicionalmente a determinação da viabilidade celular é feita contando as células usando corantes específicos, como teste de exclusão pelo azul de Tripán, que não é um teste muito sensível, mas é um método simples, e útil para avaliar a integridade da membrana plasmática (PANDA et al., 2012). O princípio do teste

demonstra que as células mortas, que perderam a sua seletividade da membrana plasmática, absorvem o corante, enquanto as células com membranas íntegras não se coram com o azul de tripan (TENNANT, 1964; AVELAR-FREITAS et al., 2014).

Outro método usado na avaliação da viabilidade e citotoxicidade é baseado na transformação e na quantificação da cor do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium). Esse método foi primeiramente descrito por Mosmann em 1983, e em 1986 foram feitas algumas modificações por Denizot e Lang (FREIMOSER et al. 1999). A quebra do MTT apresenta algumas propriedades interessantes para ensaios de proliferação e citotoxicidade. Todos os organismos vivos transformam o MTT em cristais de formazan, que apresentam uma coloração roxa, isso ocorre através do metabolismo mitocondrial, e apresenta uma absorbância máxima de 570 nm. Quando ocorre a morte celular, essas células perdem a capacidade de transformar o MTT em formazan, sendo útil para marcar células que estão vivas. Essa redução realizada para transformar o MTT em formazan envolve reação com NADH e moléculas similares que transferem elétrons para o MTT. Esse produto insolúvel começa a se acumular e formar um precipitado dentro do poço das células e na superfície celular. Para que esse cristal fique solúvel é necessária uma solução como o dimetilsulfóxido (DMSO), e assim é realizada a leitura através de um espectrofotômetro (RISS et al., 2013).

1.5 Mutagênese e nanotoxicologia

A definição de uma mutação é quando surge uma permanente alteração ao DNA ou à um cromossomo inteiro, podendo ser prejudicial, ou não, ao indivíduo. (LEWIN, 2000). Esses danos ao DNA apresentam um papel importante na mutagênese, carcinogênese e no envelhecimento. Exposições a produtos químicos, agentes físicos e biológicos, podem ser um gatilho para começar o processo de mutagênese, podendo levar a um câncer. Para que fossem estudadas essas mutações, criou-se a mutagênese, onde são estudados os processos de indução de danos ao DNA e/ou quebras de cromossomos (clastogênicos). (SCCNFP, 2003; BONT & LAREBEKE, 2004).

Essas alterações podem ocorrer tanto em células somáticas quanto em células germinativas, e quando não sofrerem ação pelos mecanismos de reparo (*Nucleotide excision repair* (NER), *Base excision repair* (BER), *Mismatch Repair* (MMR) e *Double strand break repair* (DSBR)), podem levar ao aparecimento de mutações. Se caso ocorrer em células germinativas, essa mutação pode se tornar hereditária, causando doenças e síndromes em seus descendentes (RIBEIRO et al., 2003; IYAMA & WILSON III, 2013).

O principal objetivo dessa importante área da genética é investigar se qualquer produto que possa entrar em contato com seres humanos, de alguma forma, é ou não mutagênico, já que a maioria dos produtos que alteram o DNA ou cromossomos podem ser considerados carcinogênicos. Essa relação entre mutagênese e carcinogênese mostra a importância dessa área para a genética toxicológica (McGREGOR et al., 2000).

Para um produto ser considerado um agente mutagênico ele precisa ser capaz de produzir eventos mutacionais no organismo, como modificações de base, de resíduos de açúcar ou fosfato, quebras de filamentos, ou incorporações de bases modificadas (PRESTON et al., 1987; ZAHA, 1996). De maneira geral, a mutação pode ser dividida em mutação cromossômica, onde há quebra ou rearranjo cromossômico e mutação gênica, onde há alteração de um alelo de um gene, sendo uma mutação pontual (NUSSBAUM et al., 2006).

Partículas com tamanho que variam de 1 a 100 nm, podem ser usadas como formas de distribuição de fármacos, onde podem ser transportadas pelo corpo com facilidade, levantando algumas perguntas; como, quais seus efeitos genotóxicos? Qual seu potencial carcinogênico para o ser humano? Para responder essas perguntas foi criada uma nova área na mutagênese, que é a nanotoxicologia (MAYNARD, 2012; MAGAYE et al., 2012).

Muitos estudos avaliam a toxicologia de nanopartículas testadas como métodos de distribuição de drogas, usando os mais variados materiais, como nanopartícula de ouro (SUNG et al., 2011; FRAGA et al., 2012), nanopartícula de hidroxiapatita (XU et al., 2012; TURKEZ et al., 2014), nanopartícula de carbono (SAMRI et al., 2013; EMA et al., 2013), nanopartícula de zinco (GAO et al., 2013). Mas não há estudos da genotoxicidade da EUDRAGIT® L100 (polietileno glicol, polissorbato 80) juntamente com a Indometacina.

Para a realização de tais testes de genotoxicidade foram usados o ensaio cometa e o teste do micronúcleo *in vitro*, esses dois testes têm grande aceitação na comunidade científica. Entre todos os testes existentes para avaliação de genotoxicidade, eles apresentam uma robustez, sensibilidade e capacidade estatística para avaliar quebras a DNA e cromossomos (ARALDI et al., 2015).

1.5.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa (esC), também conhecido como “*single cell gel eletrophoresis*” (SCGE) foi introduzido primeiramente por Östling e Johanson em 1984. Usado principalmente na identificação de substâncias genotóxicas, é um método rápido e

sensível para a detecção de danos ao DNA. Pode ser realizado tanto em material *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*. Também são feitos estudos de reparo ao DNA, cinética e sobre o tipo de lesão reparada (FAIRBAIRN et al., 1992; TICE et al., 2000; KAWAGUCHI et al., 2010). Essa técnica é capaz de detectar quebras no DNA, que podem ser visualizadas pela migração do DNA livre, esses fragmentos de DNA migram do ânodo para o cátodo através da eletroforese, resultando em imagens similares a um cometa, justificando o nome do ensaio (KLAUDE et al., 1996).

Nesse trabalho foi usado o método alcalino ($\text{pH} > 13$), modificado do método original por Singh et al. (1988), nas condições alcalinas há uma maior quantidade de tipo de dano que podem ser verificados, não apenas de fitas duplas do DNA, mas também de fitas simples, sendo o método mais usado e recomendado devido a esse espectro maior de danos detectados (ARALDI et al., 2015).

Para a análise das lâminas, a coloração é feita com um corante fluorescente, como o brometo de etídio (BE), que é o mais usado nas análises, juntamente com o propídio iodado (PI) (KLAUDE et al., 1996; ARALDI et al., 2015). A análise dos cometas é feita através de suas características, tais como, tamanho da cauda, a intensidade da fluorescência emitida e seu aspecto em geral; essa análise pode ser feita de forma visual ou com *softwares* específicos, mas independentemente de como for realizado essa análise, os dois métodos são bastante confiáveis (TICE, 1995; COLLINS, 2004; ANDEM, et al., 2013).

Para uma melhor compreensão da estrutura que é vista assemelhando-se a um cometa, ele pode ser dividido entre cabeça e cauda, ou seja, os nucleóides sem danos ao DNA ou com pouco dano ao DNA não têm segmentos de DNA migrando para o cátodo, assim não apresentam uma cauda, enquanto nucleóides com danos apresentam uma cauda, que é diretamente relacionado com a quantidade de fragmentação do DNA. Esse método de contagem pode ser dividido em quatro classes: classe 0, classe 1, classe 2 e classe 3. Na classe 0 os nucleóides não apresentam cauda; classe 1, nucleóides apresentam cauda menor que o diâmetro da “cabeça”; classe 2, os nucleóides com cauda do tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro da “cabeça”; e na classe 3 os nucleóides apresentam uma cauda de tamanho entre 2 a 3 vezes o diâmetro da “cabeça” do cometa (KOBAYASHI et al., 1995).

O teste do cometa avalia apenas lesões genômicas primárias, que são passíveis de reparo, esses danos ao DNA acontecem antes que o sistema de reparo atue. Por isso é importante fazer esse teste em paralelo com o teste do micronúcleo, que detecta quebras no cromossomo, e não há possibilidade de reparo (PIPERAKIS, 2009). Sendo assim, esse teste também pode ser usado em estudos de reparo ao DNA, podendo ser capaz de

verificar a cinética e o tipo de lesão e reparo que ocorreu na célula (TICE et al., 2000; RIBEIRO et al., 2003).

Como é um teste bastante sensível, vários fatores podem afetar essa sensibilidade, como a natureza química, mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração da agarose de baixo ponto de fusão (LMPA) que é depositada sob a lâmina (LMPA está diretamente relacionada com o resultado do EnC, quanto maior a concentração de agarose, maior a dificuldade dos fragmentos de DNA migrarem para o cátodo), a composição da solução de lise e o tempo de lise, juntamente com o tempo de desnaturação alcalina do DNA podem influenciar no quanto esse DNA sofreu lise, para que possa migrar na eletroforese; também a composição do tampão de eletroforese, as condições da corrida, como a voltagem, a coloração na hora da leitura, são alguns pontos que precisam ser observados ao realizar o ensaio cometa (SPEIT & HARTMANN, 1999; SPEIT et al., 1999).

O EnC também é o teste mais usado para avaliar genotoxicidade de nanomateriais segundo Vandghanooni e Eskandani (2011), usando principalmente o método alcalino. Também é muito aceito e usado em diferentes áreas para a investigação de genotoxicidade sob vários aspectos, como estudos de reparo do DNA, biomonitoramento, estudo de células apoptóticas, dentre outros objetivos (FAUST et al., 2004; ARAÚJO, 2008; COLLINS, 2009).

1.5.2 Teste do Micronúcleo

O Teste do Micronúcleo (MN) foi descrito pela primeira vez por Schmid em 1974. É considerado um importante biomarcador, usado *in vitro* e *in vivo*, verificando danos citogenéticos através de células de organismos expostos a agentes mutagênicos. O MN consiste em um evento importante na carcinogênese, muito usado na predição do risco para câncer, monitoramento para a resposta da quimioterapia e radioterapia (BHATIA & KUMAR, 2012; ARALDI et al., 2015). É um teste para pesquisar agentes clastogênicos (que causam quebras cromossômicas) e aneugênicos (que interferem no aparato mitótico). Essa técnica é internacionalmente aceita como parte da bateria de testes recomendados para avaliação de genotoxicidade, para os registros de novos medicamentos e produtos químicos que entram no mercado mundial (CHOY, 2001). Um esquema da formação do micronúcleo e de pontes nucleoplasmáticas é visto na figura 4.

