



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LAÍS DE MACÊDO FERREIRA SANTOS

**ENCAPSULAÇÃO DE FGF-2 EM LIPOSSOMAS PARA REGENERAÇÃO
CARDIOVASCULAR EXPERIMENTAL**

Recife
2018

LAÍS DE MACÊDO FERREIRA SANTOS

**ENCAPSULAÇÃO DE FGF-2 EM LIPOSSOMAS PARA REGENERAÇÃO
CARDIOVASCULAR EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nereide Stela Santos Magalhães.

Coorientador: Prof^º. Dr. Fábio Rocha Formiga.

Recife

2018

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos, Laís de Macêdo Ferreira
Encapsulação de FGF – 2 para regeneração cardiovascular experimental / Laís de Macêdo Ferreira Santos. - 2018.

146 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães.

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Coração – Doenças – Tratamento. 2. Miocárdio – Doenças. 3. Infarto do miocárdio. I. Magalhães, Nereide Stela Santos (orientadora). II. Formiga, Fábio Rocha (coorientador). III. Título.

616.12

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-176

LAÍS DE MACÊDO FERREIRA SANTOS

**ENCAPSULAÇÃO DE FGF-2 EM LIPOSSOMAS PARA REGENERAÇÃO
CARDIOVASCULAR EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 31/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correa (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Rafaela de Siqueira Ferraz Carvalho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Bruno de Melo Carvalho (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Aos meus pais, minha irmã e sobrinha, e peço desculpas pela ausência ao longo desses mais 4 anos de formação acadêmica. Bem como, a todos aqueles que contribuíram para a realização desse sonho,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus todas as oportunidades de crescimento profissional e pessoal ao longo desses quatro anos de doutorado. A ele a minha gratidão por me sustentar em todos os momentos de tribulações, mantendo sempre acesa dentro de mim a razão de tudo.

A minha orientadora, professora Dra. Nereide Magalhães, por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa há 6 anos. Obrigada pelos ensinamentos, correções contundentes, pela competência científica e acompanhamento do trabalho.

Ao meu coorientador, professor Dr. Fábio Formiga, pela oportunidade de trabalhar com uma nova linha de pesquisa e na Fiocruz. Obrigada pelos ensinamentos, paciência, compromisso com o projeto e disponibilidade em todos os momentos.

Ao professor, Fabrício Andrade, aqui representando todos os professores que tive ao longo de todos esses anos de estudo. Graças ao seu altruísmo e generosidade foi dado o pontapé inicial dessa conquista. Quando eu crescer quero ser igual ao senhor e a Nayale, vocês me inspiram.

Ao grupo SLC, pelo suporte, ensinamentos e experiências trocadas ao longo desses 6 anos de pós-graduação. Em especial, aqueles que me ajudaram mais diretamente, como Clara, Bruna e Rafaela. Rafa, muito obrigada pelo compromisso com o meu projeto e comigo, por todas as correções e orientações, e total disponibilidade. Te desejo muito sucesso profissional e que Deus abençoe sua família, que acaba de ficar um pouco maior.

Ao grupo GT nano, Helenita, Carla, Vini, Pedro e Gabriel, por me receberem tão bem e por todo o suporte nas duas temporadas que eu fui a Salvador. Em especial, a Helenita e a Carla, pela amizade e apoio além das questões científicas.

Ao pessoal do LETI, representados aqui por Cássio e Dr. Diogo, pela disponibilização incondicional de equipamentos, reagentes, bem como, para discussão de protocolos e resultados.

Ao CBTC, na pessoa de Dra. Milena e Dr. Bruno Solano, por possibilitarem a realização dos meus experimentos *in vivo*. Bem como, a Dra. Simone, pelo carinho e disponibilidade de sua equipe para me auxiliar nos experimentos.

Aos meus pais, Renato (*in memorian*) e Suely, por me proporcionarem sempre o que estive ao alcance de ambos na minha educação e principalmente, por me apoiarem incondicionalmente nesse processo. Ao meu Deus, eterna gratidão por ter permitido a presença do meu pai em minha defesa de doutorado, hoje ele descansa em paz junto a Deus.