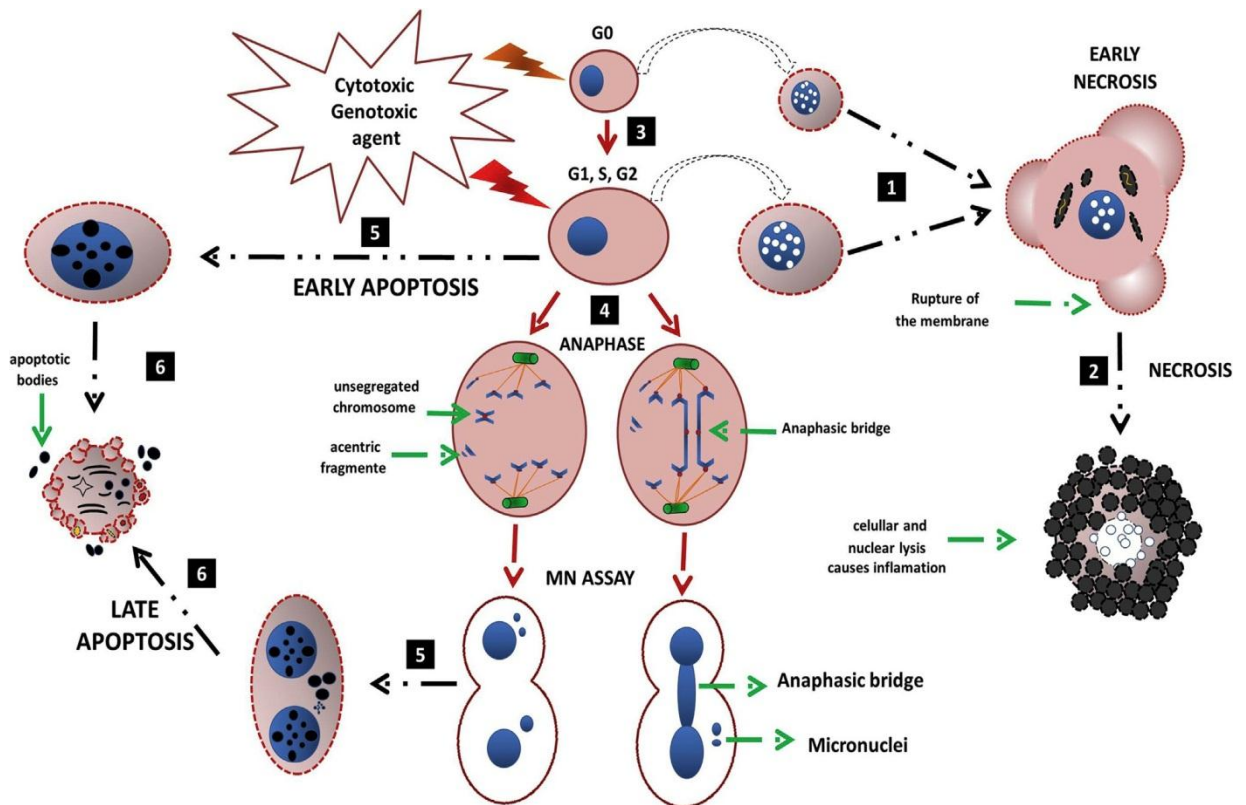


Figura 4. Diferentes caminhos de uma droga mutagênica. Agente citotóxico induzindo uma necrose precoce (1), que evolui para uma necrose (2). Agente genotóxico induz danos ao DNA durante a fase G₀ e fase S (3), que pode levar à um apoptose (5), resultando na formação de corpos apoptóticos, durante até a fase posterior do apoptose (6) ou, deixando danos ao cromossomo, resultando na formação de micronúcleo através da quebra e/ou interferência do aparato mitótico da célula (4). Células micronucleadas podem ser destinadas a sofrerem apoptose (5 e 6). Fonte: Araldi et al., 2015.

Micronúcleos são pequenos corpos que estão separados do núcleo principal, originados principalmente por quebras cromossômicas e por disfunção do aparato mitótico. Esse pequeno corpo é então coberto pela membrana nuclear e tem aparência semelhante ao núcleo principal, mas é muito menor que ele. O principal mecanismo para a formação do micronúcleo é a hipometilação das regiões dos centrômeros e paracentrômeros, que normalmente são hipermetiladas, criando então conexões erradas dos microtúbulos na hora da divisão mitótica (FENECH et al., 2011; LUZHNA et al., 2013). Não é possível, usando a metodologia original, verificar se esse micronúcleo apareceu através de um fragmento cromossômico, ou se contém um cromossomo inteiro. Isso pode ser feito fundindo o Teste do Micronúcleo com a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) usando sondas de regiões pericentroméricas (MATEUCA et al., 2006).

Fenech & Morley, em 1985, introduziram o uso da Citocalasina-B no teste do micronúcleo, criando o ensaio do micronúcleo *in vitro* com bloqueio da citocinese (MNCtB), que acabou se tornando um teste padrão para a análise da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos. Podem ser avaliados outros parâmetros na mesma lâmina, como a viabilidade celular, que pode ser detectada através da análise das células

necróticas e apoptóticas; a realização do índice de divisão nuclear (IDN) através da contagem das células mono, bi e tetra nucleadas; também a instabilidade cromossômica ou extensão do dano através da análise da presença de micronúcleo, ponte nucleoplasmática e brotos nucleares (FENECH, 2006).

Segundo Fenech (2006), as pontes nucleoplasmáticas devem ser avaliadas, pois elas evidenciam um rearranjo cromossômico, que não é verificado caso apenas o MN seja avaliado. Já o processo da produção de brotos nucleares acontece na fase-S, e esses brotos apresentam a mesma morfologia de um MN, exceto que eles estão ligados juntamente com o núcleo principal pelo material nucleoplasmático.

Para a identificação de uma célula binucleada com ou sem micronúcleo é preciso observar se os dois núcleos apresentam uma membrana plasmática intacta e se estão situados no limite citoplasmático, também precisam ter aproximadamente os mesmos tamanhos e mesma intensidade de coloração. Já os micronúcleos, também devem possuir essa morfologia, com o diferencial que o diâmetro deve variar de 1/16 até 1/3 do diâmetro do núcleo principal (FENECH, 2000).

No presente trabalho, o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese foi aplicado em células não metabolizadoras (linfócitos humanos) e células metabolizadoras (células de hepatoma humano, HepG2).

2. Objetivos gerais

Tendo em vista que a Indometacina Nanoencapsulada (NI) é uma nova alternativa para a administração de medicamentos, o presente trabalho teve por objetivo investigar a toxicidade genética deste nanomaterial em células humanas.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar o potencial citotóxico e genotóxico *in vitro* da Indometacina Nanoencapsulada, por intermédio do ensaio cometa e teste do micronúcleo, usando duas diferentes linhagens celulares: uma não metabolizadora, os linfócitos humanos; e outra metabolizadora, células de um hepatoma humano (HepG2).

3. Referências

ALBANESE, A.; CHAN, W.C. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano*. v. 5, n. 7, p. 5478-5489, 2011.

- ANDEM, A.B.; AGBOR, R.B.; EKPO, I.A. Review on Comet Assay: A reliable tool for assessing DNA damage in animal models. **Journal of Current Research in Science**. v. 1, n. 6, p. 405-427, 2013.
- ANTONISAMY, P. et al. Gastroprotective Activity of Violacein Isolated from *Chromobacterium violaceum* on Indomethacin-Induced Gastric Lesions in Rats: Investigation of Potential Mechanisms of Action. **The scientific world Journal**, v. 2014, p. 10, 2014.
- ARALDI, R.P., et al. Using the comet and micronucleus assay for genotoxicity studies: A Review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 72, p. 74 – 82, 2015.
- ARAÚJO, M.M. Aplicação do método microbiológico DEFT/APC e do teste do cometa na detecção do tratamento com radiação ionizante de hortaliças minimamente processadas. **Tese de doutorado**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, SP, Brasil, 2008.
- AVELAR-FREITAS, B.A., et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 47, p. 307 – 315, 2014.
- BACCHI, S., et al. Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs: A review. **Anti-inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medical Chemistry**, v. 11 p. 52 – 64, 2012.
- BARCELOS, G. R., et al. Effect of Annatto on Micronuclei Induction by direct and indirect mutagens in HepG2 Cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**.v.50, p. 808 – 814, 2009.
- BARZEGAR-JALALI, M., et al. Comparison of physicochemical characteristics and drug release of diclofenac sodium–eudragit® RS100 nanoparticles and solid dispersions. **Powder Technology**, v. 219, p. 211–216, 2012.
- BECK, P.L., et al. Mechanisms of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice. **Gastroenterology**, v. 119, p. 699 – 705, 2000.
- BENHUSEIN, G. M. et al. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. **Libyan J Med**. v. 5, 2010.
- BERNARDI, A., et al. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 158, p. 1104-1111, 2009.
- BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. **Acta Pathologia, microbiologica, etimmunologica Scandinavica**. v. 121, p. 569-581, 2012.
- BHATTACHARYYA, D., et al. Nanotechnology, big things from a tiny world: A Review. **International Journal of u- and e- Service, Science and technology**. v. 2, n. 3, p. 29-38, 2009.
- BONT, R.D.; LAREBEKE, N. V. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**. v. 19, p. 169 – 185, 2004.

BROCK, THOMAS D.; MADIGAN, MICHAEL T. ET AL. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre:Artmed, 2010.

CALDORERA-MOORE, M., et al. Designer nanoparticles: Incorporating size shape and triggered release into nanoscale drug carriers. **Expert Opin. Drug Deliv.** v. 7, n. 4, p. 479-495, 2010.

CARUSO, I.; PORRO, G. B. Gastroscopic evaluation of anti-inflammatory agents. **British medical journal**, v. 280, n. 6214, p. 645–6, 1980.

CHEQUER, F. M. D., et al. The azo dyes Disperse Red1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research.** v. 676, p. 83 – 86, 2009.

CHOY, W. N. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. Marcel Dekker, Inc, New York: 2001.

COLLINS, A. R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research.** v. 681, p. 24-32, 2009.

COLLINS, A. The comet assay for DNA damage and repairs. **Molecular Biotechnology.** v. 26, p. 249-261, 2004.

DECUZZI, P., et al. Intravascular Delivery of particulate systems: Does geometry really matter?. **Pharm. Res.** v. 26, p. 235-243, 2009.

DENIZOT, F.; LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. immunol. Methods.** v.89, p. 271 – 277, 1986.

DEVI, P.; POLASA, H. Evaluation of the anti-inflammatory drug Indomethacin, for its genotoxicity in mice. **Mutation Research.** v. 188, p. 343 – 347, 1987.

DUNCAN, R. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. **Nature Reviews Cancer.** v. 6, p. 688-701, 2006.

DUPEYRÓN, D. et al. Design of Indomethacin-loaded nanoparticles: Effect of polymer matrix and surfactant. **Int J Nanomedicine.** v. 8, p. 3467-3477, 2013.

EMA, M., et al. In vivo comet assay of multi-walled carbon nanotubes using lung cells of rats intratracheally instilled. **Journal of Applied Toxicology.** v.33, p. 1053 – 1060, 2013.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL K.L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research.** v. 339, p. 37-59, 1995.

FAUST, F., et al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research.** v. 566, p. 209-229, 2004.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.** v. 600, p. 58-66, 2006.

FENECH, M.; MORLEY, A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios.** v. 43, p. 172-173, 1985.

FENECH, M., et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis.** v. 26, p. 125-132, 2011.

FRAGA, S., et al. Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticle in human HepG2 Cells. **Journal of Applied Toxicology.** v.33, p. 1111 – 1119, 2012.

FREIMOSER, F. M., et al. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 65, p. 3727 – 3729, 1999.

GAO, L., et al. Acute toxicity of zinc oxide nanoparticle to the rat olfactory system after intranasal instillation. **Journal of Applied Toxicology.** v.33, p. 1079 – 1088, 2013.

GOODMAN, S. et al. COX-2 selective NSAID decreases bone ingrowth in vivo. **J Orthop Res.** v. 20, p. 1164 – 1169, 2002.

HAO, S., et al. Preparation of Eudragit L 100-55 enteric nanoparticles by a novel emulsion diffusion method. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 108, p. 127-133, 2013.

HE, L., et al. Intelligent hydrogels for drug delivery system. **Recent Pat. Drug Deliv. Formul.** v. 5, n. 3, p. 265-274, 2011.

HENRY, D. et al. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. **BMJ.** v. 312, p. 1563-1566, 1996.

HERNANDEZ-DIAZ, S.; RODRIGUEZ, L.A. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper gastrointestinal tract bleeding/perforation: An overview of epidemiologic studies published in the 1990s. **Arch. Intern. Med.** v. 160, p. 2093 - 2099, 2000.

HUSSAIN, N.; JAITLEY, V.; FLORENCE, A. T. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 50, p. 107–142, 2001.

IGNJATOVIĆ, N. et al. Nanoparticles of cobalt-substituted hydroxyapatite in regeneration of mandibular osteoporotic bones. **J. Mater. Sci. Mater.** v. 24, n. 2, p. 343-354, 2012.

IYAMA, T.; WILSON III, D.M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair.** v.12, p. 620 – 636, 2013.

JONES, R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. **Am. J. Med.** v. 110, p. 4 – 7, 2001.

JUNG, J.; NAM, Y.; SOHN U. Inhibitory effects of ECQ on indomethacin-induced gastric damage in Rats. **Korean J Physiol Pharmacol.** v. 16, p. 399 – 404, 2012.

KADAM, S.R.; DAVID, W.A.; KOMPELLA, U.B. Nano-advantage in Enhanced Drug Delivery with Biodegradable Nanoparticles: Contribution of Reduced Clearance. **The American Soc. For Pharm. And Experimental Therapeutics**. v. 40, n. 7, 2012.

KAWAGUCHI, S., et al. Is the Comet Assay a Sensitive Procedure for Detecting Genotoxicity? **J of Nucleic Acids**. v. 2010, p. 8, 2010.

KELLY, K.A.; GIMBLE J.M. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 inhibits adipocyte differentiation and gene expression in murine bone marrow stromal cell clones and primary cultures. **Endocrinology**. v. 139, p. 2622 – 2628, 1998.

KIZILTEPE, T., et al. Rationally engineered nanoparticles target multiple myeloma cells, overcome cell-adhesion-mediated drug resistance, and show enhanced efficacy in vivo. **Blood Cancer Journal**. v. 2, n. 4, p. 64-74, 2012.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**. v. 363, p. 89-96, 1996.

KNASMULLER, S., et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**. v. 402, p. 185-202, 1998.

KNEIPP, J., et al. In vivo molecular probing of cellular compartments with gold nanoparticles and nanoaggregates. **Nano Lett**. v. 6, n. 10, p. 2225-2231, 2006.

KNIGHT, D.M., et al. Requirements for triggering of adipocyte differentiation by glucocorticoids and indomethacin. **Mol Endocrinol**. v. 1, p. 36 – 43, 1987.

KOBAYASHI, H., et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun**. v. 3, p. 103-115, 1995.

KOIZUMI, S., et al. Attenuation of gastric mucosal inflammation induced by indomethacin through activation of the A2A adenosine receptor in rats. **J Gastroenterol**. v. 44, p. 419-425, 2009.

KOSTARELOS, K. Rational design and Engineering of delivery systems for therapeutics: Biomedical exercises in colloid and surface science. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 106, n. 2003, p. 147-168, 2003.

KUGLER, U., et al. The effectiveness of S9 and microsomal mix on activation of cyclophosphamide to induce genotoxicity in human lymphocytes. **Mutat. Res**. v. 187, p. 151 – 156, 1987.

LAMY, E. et al. Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells. **Toxicol. Lett**. v. 146, p. 103-109, 2004.

LEE, S.Y., et al. Design of bio-mimetic particles with enhanced vascular interaction. **J. Biomech**. v. 42, p. 1885-1890, 2009.

LEUCUTA, S.E. Nanotechnology for Delivery of Drugs and Biomedical Applications. **Curr Clin Pharmacol**. v. 5, n. 4, p. 257-280, 2010.

- LEWIN, B. (Ed) *Genes VII*. USA: Oxford University Press, 2000. In: NEGRAES PD.
- LIM, E. et al. Delivery of Cancer Therapeutics Using Nanotechnology. **Pharmaceutics**. v. 5, p. 294-317, 2013.
- LIM, E., et al. pH-triggered drug-releasing magnetic nanoparticles for cancer therapy guided by molecular imaging by MRI. **Adv. Mater.** v. 23, n. 21, p. 2436-2442, 2011.
- LIU, T., et al. Temperature-sensitive nanocapsules for controlled drug release caused by magnetically triggered structural disruption. **Adv. Function. Mater.** v. 19, n. 4, p. 616-623, 2009.
- LOBATTO, M.E., et al. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 10, p. 835-852, 2011.
- LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in Genetics**. v. 4, p. 1 – 17, 2013.
- MAcDONALD, T.M., et al. Association of upper gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with continued exposure: cohort study. **BMJ**. v. 315, n. 7119, p. 1333-1337, 1997.
- MAGAYE, R. et al. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 4, p. 551 – 561, 2012.
- MALACINSKI, G.M. **Fundamentos da Biologia Molecular**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2005.
- MANJANNA, K.M., et al. Microencapsulation: An acclaimed novel drug-delivery system for NSAIDs in Arthritis. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 27, p. 509 - 545, 2010.
- MATEUCA, R., et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**. v. 88, p. 1515-1532, 2006.
- MAYNARD, R.L. Nano-technology and nano-toxicology. **Emerg. Health Threats Journal**. v.5, p. 1 – 8, 2012.
- McGREGOR, J.T. et al. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**. v. 455, p. 3 – 20, 2000.
- MINCHINTON, A.I., TANNOCK, I.F. Drug penetration in solid tumors. **Nature Reviews Cancer**. v. 6, n. 583-592, 2006.
- MODY, V.V.; COX, A., SHAH, S. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. **Appl. Nanosci**. v. 4, p. 385-392, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**. v. 65, p. 55 – 63, 1983.

- MULLER, R.H.; KECK, C.M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs-A review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. **J. Biotech.** v. 113, p. 151-170, 2004.
- MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Mutagenicidade e Antimutagenicidade da Clorofilina – Uma avaliação do seu mecanismo de ação in vitro. **Dissertação de Mestrado.** UEL. Londrina: 2003.
- NAIK, A.A., et al. Reduced COX-2 expression in aged mice is associated with impaired fracture healing. **J Bone Miner Res.** v. 24, p. 251 – 264, 2009.
- NAKAJIMA, A., et al. Attenuation of indomethacin-induced gastric mucosal injury by prophylactic administration of sake yeast-derived thioredoxin. **J Gastroenterol.** v. 47, p. 978 – 987, 2012.
- NAM, J., et al. pH-induced aggregation of gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. **J. Am. Chem. Soc.** v. 131, n. 38, p. 13639-13645, 2009.
- NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson Genética Médica.** Ed. Guanabara Koogan, 6º ed, 2006.
- OH, W.K., et al. Cellular uptake cytotoxicity and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. **ACS Nano.** v. 4, n. 9, p. 5301-5313, 2010.
- ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 123, p. 291-298, 1984.
- PANDA, A.; KRISHNA, S.N.; DADA, T. Outcome of phacoemulsion in eyes with cataract and cornea opacity partially obscuring the pupillary area. **Nepal J Ophthalmol.** v.4, p. 217-223, 2012.
- PIPERAKIS, S.M. Comet Assay: A brief history. **Cell Biol Toxicol.** v. 25, p. 1-3, 2009.
- PIROZZI, S.J., et al. The prevention of benzene-induced genotoxicity in mice by Indomethacin. **Mutation Research.** v. 222, p. 291-298, 1989.
- PRESTON, R.J., et al. Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. **Mutation Research.** v, 189, p. 157 – 165, 1987.
- PROKOP, A.; DAVIDSON, J. M. Nanovehicular Intracellular Delivery Systems. **J. Pharm Sci.** v. 97, p. 3518-3590, 2013.
- QUINTILIANI, R.; QUINTILIANI, R. Pharmacokinetics/Pharmacodynamics for critical care clinicians. **Crit Care Clin.** v. 24, p. 335-348, 2008.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTE, J.M.; GARDNER, P. **Farmacologia.** Elsevier, 6ª ed. 2007.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI D.M.F.; MARQUES E.K. **Mutagênese Ambiental.** 1ª Ed. Ed. Ulbra, Canoas, 2003.
- RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. **Assay guidance Manual.** Bethesda, 2013.

SAMRI, M.T., et al. Lung toxicities of core-shell nanoparticles composed of carbon, cobalt, and silica. **International Journal of Nanomedicine**. v.8, p. 1223 – 1244, 2013.

SCCNFP – THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NONFOODPRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. Proposal for recommended mutagenicity/genotoxicity tests for the safety testing of cosmetic ingredients to be included in the annexes to Council Directive 76/768/EEC. 2003.

SCHMIDMAIER, R.; BAUMANN, P. Anti-adhesion evolves to a promising therapeutic concept in oncology. **Curr. Med. Chem**. v. 15, p. 978-990, 2008.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**. v. 31, p. 9-15, 1974.

SCOLASTICI, C., et al. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicology in vitro**. v. 22, p. 510 – 514, 2008.

SIMMONS, D.L.; BOTTING, R.M.; HLA, T. Cyclooxygenase Isozymes: The biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. **Pharmacol. Rev**, v. 56, p. 387 – 437, 2004.

SIMON, A.M.; MANIGRASSO, M.B.; O'CONNOR, J.P. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. **J Bone Miner Res**. v. 17, p. 963 – 976, 2002.

SINGH, N. et al. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomater**. v. 30, p. 3891-3914, 2009.

SINGH, N.P., et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 184 – 191, 1988.

SMITH, W.L.; DEWITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Ann. Rev. Biochem**, v. 69, p. 145 – 182, 2000.

SOKOLOVA, V., et al. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. **Biomater**. v. 27, n. 16, p. 3147-3153, 2006.

SPEIT, G.; HARTMANN A. The Comet Assay (Single-cell gel test), A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: HENDERSON, D. S. **Methods in Molecular Biology: DNA repair protocols – Eukaryotic Systems**. Totowa: Humana Press, v. 113, p. 203-211, 1999.

SPEIT, G., et al. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. **Toxicology Letters**, v. 110, p. 73-78, 1999.

SUMM, O., et al. A potential nitrenergic mechanism of action for indomethacin, but not of other COX inhibitors: relevance to indomethacin-sensitive headaches. **J Headache Pain**. v. 11, p. 477 – 483, 2010.

SUNG, H.J., et al. Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. **Particle and fibre toxicology**. v. 8, p. 1 – 18. 2011.

- SURESH, A.K., et al. Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. **Langmuir**. v. 28, n. 5, p. 2727-2735 2012.
- TAKEUCHI, K., et al. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. Relation to gastric hypermotility. **Digestion**. v. 49, p. 175 – 84, 1991.
- TANG, J., et al. Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 2429–35, 2011.
- TENNANT, J.R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**. v. 2, p. 685 – 694, 1964.
- TICE, R.R., et al. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen**. v. 35, p. 206 – 221, 2000.
- TICE, R.R. The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venitt S, editors. **Environmental mutagenesis**. Oxford: Bios Scientific Publishers. p 315-339, 1995.
- TINKOV, S. et al. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers of pharmaceutical. **Science**. v. 98, n. 6, 2009.
- TORTORA, G.J., et al. **Microbiologia**. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- TURKEZ, H., et al. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress and genotoxic responses of hydroxyapatite nanoparticle on human blood cells. **Journal of Applied Toxicology**. v.34, p. 373 – 379, 2014.
- UHL M.; HELMA C.; KNASMULLER S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**. v. 441, p. 215-224. 1999.
- USKOKOVIC V. Entering the Era of Nanoscience: Time to Be So Small. **J Biomed Nanotechnol**. v. 9, n. 9, p. 1441-1470, 2013.
- USKOKOVIC V., et al. Shape effect in the design of nanowire coated microparticles as epithelial drug delivery devices. **ACS Nano**. v. 6, n. 9, p. 7832-7841, 2012.
- USKOKOVIC V. Nanomaterials and nanotechnologies: Approaching the crest of this big wave. **Curr. Nanosci**. v. 4, n. 2, p. 4-119, 2008.
- VALENTIN-SEVERIN, I., et al. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**. v. 536, p. 79 – 90, 2003.
- VANDGHANOONI, S.; ESKANDANI M. Comet Assay: A method to Evaluate Genotoxicity of Nano-Drug Delivery System. **BioImpacts**. v. 2, p. 87-97, 2011.
- VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 38, p. 97 – 120, 1998.