A minha irmã, Thaís, pode não passar pela sua cabeça, mas a sua dedicação na Faculdade e compromisso com a profissão que escolheu me inspiraram ao longo dessa jornada.

A minha sobrinha, Rafinha, muito obrigada pelos abraços, beijos, corações, os eu te amo “madinha”, não vai embora, fica todos os dias... Esse amor que é mais do que recíproco me ajudou muito.

A minha avó, Dona Carminha, aqui representando toda a minha família. Obrigada pelos abraços e sorrisos calorosos todas as vezes que pude revê-la.

As minhas “roommates” em Salvador, Marcela e Ivaneia, por aguentarem todos os meus relatos e dificuldades com a pesquisa, mas principalmente por terem tornado tudo mais leve com a companhia e amizade.

A Breno, eu sou muito abençoada por ter em cada momento da pós-graduação literalmente um anjo da guarda. Foi Victor no mestrado, foi Breno no doutorado. Tenho pelos dois o mesmo nível de gratidão, carinho, admiração e respeito. Breno, muito obrigada por tudo, ganhei mais um amigo.

Aos professores da banca examinadora por terem aceitado estar presente na defesa e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Ao LIKA e a FIOCRUZ-BA, pela disponibilização de suas infraestruturas.

Aos órgãos de fomento, CNPQ, FACEPE e FAPESB pelo apoio financeiro.

RESUMO

O infarto do miocárdio (IM) representa a manifestação mais importante da doença isquêmica cardíaca. O Fator de Crescimento de Fibroblastos básico (FGF-2) caracteriza-se por induzir mecanismos de reparo cardíaco. Contudo, o seu uso clínico é limitado pela sua curta meia-vida biológica, baixa estabilidade e pouca especificidade para órgãos-alvos. Por sua vez, lipossomas são nanocarreadores amplamente explorados no tratamento de doenças cardiovasculares. Entretanto, o seu potencial para entrega de fatores de crescimento ao miocárdio não foi amplamente investigado. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação lipossomal de FGF-2 para regeneração cardiovascular experimental. Inicialmente, lipossomas vazios (sem FGF-2) com diferentes tamanhos foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e caracterizados quanto ao tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e morfologia. Testes de citocompatibilidade foram realizados em cardiomiócitos H9c2 e fibroblastos L929. Em seguida, avaliou-se a resposta tecidual e a retenção cardíaca dos lipossomas marcados com rodamina (Lipo-Rod) em um modelo murino de IM. Neste procedimento, os lipossomas foram administrados por via transtorácica com auxílio de ecocardiografia e, após 3 dias, os animais foram eutanasiados para avaliação histológica. Após essa etapa, visando à encapsulação de FGF-2, foi realizada a otimização do tamanho dos lipossomas por extrusão, utilizando membranas de polycarbonato com poro de 0,6 μm e 1 μm . Lipossomas contendo FGF-2 (Lipo-FGF-2) foram caracterizados físico-quimicamente. A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada por ELISA. A bioatividade dos Lipo-FGF-2 foi avaliada *in vitro* pela determinação da capacidade proliferativa de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). Como resultados, Lipo-Rod com tamanhos médios de 165 nm $\pm$ 1, 468 nm $\pm$ 16, 1551 nm $\pm$ 26 e 1954 nm $\pm$ 60 foram obtidos. Bem como, vesículas esféricas com cargas neutras ($-8,5 \pm 0,6$; $-9,1 \pm 1,3$; $-2,7 \pm 0,3$; $-1,1 \pm 0,2$). Os lipossomas não apresentaram citotoxicidade frente à cardiomiócitos e fibroblastos na faixa de molaridade 120 – 9,3 μM . No estudo *in vivo*, lipossomas de maiores tamanhos (1551 nm e 1954 nm) induziram inflamação significativa no tecido cardíaco em comparação com o grupo controle da lesão cardíaca ($p < 0,0001$). Lipossomas de 468 nm induziram menor inflamação e maior retenção no tecido cardíaco 72 h após a injeção. Com a extrusão dos lipossomas, vesículas com tamanho médio de 748,1 $\pm$ 100,8 nm, PDI 0,202 e potencial zeta $-4,2 \pm 0,38$ mV foram obtidas. A incorporação do FGF-2 nos lipossomas não alterou estes parâmetros (738,7 $\pm$ 164,8 nm; PDI 0,146; $-5,6$ mV; $p > 0,05$). A EE% do FGF-2 foi de 59,3 $\pm$ 8,2%. Com relação à bioatividade, os lipossomas carregados com FGF-2