- VERRANDO, P., et al. Differentiation of ob 17 preadipocytes to adipocytes. Triggering effects of clofenapate and indomethacin. **Biochim Biophys Acta**. v. 663, p. 255 – 265, 1981.
- VOLODKIN, D.V., et al. Surface-supported multilayers decorated with bio-active materials aimed at light-triggered drug delivery. **Langmuir**. v. 25, n. 24, p. 14037-14043, 2009.
- WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and cytoprotection. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 21, p. 631 – 641, 1992.
- WARNER, T. D., et al. Nonsteroid drug selectives for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full *in vitro* analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, p. 7563 – 7568, 1999.
- WELLS, L.A., et al. Responding to change: Thermo- and photo-responsive polymers as unique biomaterials. **Crit. Rev. Biomed. Eng.** v. 38, n. 6, p. 487-509, 2010.
- WILCZEWSKA, A.Z. et al. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**. v. 64, p. 1020-1037, 2012.
- WILLIAM, A. et al. **Handbook of Nanoscience, Engineering, and Technology**. 2° Ed. May 2007.
- WILLIAMS, I.H.; POLAKIS S.E. Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. The effect of indomethacin, prostaglandin E1 and cyclic AMP on the process of differentiation. **BiochemBiophys Res Commun**. v. 77, p. 175 – 186, 1977.
- XU, Z., et al. Interactions of Hydroxyapatite with proteins and its toxicological effect to zebrafish embryos development. **Plos One**. v. 7, p. 1 – 9, 2012.
- YAMAMOTO, A., et al. Sodium alginate ameliorates indomethacin-induced gastrointestinal mucosal injury *via* inhibiting translocation in rats. **World Journal of Gastroenterology**. v. 20, p. 2641 – 2652, 2014.
- YANG, G., et al. Intracisternal administration of COX inhibitors attenuates mechanical allodynia following compression of the trigeminal ganglion in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 33, p. 589 – 595, 2009a.
- YANG, L. et al. Receptor-Targeted Nanoparticles for *In Vivo* Imaging of Breast Cancer. **Clin. Cancer Res**. n. 15, v. 14, p. 4722-4732, 2009b.
- ZAHA A. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, p. 336, 1996. In: IVANI A. Efeitos genotóxico da artesinina e do artesunato em células de mamíferos. Dissertação de mestrado. UNESP. 2010.
- ZHAO, Y., et al. Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: Size and surface effects. **ACS Nano**. v. 5, n. 2, p. 1366-1375, 2011.

4. Artigo

***In vitro* study of the cytotoxic and genotoxic potential of indomethacin-loaded with Eudragit® L-100 nanocapsules**

Juliano Gabriel Froder^a, Danay Dupeyrón^b, José Carlos Tavares Carvalho^b, Edson Luis Maistro^{a,c*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada - Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Botucatu, SP, Brazil.

^b Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Macapá, AP, Brazil.

^c Departamento de Fonoaudiologia, Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Marília, SP, Brazil.

* Corresponding author: edson.maistro@marilia.unesp.br

ABSTRACT

Indomethacin is a non-steroidal anti-inflammatory agent which is among the most used classes of drugs worldwide. The use of this drug result in some side effects, such as gastrointestinal complications, among others. So, there is a need to develop better methods of drug delivery in the body, such as the use of nanoparticles. The aim of the present study is to evaluate the cytotoxic and genotoxic potential of indomethacin-loaded with Eudragit® L-100 nanocapsules (NI) (based on methacrylic acid and methyl methacrylate), on lymphocytes (non-metabolizing cell) and HepG2 (metabolizing cell), using comet and Cytokinesis-block Micronucleus (CBMN) assays *in vitro*. The cells were exposed to NI at the concentrations of 5, 10, 50, 125, 250, 500 µg/ml, respectively. The results obtained in the comet assay showed that NI did not induce significant DNA damage in both cell types and in all concentrations tested. The CBMN test confirmed the results obtained in the comet assay; however, a higher concentration of 500 µg/ml produced a small, but statistically significant clastogenic/aneugenic effect in the metabolizing cells, HepG2. The results obtained in this study encourages the development of new studies of this nanomaterial, as a drug delivery of some anti-inflammatories, like indomethacin.

Keywords: Comet assay, Micronucleus test, Eudragit L-100, MTT assay, Drug delivery.

Running head: Indomethacin-loaded with Eudragit L-100 had no genotoxic effects *in vitro*.

1. Introduction

Indomethacin is a Non-steroidal Anti-inflammatory Drug (NSAID) used for relieving pain and inflammation, it is commonly used for rheumatoid arthritis, osteoarthritis, osteitis deformans, bursitis, tendonitis and neuralgia. This drug acts by inhibiting both cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) [1,2]. It is well known that COX-2 is related to inflammation and disease, whereas, COX-1 is connected to the homeostasis of the body. If there is a decreased production of Prostaglandins (PGs), especially PGE² (prostaglandins E²), there is also a reduction in the gastric mucosal protection, leading to injuries in the gastrointestinal tract and can also lead to cardiovascular problems, renal toxicity, high blood pressure and fluid retention. The PGE² is derived from the COX-1, which is one of the most abundant PGs of the body, under physiological conditions, such as in the immune response, blood pressure, gastrointestinal mucosal integrity [3-5]. Prostaglandins are the end products of Arachidonic Acid (AA), released from phospholipases, that are present in the cell membrane. When this AA is released in response to stimuli, it is then converted via COX and lipoxygenase [3,6,7].

There is a great potential in the use of nanoparticles together with anti-inflammatory drugs. There are many types of nanoparticles used for drug delivery, it is necessary to study each case in order to decide better which nanoparticle would be more viable [8-10]. Since the oral route is the most widely used, and the easiest to be adhered to by patients, it is the best way to deal with the nanoparticle, by improving its effectiveness, reducing the used dose and consequently, reducing the side effects [11].

Studies have already shown that nanoparticles used in conjunction with anti-inflammatory drugs had a better anti-inflammatory effect from new vehicle for drug delivery [12]. Based on this, studies have shown that indomethacin-loaded nanocapsules, produced an increased anti-inflammatory efficacy in long-term models of inflammation, allied to an improved gastrointestinal safety [13]. Nanoparticles that are drug wraps, enable the bio-distribution of these drugs which are insoluble in water, resulting in an increased half-life and pharmacokinetics of the drug. The treatment has become more effective by using a smaller total dose, since the drug will be directed to the target area [14].

Eudragits, a well-known pharmaceutical excipients, have been widely used in the formation of different sustained and controlled release formations [15,16]. Among the Eudragits, Eudragit L 100 (methacrylic acid and methyl methacrylate (1:1)) is an enteric pH-dependent copolymer and is soluble above pH 6.0 medium, and by the side of other Eudragit L nanomaterial, it has been commonly used in the preparation of enteric solid dosage forms as good coating and skeleton material [17,18].

Bearing these issues in mind, and considering the fact that little is known about the side effects of indomethacin-loaded with Eudragit L-100 nanocapsules in the scientific literature, this study aims to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of nanoencapsulated indomethacin with EUDRAGIT® L100, in an *in vitro* protocol, using two types of human cells, one without the ability to metabolize (human lymphocytes), and the other with this capability (HepG2 cells), and through two recognized cytogenetic methods, comet assay and micronucleus test.

2. Materials and methods

2.1. Chemical compounds

Nanoencapsulated Indomethacin (NI) was diluted in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) to be used with HepG2 cells and RPMI-1640 medium (Gibco) to be used with human lymphocytes. Methyl Methane-sulfonate (MMS) (Aldrich, CAS number 66-27-3) and Benzo(a)pyrene (Sigma-Aldrich) were used as the positive control substance, due to its potential for DNA damage, recognizable in the comet and micronucleus assays. The other main chemicals were obtained from the following suppliers: trypsin (Sigma-Aldrich), phytohemagglutinin (Sigma-Aldrich), cytochalasin-B (Sigma-Aldrich), Normal Melting Point (NMP) agarose (Invitrogen), Low-melting Point (LMP) agarose (Invitrogen), fetal calf serum (Gibco), Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) (Merck), Triton X-100 (J.T.Baker), trypan blue (Sigma-Aldrich), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide ethidium bromide (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich), Giemsa (Synth), and Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich).

2.2. Nanoparticle preparation

Nanoencapsulated indomethacin used in the present study was prepared at 1:10 formulation (indomethacin/ Eudragit L-100; formulation - anionic copolymer based on

methacrylic acid and methyl methacrylate). The method used for nanoencapsulation was oil/water based, using polyethylene glycol and polysorbate 80 [19]. Nanoparticle drug was prepared by placing 20 mL of an alcoholic polymer solution together with the drug and a hydrophilic polymer (40 mg), in 120 mL of the acidic aqueous phase, containing the surfactant, under stirring. The nanoparticulate indomethacin was centrifuged and collected. The method and all the details can be seen in the work of Dupeyrón et al. [19].

2.3. Cell Types

In this study, human Peripheral Blood Lymphocytes (PBL) (non metabolizing cells) collected from 3 healthy (2 males and 1 female), non-smoking volunteers, aged from 18 to 27 years old, and a human Hepatoma cell line (HepG2), having phase 1 and phase 2 enzymes (metabolizing cells) [20] (Hewitt and Hewitt, 2004) were used in the experiments. Donors of peripheral blood, provided a written informed consent at the time of donation, for the use of their blood sample in this study. The Human Ethical Committee of the Universidade Estadual Paulista (UNESP), in Marília town, Brazil, approved the present study on August 6, 2014 (protocol 0952/2014).

HepG2 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC No HB 8065, Rockville, MD). The PBL was cultivated in RPMI (Roswell Park Memorial Institute), at a temperature of 37°C, 5% CO₂, and 95% relative humidity, and the HepG2 was cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco) and antibiotics (Gibco), at a temperature of 37°C, 5% CO₂, and 95% air, in a humidified incubator.

2.4. Cytotoxicity analysis

One of the cell viability tests used was trypan blue-staining, performed as described by Panda et al. [21]. This test assesses damage caused to the membrane. Cells with disrupted plasma membrane when stained with Trypan blue, present a blue color, whereas, cells with intact plasma membrane do not get stained with the dye. An aliquot of 2×10^5 cells were plated into 24-well culture plates in 2 ml RPMI culture medium per well at a temperature of 37°C, under 95% air and 5% CO₂ in a humidified incubator, and exposed to NI for 24 hours at concentrations of 5, 10, 50, 125, 250, 500 e 1250 µg/mL, respectively. Cellular viability testing for both cell types was carried out according to Strober [22]. A freshly prepared solution of 10 µl trypan blue (0.05%), in

distilled water was mixed with 10 μ l cellular suspensions for 20 minutes, spread onto a microscope slide, and covered with a coverslip. Culture medium itself was used as negative control and Triton X-100 diluted in medium without FBS, was used as positive control. Non-viable cells appeared blue-stained. At least 100 cells per group were counted. The tests were conducted in biological duplicate with three repetitions each.

The other cytotoxicity test used for HepG2 cells, was Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide test (MTT). This assay has been used to evaluate the survival, proliferation and activation of cells. The test is based on the capacity of viable cells to convert tetrazolium salt, an insoluble purple formazan salt in succinate dehydrogenase within the mitochondria. The formazan product is permeable to the cell membranes of viable cells, accumulating inside [23]. The MTT test was performed in 96-well plates, according to the protocol described by Mosmann [24], although, with some modifications. Each well had 1×10^5 cells seeded in it, with a total volume of 100 μ L of medium, supplemented with FBS, except for the wells related to the blank, which was composed of medium without FBS. The plates were incubated for 24 hours. After this period, the medium was removed and a new culture medium (without FBS) was added to the treatments, with a final volume of 200 μ L. Positive and negative controls were performed in order to validate the experiments, where the positive control was Triton X-100, diluted in the culture medium (without FBS), at a concentration of 1%, and the negative control was pure culture medium (without FBS) in separated wells. In the remaining wells, concentrations of 5, 10, 50, 125, 250, 500 e 1250 μ g/mL of NI were added, respectively. The plates were incubated for 24 hours at 37°C. After this period, the medium was removed and replaced with 150 μ L of MTT, diluted in PBS at a concentration of 1×10^{-6} mg/mL for 4 hours. Afterwards, the MTT solution was discarded and 200 μ L of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) were added to each well. The plates were read with a spectrophotometer microplate reader, using a filter of 540 nm (Epoch - Biotek). Statistical analyses were performed by the Graphpad Prism[®] 5 (version 5.02) software, with ANOVA (Analysis of Variance), followed by Tukey comparison test ($p < 0.05$).

2.5. Comet Assay

The comet assay was performed according to the study of Tice et al. [25]. Two cell types, human peripheral blood lymphocytes and HepG2 cells were used in this protocol. First, the preparation of slides was carried out, by adding a thin, uniform layer of Normal Melting Point agarose (NMP). In the 24-well plate, an amount of 2×10^5

cells were added and kept for 24 hours for cell attachment (in the case of HepG2), the treatment was made by using the concentrations of 5, 10, 50, 125, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$, and controls, respectively. The concentrations were selected due to the absence of toxicity in the trypan blue exclusion test. For the positive control, MMS (75 μM) was used, and for the negative control, the drug carrier was used in the same culture medium that is used in the respective cells. After 4 hours of treatment, cells are removed and kept with 120 μl of Low-melting-point agarose (LMP) on the microscope slide which has previously been prepared. In a vat with cold lysis ($\text{pH} > 13$), the cells were left for 1 hour for lysis to occur. The slides were transferred to an electrophoresis box, positioned at the anode end, and covered with an alkaline buffer ($\text{pH} < 13$) (300mM NaOH and 1 mM EDTA solution), where the slides remained for 20 minutes, for the denaturation of the DNA to take place. After this period, electrophoresis was performed in an ice bath (4°C) for 20 min at 25 V and 300 mA (0.722 V cm^{-1}). The slides were then submerged in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature, and fixed in 100% ethyl alcohol for 10 min. The slides were dried and stored overnight before staining. For staining, slides were rinsed in distilled water, covered with 30 μl of $1\times$ ethidium bromide staining solution, and then, covered with a coverslip. The material was evaluated immediately at $400\times$ magnification using a fluorescence microscope (Olympus) with a 515–560 nm excitation filter and a 590-nm barrier filter. All experiments were performed three times and in duplicates.

The extent and distribution of DNA damage indicated by the Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) assay was conducted by examining at least 100 randomly selected and non-overlapping cells (50 cells per coded slide) per culture well, in a blind analysis. These cells were scored visually, according to tail size, into the following 4 classes: class 0- no tail; class 1- tail shorter than the diameter of the head (nucleus); class 2- tail length 1 to 2 times greater than the diameter of the head; and class 3- tail length more than twice the diameter of the head. Comets with no heads having almost the entire DNA in the tail or with a wide tail, were excluded from the evaluation because these probably represented dead cells [26]. The total score for 100 comets, which ranged from 0 (no damage) to 300 (severe damage), was obtained from the sum of multiplying the number of cells in each class with the damage class.

2.6. Cytokinesis Block Micronucleus Assay (CBMN)

The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay was performed according to the protocol described by Fenech [27]. Two cell types, human peripheral blood lymphocytes and HepG2 cells were used in this protocol. Experiments were carried out

in human peripheral blood lymphocytes from two donors, made in duplicate, and in HepG2 cells, made in triplicate. The cultured cells were kept in a 25 cm² flask and different concentrations of the treatment and controls (5, 10, 50, 125, 250 and 500 µg/ml) were added. The doses were selected based on the absence of toxicity in the trypan blue exclusion test. Two different drugs were used as positive controls, MMS 75µM for the human peripheral blood lymphocytes and Benzo(a)pyrene 2 µM, for the HepG2 cells.

Whole blood samples (0.4 mL) were added to 5 mL of culture medium, supplemented with 10% fetal calf serum. Phytohaemagglutinin (PHA) was added to each culture flask at 10 µl/mL, and PBL were incubated at a temperature of 37°C, 95% air and 5% CO₂, in a humidified incubator for 72 hours. Forty-four hours after starting PBL culture, the human PBL were exposed to different concentrations (5, 10, 50, 125, 250 and 500 µg/mL, respectively) of NI. Four hours after the addition of test compound, cytochalasin-B (6 µg/mL) was added to each culture. The cells were harvested by centrifugation (5 min at 850g), and pellets were resuspended in a chilled hypotonic solution of 0.075 M KCl for 5 minutes. Subsequently, cells were washed once with 5 ml of cold methanol: acetic acid solution (3:s1) (v/v). The fixation procedure was applied three times. Formaldehyde (1%) was added to the last fixative, in order to preserve the cytoplasm. The cell suspension was placed on slides and stained with a solution of 5% Giemsa dye in phosphate buffer (pH 6.8) for 5 minutes.

In the micronucleus test, using HepG2 cells, the cells had been grown for one complete cell cycle (24 hours) and treated for a period of 24 hours with the test compound. Afterwards, the cells were washed, harvested and incubated again with cytochalasin B for 28 h. After this period, the same procedure described above for PBL was followed.

In accordance with the standard criteria [27], Micronuclei (MN) analysis was performed on coded slides by scoring 1,000 binucleated cells for each culture flask. For the analysis, an optical microscope (Zeiss, Primo Star) at 100x magnification was used. As a measure of cytotoxicity, the Nuclear Division Index (NDI) was calculated following the formula: $NDI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$, where M1-M4 indicates the number of cells with 1-4 nuclei as assessed in 500 cells (N) (for each culture).

2.7. Statistical analysis

After checking for normal distribution, the data obtained from the comet assay and micronucleus test were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey multiple comparison test using the Graph pad Prism[®] 5 (version 5.02) software. The results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

Cell viability was conducted using the trypan blue exclusion test, to determine the number of viable cells present in a cell suspension. Both cell types were tested with the same concentrations (5, 10, 50, 125, 250, 500 and 1250 $\mu\text{g/ml}$, respectively). For both cells, lymphocytes (Figure 1a) and HepG2 (Figure 1b), only the concentration of 1250 $\mu\text{g/ml}$ showed a viability $< 80\%$. The cytotoxic evaluation of the NI by the MTT assay in HepG2 cells, showed similar effects observed in the trypan blue staining test (Figure 2). Higher concentrations were not possible due to the non-dilution of the NI in the vehicle used. In performing genotoxicity and mutagenicity experiments, the concentrations that showed cell viability higher than 80% were the ones used.

The results obtained for genotoxic assessment of NI in human PBL (non metabolizing) and HepG2 (metabolizing) cells are shown in Figure 3. As expected, for both cell types, an increase in the total number of damaged cells was observed for the positive control, MMS, confirming the sensitivity of the comet assay in the detection of genotoxicity. Both NI-treated cells showed no significant changes in the total number of damaged cells and scores at six tested concentrations compared with the negative control. In humans, PBL comet assay scores ranged from 16.50 ± 8.50 to 38.17 ± 11.43 , while in HepG2 cells, the scores ranged from 7.66 ± 2.30 to 44 ± 23.07 , indicating the absence of genotoxic effects of NI.

The MN data obtained for clastogenic/aneugenic assessment of NI in both cell types, are shown in Tables 1 and 2. The results were similar to those observed while using the comet assay. CBMN assay demonstrated no marked alterations in the number of micronucleated cells for both cell lines. However, it was observed that the concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$, resulted in a statistically significant increase in the micronucleated HepG2 cells, indicating clastogenic/aneugenic effects in this concentration. The effects of NI on nuclear division did not show any significant change in cell division as measured by the Nuclear Division Index (NDI).

4. Discussion

In vitro studies are widely utilized for screening and ranking of chemicals, providing important tools to enhance our understanding of its hazardous effects caused by the use of chemicals and for predicting these effects on humans [28].

Indomethacin is mainly known for its anti-inflammatory effects, being widely used in the treatment of fever and inflammation in patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis, osteitisdeformans, bursitis, tendonitis and headache [29,30]. One concern about using this type of medication is the side effects, such as indomethacin, which is known to cause gastritis and gastric ulcers, especially in old people, and that already have a history with ulcerative diseases [3,31]. Therefore, new alternatives to drug delivery, that reduces its side effects need to be developed.

In this study, considering the great potential for the use of nanoparticles with drugs inside, while seeking a reduction of some drugs' side effects, the cytotoxicity and genotoxicity of Nanoencapsulated Indomethacin (NI), was assessed using two different cell lines: lymphocytes from human peripheral blood (non-metabolizing cell), and human hepatoma HepG2 cells (metabolizing cell). The loss of membrane integrity, which occurs late in apoptosis and early in necrosis, can be detected by cellular uptake of trypan blue. This method allows to distinguish between cells with intact and disrupted membranes. Intact cells exclude trypan blue dye and the cells in the late stages of apoptosis and necrotic cells take up the dye and appear as blue cells [32]. In this study, we used the trypan blue test to analyze seven concentrations of NI. The results showed that only the high tested concentration of 1250 µg/ml was cytotoxic for both cells, with cell viability less than 80%. The very similar enteric nanoparticle analyzed in the present study was prepared with omeprazole. *In vitro* cytotoxic activity of nanocoated omeprazole at concentrations ranging from 50 to 800 µg/ml, and determined by the MTT assay, using Caco-2 cell, showed that cell viability decreased with the increase of nanoparticles concentration [17].

The DNA damage potential of NI was the other endpoint investigated in the present study. Comet assay is one of the most important and well applied *in vitro* methods in genotoxicology and DNA damage studies [24]. Moreover, this assay is one of the most commonly used tests in the case of testing the genotoxicity of nanoparticles [33]. This assay allows for the fundamental evaluation of double and single-strand of DNA breaks, that visually looks like a "comet", with a distinct head consisting of intact DNA, and a tail, including damaged or broken pieces of DNA [34]. Our comet assay

results showed that any of the NI tested concentrations resulted in significant DNA damage in both cell lines analyzed.

The third endpoint investigated in this work was the capacity of NI to cause chromosome damage. The CBMN assay is a cytogenetic test, which detects possible chromosomal aberrations in cells, previously exposed to the test agents. It is based on the evaluation of an increase in the frequency of binucleate cells with micronuclei [26]. In our study, CBMN assay showed that there were no statistically significant differences in the number of micronucleated lymphocytes between the control and the groups treated with the five NI concentrations. Kalf and colleagues [35], showed that in rat bone marrow, indomethacin can prevent myelotoxic effects caused by benzene, decreasing significantly the number of micronuclei caused by this, but when administered alone, it shows no significant increase in the amount of micronuclei, corroborating with our results in human lymphocytes. On the other hand, our results of CBMN assay in HepG2 cells showed that the higher concentration of the tested NI (500 µg/ml), caused a small increase in the micronucleated cells, indicating a clastogenic/aneugenic effect of NI in this concentration.

Previous *in vivo* genotoxicity analysis of indomethacin, showed that it was toxic to the genetic material at the dose equivalent, to 75% of the DL50 (36 mg/kg body weight). However, at lower doses as 12 and 24 mg/kg, significant genotoxicity was not observed in treated mice [36]. Other studies showed still that indomethacin in low doses can protect cells of mice against the genotoxicity of the benzene [37].

A study by Bernardi et al. [13], investigating the effects of systemic treatment with indomethacin-loaded with poly-(D,L-lactide) polymer and compared with those of free indomethacin, it was observed that indomethacin nanoencapsulated produced an increased anti-inflammatory efficacy in long-term models of inflammation in rats, as well as an improved gastrointestinal safety. This formulation might represent a promising alternative for the treatment of chronic inflammatory diseases, with reduced undesirable effects, and for this reason, must have its biosafety analyzed.

Our literature review showed that there are no previous studies involving the evaluation of the genotoxic potential of Eudragit L-100 nanoparticles. However, Shah et al. [38], while evaluating cyto- and genotoxicity of different nanocarriers with different compositions, also analyzed the nanoparticle polyethylene glycol polymers. This nanoparticle is present in Eudragit L-100. The authors employed Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) cells in their *in vitro* experiments, also using the micronucleus test, and found that neutral nanocarriers (considering electric charge), as is the case of polyethylene glycol, did not induce the formation of micronuclei in CHO-K1 cells.

Nevertheless, these authors analyzed a very low concentration of nanoparticle in comparison with our present study.

Hao et al. [17] analyzed the *in vitro* cytotoxic activity of the omeprazole (OME) nanoencapsulated with Eudragit L-100-55 (methacrylic acid - ethyl acrylate copolymer type A, 1:1), an enteric nanomaterial very similar to Eudragit L-100 analyzed in the present study, and reported that the nanoparticles had been internalized by Caco-2 cells after 4 hours time incubation. The authors also observed that the cell viability of Caco-2 cells decreased linearly, with a decreasing concentration of Eudragit L-100-55, indicating that the toxicity of enteric nanoparticle came from OME. The authors concluded that the blank nanoparticles showed an insignificant cytotoxicity, which indicated that the nanomaterial studied was a safe drug delivery system. Considering the similarity between the nanomaterial of Eudragit L-100-55, analyzed in the above study and Eudragit L-100 studied in the present work, we can hypothesize that the genotoxicity observed in the major concentration of the nanocoated-indomethacin, must have been caused by increasing the concentration of indomethacin in cells, as observed in the genotoxicity studies of indomethacin alone *in vivo* [36].