induziram proliferação celular semelhante ao FGF-2 padrão. Em conclusão, lipossomas de tamanho aproximado de 500 nm demonstraram citocompatibilidade, retenção cardíaca e biocompatibilidade. Destaca-se, a administração inédita de lipossomas por injeção transtorácica guiada por ultrassom em um modelo animal de IM. A EE% do FGF-2 contido nos lipossomas, manteve-se dentro do esperado para fármacos hidrofílicos encapsulados por carregamento passivo. Ainda, os lipossomas preservaram a atividade biológica do FGF-2, o que posiciona a formulação em um nível de desenvolvimento avançado para estudos *in vivo*.

Palavras-chave: Lipossomas. FGF-2. Administração cardíaca. Biocompatibilidade. Infarto do miocárdio.

ABSTRACT

Myocardial infarction (MI) is the most important manifestation of ischemic heart disease. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) has been characterized by induce mechanisms of cardiac repair. However, the clinical use of FGF-2 is limited by its short biological half-life, low plasma stability and low specificity to target organs. In turn, liposomes are nanocarriers extensively exploited in the treatment of cardiovascular diseases. However, their potential for myocardial-growth factors delivery has not been extensively explored. Here, we aim to develop a liposomal formulation of FGF-2 for experimental cardiovascular regeneration. Initially, FGF-2 without liposomes and different sizes were produced by the method of hydrating the lipid film. Then, liposomes were characterized by size, polydispersity index (PDI), zeta potential and morphology. Cytocompatibility tests were performed in H9c2 cardiomyocytes and L929 fibroblast cells. Next, tissue response and cardiac retention of rhodamine-labeled liposomes (Rhod-Lipo) were evaluated in a murine model of MI. In this step, liposomes were administered by ultrasound-guided transthoracic injection. Three days latter, animals were euthanized for histological evaluation. After that, new batches of liposomes were prepared aiming the encapsulation of FGF-2. In this step, size optimization of liposomes was performed by extrusion using polycarbonate membranes with pore size of 0.6 and 1.0 μm . FGF-2-loaded liposomes (FGF-2-Lipo) were produced and characterized for physicochemical properties. Encapsulation efficiency (EE%) was performed by ELISA. The bioactivity of FGF-2-Lipo was evaluated *in vitro* by determining the proliferative capacity of a human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). As results, Rhod-Lipo with mean sizes of $165 \text{ nm} \pm 1$, $468 \text{ nm} \pm 16$, $1551 \text{ nm} \pm 26$ e $1954 \text{ nm} \pm 60$ were obtained. As well as neutral vesicles (-8.47 ± 0.6 ; -9.06 ± 1.3 ; -2.7 ± 0.3 ; -1.09 ± 0.2) and spherical in shape. No toxic lipid concentrations were determined in the range 120 – 9.3 μM . Regarding *in vivo* study, larger liposomes (1551 nm and 1954 nm) induced significant inflammation in cardiac tissue compared with cardiac injury control group ($p < 0.0001$). In contrast, heart mice injected with 468 nm-sized liposomes exhibited a lower number of inflammatory cells. Still, a greater cardiac tissue retention 72 h post-injection was found. With size optimization of liposomes by extrusion, vesicles with average size of $748.05 \pm 100.75 \text{ nm}$, PDI 0.202 and zeta potential $-4.23 \pm 0.38 \text{ mV}$ were obtained. The incorporation FGF-2 into liposomes did not change these parameters ($738.7 \pm 164.8 \text{ nm}$, PDI 0.146, -5.62 mV ; $p > 0.05$). EE% of $59.3 \pm 8.2\%$ was reached. Regarding to bioactivity, FGF-2-loaded liposomes induced similar cell proliferation compared to standard FGF-2. In conclusion, our results demonstrate the *in vitro* compatibility,

heart retention and biocompatibility of liposomes 500 nm-sized average. Importantly, this is the first report describing an ultrasound-guided injection of liposomes in an animal model of MI. EE% of FGF-2 loaded into liposomes, remained within the expected range for hydrophilic drugs encapsulated by passive loading techniques. Additionally, FGF-2 associated to liposomes conserved its biological activity, which positions the formulation in an development advanced level for *in vivo* studies.