In conclusion, under the experimental conditions used in the present study, we observed by the comet and micronucleus assays, that indomethacin-loaded with Eudragit L-100 nanocapsules, in an *in vitro* experiments, are not genotoxic in leukocytes and HepG2 cells. Considering the stomach potential protection of the Eudragits nanoparticles, the results obtained in this study encourages the development of new studies in the use of this nanomaterial as a drug delivery for anti-inflammatories, like indomethacin and other drugs with gastrointestinal injuries.

Acknowledgments

Research is supported by the FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grants 2014/26882-2), Brazil, and Research Fund from UNESP, Marília, Brazil. We would like to thank Larissa Z. Souza for her technical assistance. J.G. Froder, thanks to CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil, for the Master's degree scholarship.

References

- [1] P.L. Beck, R. Xavier, N. Lu, N.N. Nanthakumar, M. Dinauer, D. Podolsky, B. Seed, Mechanisms of NSAID-Induced gastrointestinal injury defined using mutant mice, *Gastroenterology* 119 (3) (2000) 699-705.

- [2] T. Yoshikawa, Y. Naito, A. Kishi, T. Tommi, T. Kaneko, S. Inuma, H. Ichikawa, M. Yasuda, S. Takahashi, M. Kondo, Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury by indomethacin in rats, *Gut* 34 (6) (1993) 732-737.
- [3] S. Bacchi, P. Palumbo, A. Sponta, Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs: A Review, *Anti-inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly current Medicinal Chemistry – Anti-Inflammatory and anti-Allergy agents)* 11 (1) (2012) 52-64.
- [4] R. Jones, Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future, *Am. J. Med.* 110 (1A) (2001) 4S-7S.
- [5] E. Ricciotti, G.A. FitzGerald, Prostaglandin and inflammation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (5) (2011) 986-1000.
- [6] W. L. Smith, D.L. Dewitt, R.M. Garavito, Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology, *Ann. Rev. Biochem.* 69 (2000) 145-182.
- [7] J.R. Vane, Y.S. Bakhle, R.M. Botting, Cyclooxygenases 1 and 2, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38 (1998) 97-120.
- [8] R.S. Kadam, D.W. Bourne, U.B. Kompella, Nano-advantage in enhanced drug delivery with biodegradable nanoparticles: contribution of reduced clearance, *Drug. Metab. Dispos.* 40 (7) (2012) 1380-1388.
- [9] E. Lim, E. Jang, K. Lee, S. Haam, Y. Huh, Delivery of cancer therapeutics using nanotechnology, *Pharmaceutics* 5 (2) (2013) 294-317.
- [10] A. Sharma, S.V. Madhunapantula, G.P. Robertson, Toxicological considerations when creating nanoparticle-based drugs and drug delivery systems, *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 8 (1) (2012) 47-69.
- [11] Y. Yun, Y.W. Cho, K. Park, Nanoparticles for oral delivery: Target nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (6) (2013) 822-832.
- [12] S.R. Prasad, K. Elango, S.D. Chellakumari, S. Dharani, Preparation, characterization and anti-inflammatory activity of Chitosan Stabilized silver nanoparticles, *Research J. of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology* 5 (2013) 161-167.
- [13] A. Bernardi, A.C.C.V. Zilberstein, E. Jager, M.M. Campos, F.B. Morrone, J.B. Calixto, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, A.M.O. Battastini, Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats, *Brit. J. Pharmacol.* 158 (4) (2009) 1104-1111.
- [14] V. Uskokovic, Entering the era of nanoscience: time to be so small, *J. Biomed. Nanotechnol.* 9 (9) (2013) 1441-1470.
- [15] H.K. Ibrahim, I.S. El-Leithy, A.A. Makky, Mucoadhesive nanoparticles as carrier systems for prolonged delivery of gatifloxacin/prednisolone biotherapy, *Mol. Pharm.* 7 (2) (2010) 576-585.
- [16] S. Jose, M.T. Prema, A.J. Chacko, A. Cinu-Thomas, E.B. Souto, Colon specific chitosan microspheres for chronotherapy of chronic stable angina, *Colloid Surface Biointerfaces* 83 (2) (2011) 277-283.
- [17] S. Hao, B. Wang, Y. Wang, L. Zhu, B. Wang, T. Guo, Preparation of Eudragit L 100-55 enteric nanoparticles by a novel emulsion diffusion method, *Colloid Surface Biointerfaces* 108 (2013) 127-133.
- [18] W. Lee, S. Cha, M. Shin, M. Jung, M.A. Islam, C. Cho, H. Yoo, Efficacy of thiolated eudragit microspheres as an oral vaccine delivery system to induce mucosal immunity against enterotoxigenic *Escherichia coli* in mice, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81 (1) (2012) 43-48.
- [19] D. Dupeyrón, M. Kawakami, A.M. Ferreira, P.R. Cáceres-Vélez, J. Rieumont, R.B. Azevedo, J.C. Carvalho, Design of indomethacin-loaded nanoparticles: effect of polymer matrix and surfactant, *Int. J. Nanomedicine* 8 (2013) 3467-3477.
- [20] N.J. Hewitt, P. Hewitt, Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines, *Xenobiotica* 34 (3) (2004) 243-256.

- [21] A. Panda, S.N. Krishna, T. Dada, Outcome of phacoemulsification in eyes with cataract and cornea opacity partially obscuring the pupillary area, *Nepal J. Ophthalmol.* 4 (2) (2012) 217-223.
- [22] W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability, in: J.E. Coligan, A.M. Kruisbeck, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, *Current Protocols in Immunology*, ed. Wiley, New York, 1997.
- [23] G. Fotakis, J.A. Timbrell, In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.* 160 (2) (2006) 171-177.
- [24] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1-2) (1983) 55-63.
- [25] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (3) (2000) 206-221.
- [26] A. Hartmann, G. Speit, The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet Assay), *Toxicol. Lett.* 90 (2-3) (1997) 183-188.
- [27] M. Fenech, The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455 (1-2) (2000) 81-95.
- [28] C.L. Broadhead, R.D. Combes, The current status for food additives toxicity testing and the potential for application of the three Rs, *ATLA* 29 (4) (2001) 471-485.
- [29] N. Baber, R. Sibeon, E. Laws, L. Halliday, M. Orme, T. Littler, Indomethacin in rheumatic arthritis: Comparison of oral and rectal dosing. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 10 (4) (1980) 387-392.
- [30] O. Summ, A.P. Andreou, S. Akerman, A potential nitrenergic mechanism of action for indomethacin, but not other COX inhibitors: relevance to indomethacin-sensitive headaches, *J. Headaches Pain* 11 (6) (2010) 477-483.
- [31] S. Hernandez-Diaz, A.G. Rodrigues, Association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper gastrointestinal tract bleeding/perforation, *Arch. Intern. Med.* 160 (14) (2000) 2093-2099.
- [32] J.A. Cook, I.B. Mitchell, Viability measurements in mammalian cell system, *Annal Biochem.* 179 (1) (1989) 1-7.
- [33] S. Vandghanooni, M. Eskandani, Comet Assay: A method to Evaluate Genotoxicity of Nano-Drug Delivery System, *BioImpacts* 1 (2) (2011) 87-97.
- [34] A.R. Collins, A.A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovanelli, M. Kruszewski, C.C. Smith, R. Stetina, The comet assay: topical issues, *Mutagenesis* 23 (3) (2008), 143-151.
- [35] G.F. Kalf, M.J. Schollosser, J.F. Renz, S.J. Pirozzi, Prevention of Benzene-Induced myelotoxicity by nonsteroidal anti-inflammatory Drugs, *Environ. Health Persp.* 82 (1989) 57-64.
- [36] P.S. Devi, H. Polasa, Evaluation of the anti-inflammatory drug indomethacin, for its genotoxicity in mice, *Mutat. Res.* 188 (4) (1987) 343-347.
- [37] S.J. Pirozzi, J.F. Renz, G.F. Kalf, 1989. The prevention of benzene-induced genotoxicity in mice by indomethacin, *Mutat. Res.* 222 (3) (1989) 291-298.
- [38] V. Shah, O. Taratula, O.B. Garbuzenko, M.L. Patil, R. Savla, M. Zhang, T. Minko, Genotoxicity of different nanocarriers: possible modifications for the delivery of nucleic acids, *Curr. Drug Discov. Technol.* 10 (1) (2013) 8-15.

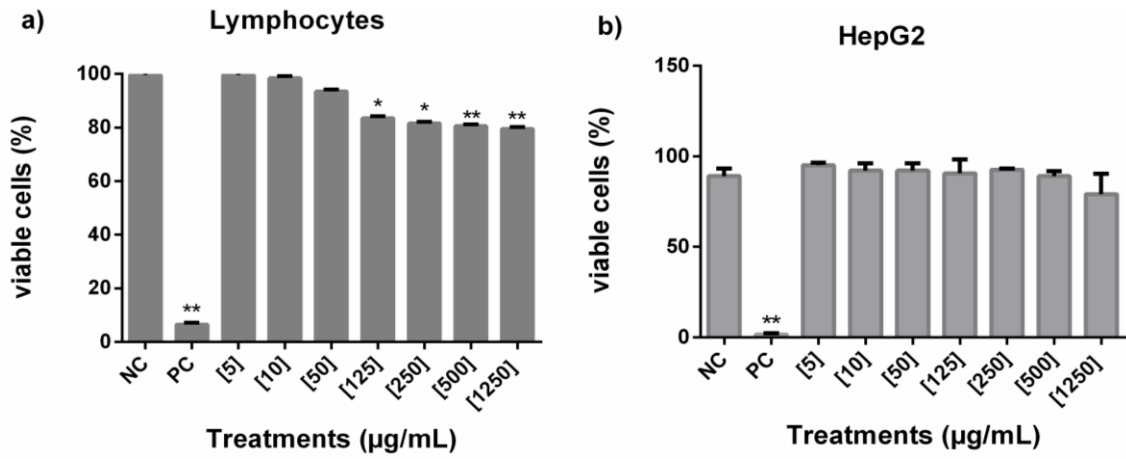


Figure 1: Effect of the Indomethacin-loaded with Eudragit nanocapsules in cell viability of (a) human lymphocytes and (b) HepG2 cells based on trypan blue test. NC = negative control; PC = positive control. * Statistical difference in comparison to the negative control ($p < 0.01$). ** Statistical difference in comparison to the negative control ($p < 0.001$).

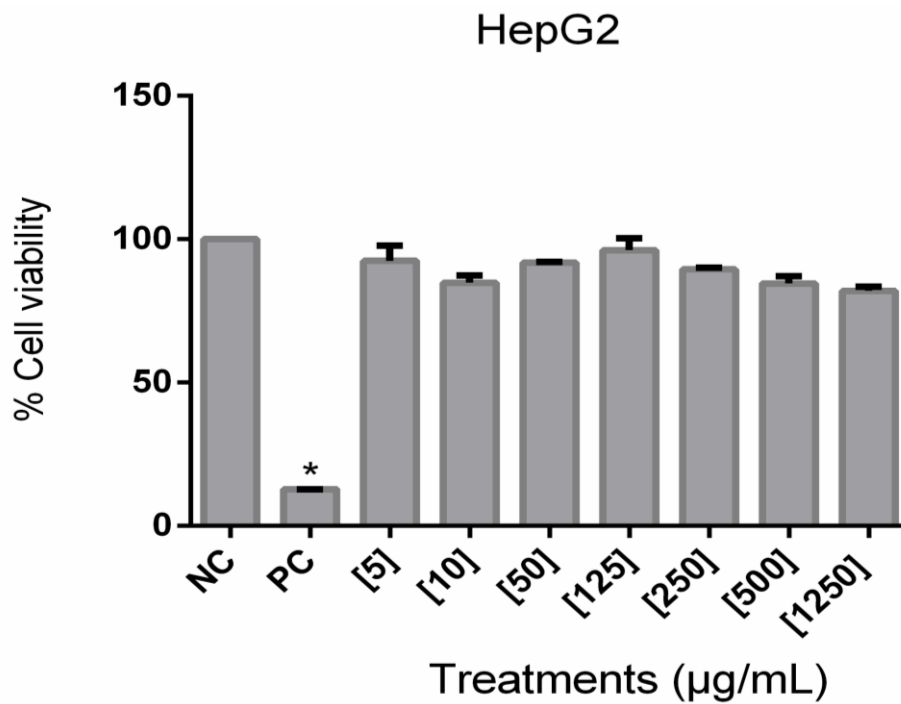


Figure 2: Cytotoxicity based on the colorimetric MTT assay in HepG2 cells exposed to different concentrations of indomethacin-loaded with Eudragit nanocapsules. NC = negative control; PC = positive control. * Statistical difference when compared to negative control ($p < 0.001$).