Keywords: Liposomes. FGF-2. Cardiac delivery. Biocompatibility. Myocardial infarction.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

Figura 1 -	Infarto do miocárdio como consequência de aterosclerose e trombose.....	24
Figura 2 -	Fisiopatologia do infarto do miocárdio.....	25
Figura 3 -	Regeneração cardíaca endógena após dano isquêmico.....	28
Figura 4 -	Mecanismos e barreiras potenciais para regeneração cardíaca endógena....	29
Figura 5 -	Abordagens terapêuticas emergentes para regeneração cardíaca.....	32
Figura 6 -	Base molecular do brotamento de um vaso.....	38
Figura 7 -	Fenótipo angiogênico dos FGF's.....	40
Figura 8 -	Rotas de entrega de fatores de crescimento para o miocárdio.....	44
Figura 9 -	Perfil da concentração do fármaco no plasma obtido com a administração de medicamentos convencionais em uma única dosagem (linha pontilhada preta), múltiplas dosagens (linha pontilhada azul) e na liberação controlada (linha vermelha).....	45
Figura 10 -	Sistemas de liberação controlada de fármacos e fatores de crescimento.....	47
Figura 11 -	Auto-montagem dos fosfolipídeos envolvidos na formação de lipossomas.....	52

Artigo 1

Figura 1 -	Physiopathology of myocardial infarction.....	60
Figura 2 -	Liposome features based on their number of bilayers for delivery of drugs or biopharmaceuticals.....	69
Figure 3-	Targeting strategies of liposomes for infarcted heart.....	73

Artigo 2

Figura 1 -	Experimental design of liposome administration in the mice infarcted myocardium.....	99
Figure 2 -	Cytotoxicity of Rhodamine-loaded liposomes (Rhod-Lipo 165, 468 and 1950 nm) with different sizes (Rhod-Lipo in L929 fibroblasts (A) and H9c2 cardiomyocytes (B) at different lipid concentration using the Alamar Blue assay.....	104
Figure 3 -	Representative ECG of a mouse subjected to the isoproterenol-induced myocardial infarction (s.c. 150 mg/kg/day). Baseline ECG (A) and after infarction (B). A significant ST elevation indicates MI (black arrow).....	105
Figure 4 -	Ultrasound-guided transthoracic injection of liposomes in ISO-infarcted mouse heart. LV short-axis echocardiography view of injected myocardium with needle reaching the anterior myocardial wall (A, red arrow). Injection point at epicardium (B, black arrow) and tissue distribution of Evan's blue dye towards aorta (B, white arrows).....	107
Figura 5 -	(A) Macroscopic view of hearts 3 days post-injection of hydrogel and liposomes with different mean size diameter (165, 468, 1551 and 1954 nm) and control. (B, C) Representative photomicrographs of H&E-stained heart sections for tissue structure and inflammation assessment, respectively.....	108
Figura 6 -	Analysis of total inflammatory cell infiltration on heart tissue quantified on 10 fields/heart (40× magnification).....	109
Figura 7 -	Myocardium retention of rhodamine-labeled liposomes of various sizes: 165 nm (A); 468 nm (B); 1551 nm (C) and 1954 nm (D,) by fluorescence microscopy; hydrogel (E) and untreated control mice (F).....	110

Artigo 3

Figura 1 -	Morphology of liposomes and MLVs. TEM images of optimized liposomes (A, bar = 2 μm ; B, bar = 0.2 μm). Light microscope image of MLVs (C, bar = 10 μm , 100 $\times$ magnification).....	125
Figura 2 -	Protein integrity assessment by SDS-PAGE of FGF-2. Lanes: 1- Protein ladder, 2- FGF- extracted from liposomes, 3- FGF-2 standard. Gel stained with Silver Stain (Lane 2).....	128
Figure 3 -	Bioactivity assay.....	129

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 -	Pre-clinical studies that used biopharmaceuticals encapsulated into liposomes to treat myocardial infarction/to cardiac regeneration.....	75
------------	---	----

Artigo 2

Tabela 1 -	Physicochemical characterization of fluorescent-labeled liposomes with different size.....	102
------------	--	-----

Artigo 3

Tabela 1 -	Results of liposome optimization by extrusion.....	124
Tabela 2 -	Characterization data of empty, rhodamine and FGF-2 liposomes.....	127

LISTA DE SIGLAS

bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
CEM	Concentração efetiva mínima
CEs	Células endoteliais
CP	Células perivasculares
CPCs	Células progenitoras cardíacas
CTM	Concentração tóxica mínima
CTMs	Células-tronco mesenquimais
DCV	Doenças cardiovasculares
DIC	Doença isquêmica do coração
FDA	Food and Drug Administration
FC	Fatores de crescimento
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FGFs	Fatores de crescimento de fibroblastos
FGF-1	Fator de crescimento de fibroblastos do tipo 1 ou básico
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos do tipo 2 ou ácido
FGFR	Receptor dos fatores de crescimento de fibroblastos
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
ICP	Intervenção coronariana percutânea
IGF	Fator de crescimento de insulina
IL	Imunolipossomas
IM	Infarto do miocárdio
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
Lipo-FGF-2	Lipossomas contendo FGF-2
Lipo-Rhod	Lipossomas marcados com rodamina
OMS	Organização mundial de saúde
PDGF	Fator e crescimento derivado de plaquetas humanas
PEG	Polietilenoglicol

PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
RNAi	RNA de interferência
SLC	Sistemas de liberação controlada
SER	Sistemas retículo endotelial
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	OBJETIVOS.....	21
1.1.1	Objetivo Geral.....	21
1.1.2	Objetivos Específicos.....	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	22
2.1.1	Epidemiologia.....	22
2.1.2	Fisiopatologia do infarto do miocárdio.....	23
2.1.3	Regeneração cardíaca.....	26
2.1.4	Tratamentos convencionais	30
2.1.5	Tratamentos emergentes.....	31
2.2	FATORES DE CRESCIMENTO.....	33
2.2.1	Fator de crescimento de fibroblastos (FGF).....	34
2.2.2	Angiogênese terapêutica.....	35
2.2.2.1	Papel do FGF-2 na angiogênese terapêutica.....	39
2.2.2.2	Papel do FGF-2 sobre outros mecanismos de regeneração cardíaca	40
2.2.3	Estudos clínicos com fatores de crescimento.....	41
2.2.4	Entrega de fatores de crescimento no tecido cardíaco.....	42
2.3	ESTRATÉGIAS DE FORMULAÇÃO PARA O DELIVERY CARDÍACO DE FATORES DE CRESCIMENTO: SISTEMAS MICRO E NANOESTRUTURADOS.....	44
2.3.1	Sistemas de liberação controlada de fármacos e biomoléculas.....	44
2.3.2	Sistemas de liberação controlada associados a fatores de crescimento na regeneração cardíaca.....	46

2.3.2.1	Micro e nanopartículas poliméricas.....	48
2.3.2.2	Hidrogéis.....	49
2.3.2.3	Sistemas lipídicos.....	50
2.4	LIPOSSOMAS: POTENCIAIS CARREADORES DE FATORES DE CRESCIMENTO.....	53
2.4.1	Lipossomas.....	53
2.4.2	Lipossomas no <i>delivery</i> cardíaco.....	54
3	RESULTADOS.....	55
3.1	ADVANCED LIPOSOME-MEDIATED CARDIAC DELIVERY OF BIOPHARMACEUTICALS.....	55
3.2	TISSUE RESPONSE AND RETENTION OF MICRO AND NANOSIZED LIPOSOMES IN MYOCARDIUM AFTER ULTRASOUND-GUIDED TRANSTHORACIC INJECTION.....	92
3.3	PREPARATION, CHARACTERIZATION AND IN VITRO BIOLOGICAL ACTIVITY OF LIPOSOMES CONTAINING RECOMBINANT HUMAN FGF-2 INTENDED FOR MYOCARDIAL DELIVERY	116
4	CONCLUSÃO.....	135
	REFERÊNCIAS.....	136
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	146