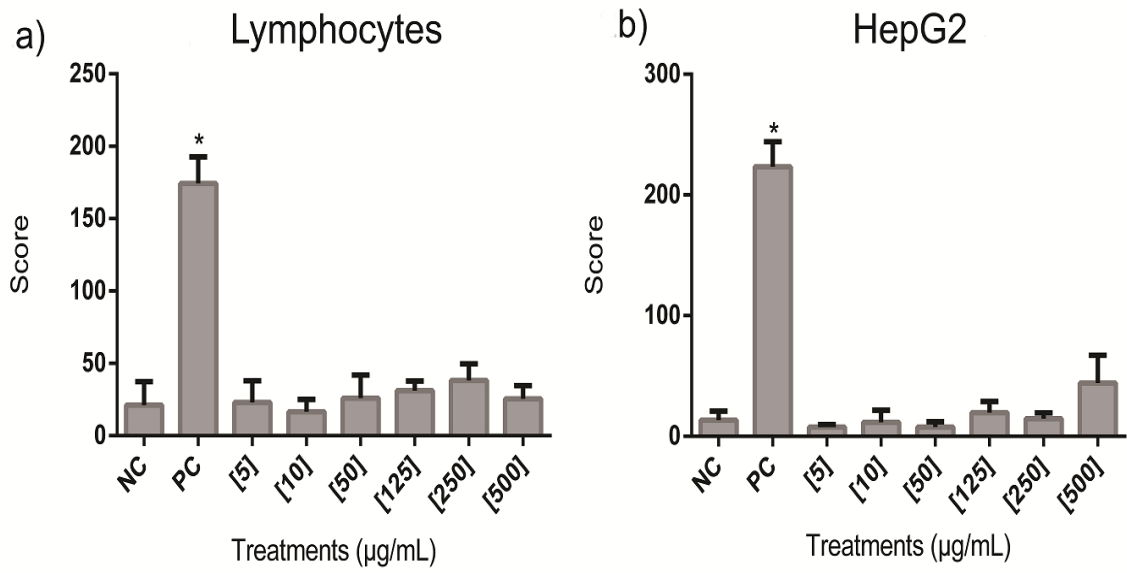


Figure 3: Effect of Indomethacin-loaded with Eudragit nanocapsules in human lymphocytes (a) and HepG2 cells (b) by comet assay. NC = negative control; PC = positive control. * Statistical difference when compared to negative control ($p < 0.001$).

Table 1: The micronucleus frequency and nuclear division index in human lymphocytes treated with Indomethacin-loaded with Eudragit nanocapsules (NI).

Test substance	Treatment		Binucleated cells with MN (2,000 cells scored)		NDI/1000cell (Mean \pm SD)
	Períod (h)	Concentration (μ g/mL)	N°	%	
Negative control	24	0	2	0.10	2.023 \pm 0.007
MMS (Positive control)	24	150 ^a	35*	1.75	2.535 \pm 0.114
NI	24	5	0	0.00	2,567 \pm 0,00
NI	24	10	3	0.15	2.293 \pm 0.834
NI	24	50	2	0.10	2.469 \pm 0.120
NI	24	125	3	0.15	2.279 \pm 0.162
NI	24	250	4	0.20	2.352 \pm 0.076
NI	24	500	4	0.20	2.156 \pm 0.234

MN = micronucleus, NDI = nuclear division index, SD = standard deviation,

^a = concentration in μ M,

* Significantly different from the negative control ($p < 0.001$).

Table 2: The micronucleus frequency and nuclear division index in HepG2 cells treated with Indomethacin-loaded with Eudragit nanocapsules (NI).

Test substance	Treatment		Binucleated cells with MN (3.000 cells scored)		NDI/1.500cell (Mean \pm SD)
	Períod (h)	Concentration (μ g/mL)	N°	%	
Negative control	24	0	4	0.13	1.673 \pm 0.063
Benzo[a]Pirene (Positive control)	24	2 ^a	65**	2.16	1.657 \pm 0.183
NI	24	5	4	0.13	1.543 \pm 0.140
NI	24	10	3	0.10	1.622 \pm 0.169
NI	24	50	4	0.13	1.688 \pm 0.110
NI	24	125	9	0.30	1.627 \pm 0.231
NI	24	250	10	0.33	1.753 \pm 0.268
NI	24	500	18*	0.60	1.761 \pm 0.167

MN = micronucleus, NDI = nuclear division index, SD = standard deviation,

^a = concentration in μ M,

* Significantly different from the negative control ($p < 0.05$).

** Significantly different from the negative control ($p < 0.001$).

5. Anexos

5.1 Prancha da classificação do Ensaio Cometa, elaborado pelo Autor.

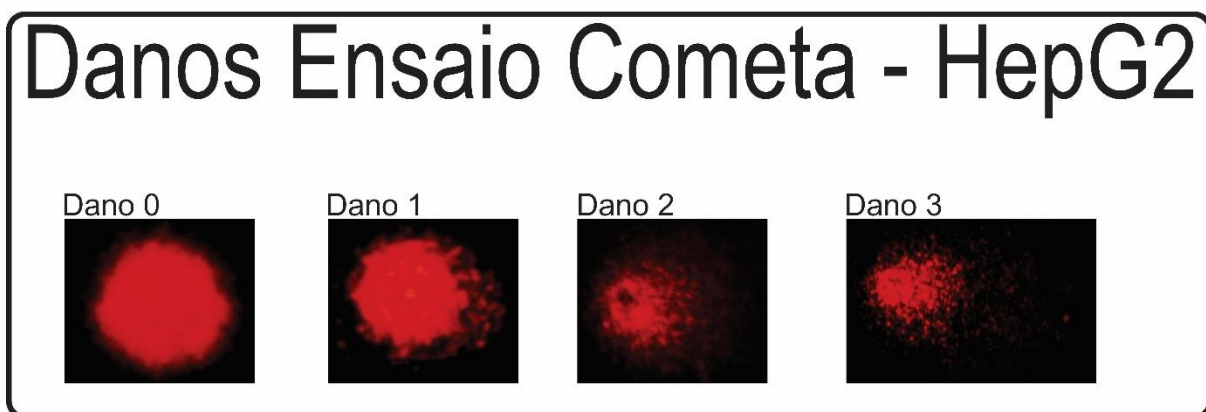
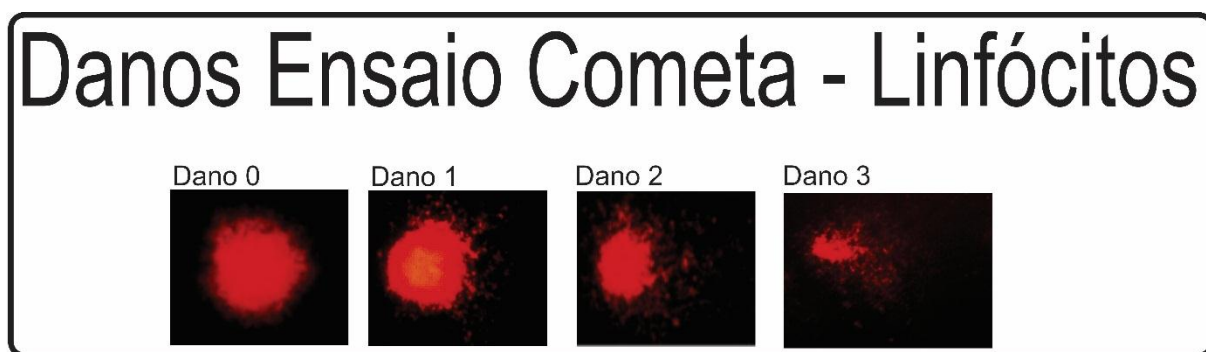


Figura 1: Classes observadas de cometas em Linfócitos humanos e HepG2. Classe 0, classe 1, classe 2 e classe 3. Na classe 0 os nucleóides não apresentam cauda; classe 1, nucleóides apresentam cauda menor que o diâmetro da “cabeça”; classe 2, os nucleóides com cauda do tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro da “cabeça”; e na classe 3 os nucleóides apresentam uma cauda de tamanho entre 2 a 3 vezes o diâmetro da “cabeça” do cometa (KOBAYASHI et al., 1995).

5.2 Prancha de Classificação do Teste do Micronúcleo em linfócitos humanos, elaborado pelo autor.

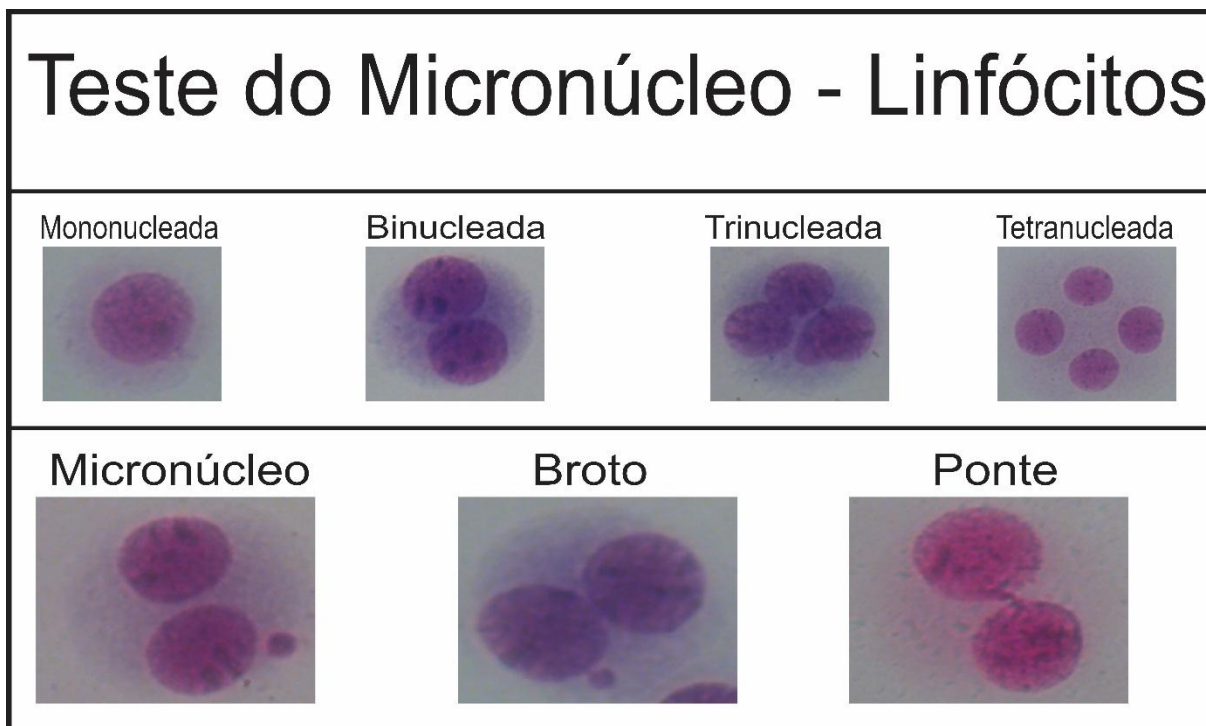


Figura 2. Teste do Micronúcleo em linfócitos humanos, com todos os parâmetros que são avaliados. (Elaborado pelo autor).

5.3 Prancha de Classificação do Teste do Micronúcleo em Células de Hepatoma Humano (HepG2), elaborado pelo autor.

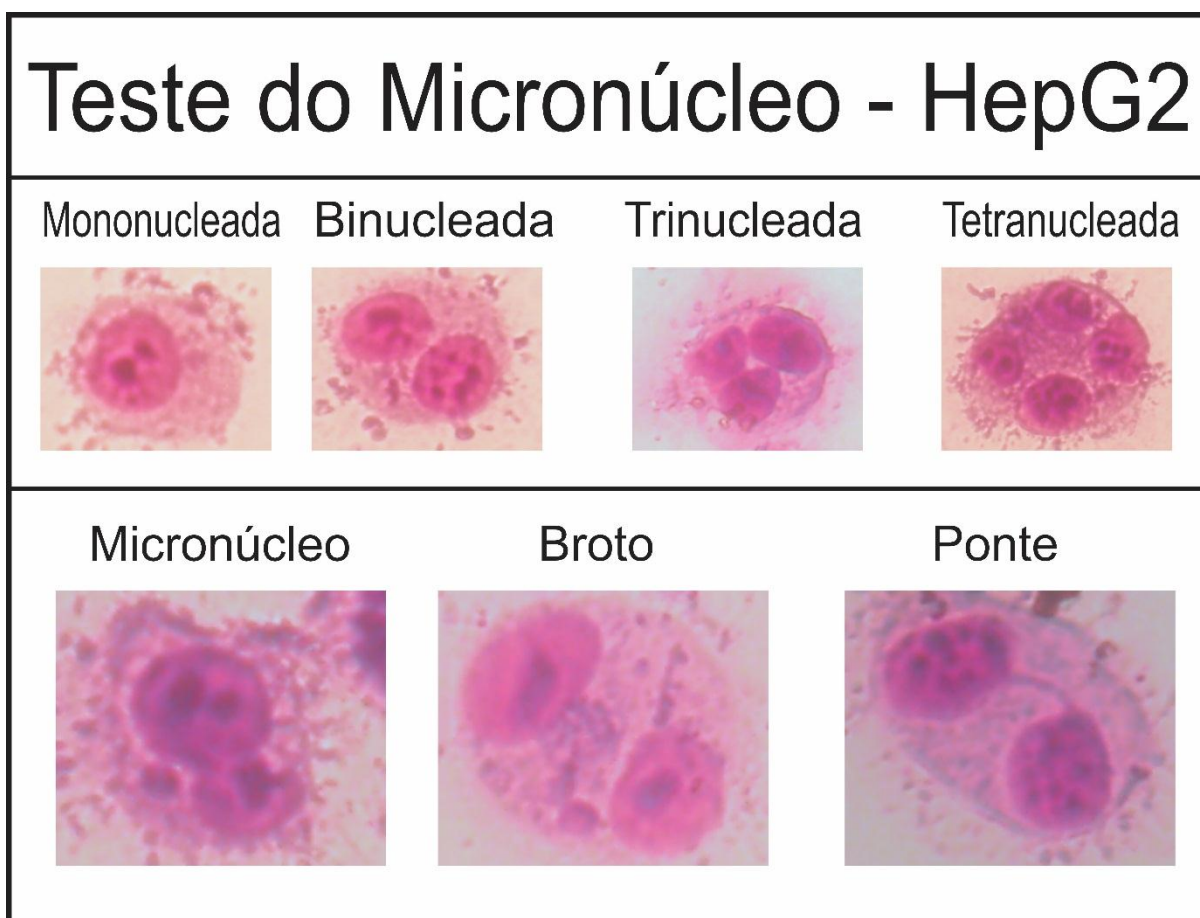


Figura 3. Teste do Micronúcleo em HepG2, com todos os parâmetros que são avaliados. (Elaborado pelo autor).

5.4 Microscopia eletrônica da Indometacina Nanoencapsulada usada no trabalho.

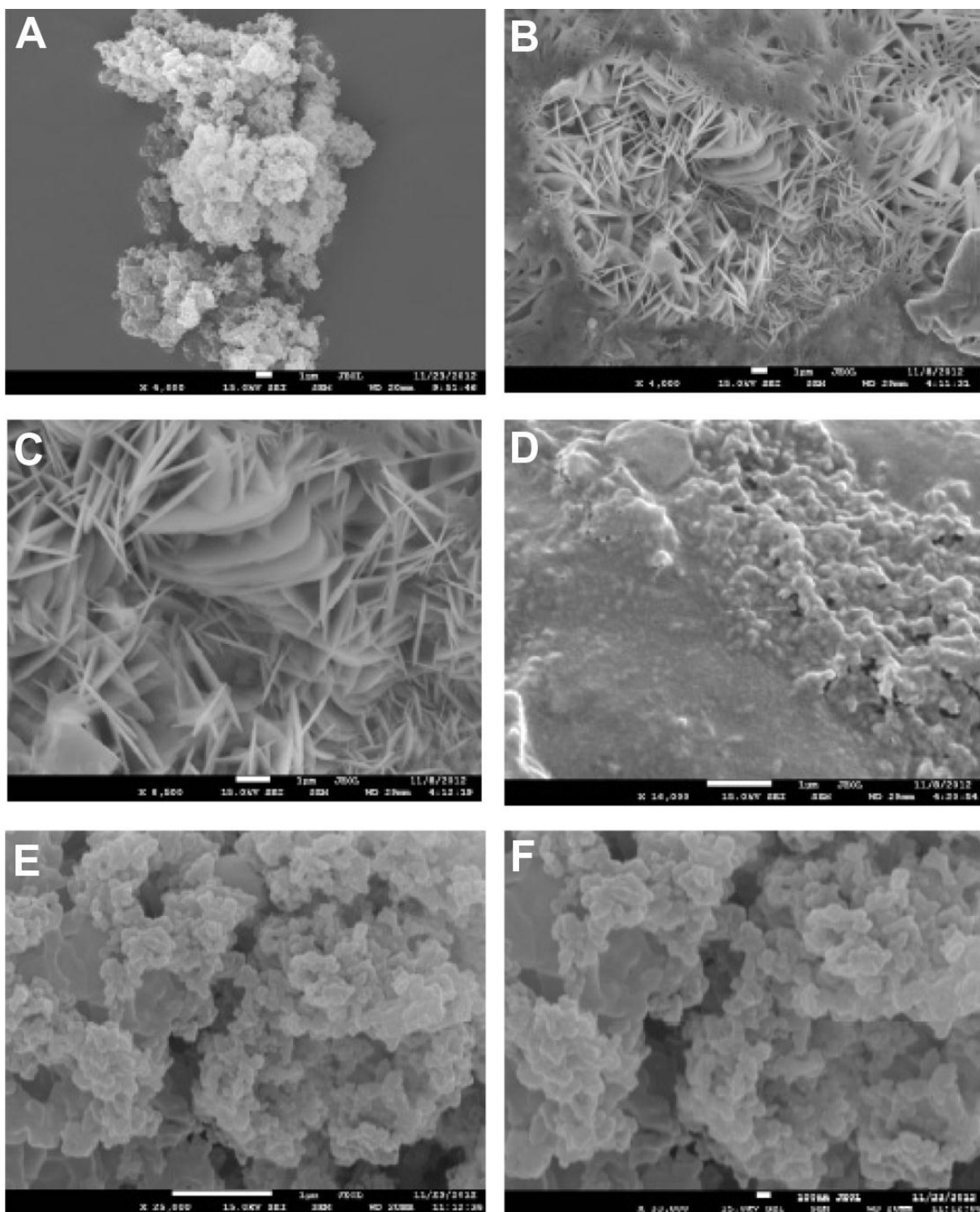


Figura 4: Microscopia eletrônica da Indometacina Nanoencapsulada. (A) $\times 4,000$; (B) $\times 4,000$; (C) $\times 8,500$; (D) $\times 16,000$; (E) $\times 25,000$; and (F) $\times 33,000$ (Dupeyrón et al. 2013).

5.5 Anexo 1 – Carta de submissão do artigo “*In vitro* study of the cytotoxic and genotoxic potential of indomethacin-loaded with Eudragit® L-100 nanocapsules”

Dear Prof. Maistro,

You have been designated by Juliano Froder as the Corresponding Author for the manuscript 'In vitro study of the cytotoxic and genotoxic potential of indomethacin-loaded with Eudragit® L-100 nanocapsules', currently under consideration for publication in Biomedicine & Pharmacotherapy . As Corresponding Author, you will receive all notifications related to this manuscript.

To track the status of this manuscript, please log into Evise® at http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=BIOPHA and locate the manuscript BIOPHA_2015_490 under 'My Submissions'.

Thank you for your contribution to this journal.

Kind regards,
Biomedicine & Pharmacotherapy

This message was sent automatically. Please do not reply

Parecer do Projeto nº. 0952/2014

IDENTIFICAÇÃO
1. Título do Projeto: Estudo da genotoxicidade e citotoxicidade da indometacina nanoencapsulada in vitro
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:
Autor(a): Edson Luis Maistro
Autor(a): Juliano Froder
3. Instituição do Pesquisador: Faculdade de Filosofia e Ciências – UNESP/Marília
4. Apresentação ao CEP: 28/02/2014
5. Apresentar relatório em: Semestralmente durante a realização da pesquisa.

Objetivos
Avaliar o potencial genotóxico e citotóxico do fármaco Indometacina nanoencapsulado in vitro em linfócitos humanos e células HepG2, por intermédio do ensaio cometa e do teste do micronúcleo.

SUMÁRIO DO PROJETO
<p>A nanociência é uma subárea totalmente nova e muito promissora no campo da ciência da matéria, tendo a nanotecnologia como o estudo da manipulação da matéria em uma escala atômica e molecular, essa tecnologia pode chegar a produzir estruturas com medidas entre 1 a 100 nanômetros. A nanotecnologia está cada vez mais difundida no âmbito médico, principalmente para uma distribuição mais precisa de fármacos dentro do organismo de seres humanos. Tendo isso em vista, novos medicamentos são produzidos usando essa tecnologia, como no caso da Indometacina nanoencapsulada. A indometacina é um poderoso anti-inflamatório não esteróide, que tem como principal mecanismo de ação uma inibição, tanto da Ciclooxygenase-1 e Ciclooxygenase-2, sendo ele um medicamento amplamente utilizado para combater a febre e a dor, servindo assim para o tratamento de artrite e osteoartrite, por exemplo. Essa droga, como tantos outros inibidores da Ciclooxygenase são comumente associadas a lesões da mucosa gástrica, sendo de muito interesse o estudo de novos veículos e formas de sua administração. Considerando que não há dados na literatura sobre a análise da biosegurança da utilização da indometacina nanoencapsulada sobre o material genético de células de mamíferos, o presente estudo tem o objetivo de avaliar o potencial citotóxico e genotóxico da indometacina nanoencapsulada em células humanas in vitro, por intermédio do ensaio cometa e do teste do micronúcleo.</p>

COMENTÁRIO DO RELATOR

O projeto está de acordo com as exigências éticas e científicas fundamentais resguardadas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, atendendo aos itens referentes às implicações da ética em pesquisas que envolvem seres humanos, recomendo a aprovação do mesmo pelo CEP.


PARECER FINAL

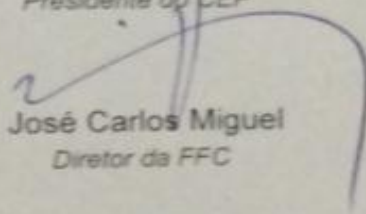
O CEP da FFC da UNESP após acatar o parecer do membro relator previamente aprovado para o presente estudo e atendendo a todos os dispositivos das resoluções 466/2012 e complementares, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido como também todos os anexos incluídos na pesquisa resolve aprovar o projeto de pesquisa supracitado.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

DATA DA REUNIÃO

Homologado na reunião do CEP da FFC da Unesp em 06/08/2014.


Simone Aparecida Capellini
Presidente do CEP


José Carlos Miguel
Diretor da FFC