1 INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas a principal causa de morte no mundo. O impacto global de 12,5% na última década aumentou, compreendendo atualmente aproximadamente 31% de todas as mortes (JOSEPH et al., 2017). O conceito de DCV inclui vários distúrbios do coração e vasos sanguíneos, tal como isquemia, doença cardíaca reumática e inflamatória. (WHO, 2008). Nos Estados Unidos, de acordo com o Projeto Nacional sobre Custo e Uso de Serviços de Saúde, em 2012 as despesas relacionadas à DCV, como investimentos hospitalares para cirurgia cardiovascular, revascularização e intervenções percutâneas foram de aproximadamente US \$300.000 bilhões, superando os custos de outras doenças, como o câncer (MOZAFFARIAN et al., 2016).

A doença isquêmica do coração (DIC) é uma doença de destaque entre as DCV, apresentando altos índices de mortalidade, bem como, alto impacto econômico. No Brasil, o estado de Pernambuco apresenta a maior taxa de mortalidade específica para doenças isquêmicas do coração (74,8 óbitos para cada 100.000 habitantes), estando acima da média nacional (56,4 óbitos para cada 100.000 habitantes). A mortalidade foi calculada conforme a estimativa do IBGE para as respectivas populações no ano de 2016 (DATASUS, 2016).

A DIC ocorre quando uma artéria coronariana sofre estreitamento ou oclusão, frequentemente como resultado da aterosclerose, o fluxo de sangue no coração torna-se insuficiente, resultando em angina, infarto do miocárdio, ou até mesmo morte súbita (KURRELMAYER et al., 1998).

O infarto do miocárdio (IM) representa a manifestação mais impactante da doença isquêmica do coração e também está associado à elevada morbimortalidade (MENSAH et al., 2014).

Tratamentos farmacológicos, terapias de revascularização, como a intervenção coronariana percutânea (ICP) e a cirurgia de revascularização (bypass coronariano); auxiliares mecânicos, tal como, dispositivos de assistência ventricular esquerda, seguido de abordagens terapêuticas para fatores de risco na aterosclerose, remodelamento ventricular tardio e arritmias cardíacas, são intervenções terapêuticas convencionais em pacientes acometidos por DIC. Estas são capazes de amenizar os sintomas, porém não obtêm êxito quanto à regeneração do tecido, e conseqüentemente restabelecimento da função cardíaca na região isquêmica. Para alguns pacientes a única alternativa é o transplante (FORMIGA et al., 2012; LERMAN et al., 2016).

Neste sentido, novas estratégias vêm sendo investigadas com o intuito de regenerar o miocárdio lesionado, incluindo a terapia gênica (MASON et al., 2015), a terapia celular (GARBERN & LEE, 2013), a engenharia de tecidos (CHAUDHURI et al., 2017) e a utilização de fatores de crescimento (HASTINGS et al., 2015). Particularmente, o fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF-2) tem sido identificado como um fator angiogênico com alto potencial cardioprotetor (DETILLIEUX et al., 2004).

Apesar dos mecanismos de regeneração induzidos por fatores de crescimento, o potencial terapêutico destas proteínas é limitado, entre outros fatores, pela sua curta meia vida, baixa estabilidade em plasma e pouca especificidade aos órgãos-alvo. De fato, Hwang e Kloner administraram uma associação de fatores de crescimento (incluindo FGF-2 e IGF-1) em ratos por via intraperitoneal e não observaram benefícios na função cardíaca, redução do tamanho do infarto ou aumento da vascularização (HWANG et al, 2011).

Desta forma, a utilização clínica dos fatores de crescimento depende de novas tecnologias de formulação capazes de aumentar sua meia-vida, manter sua bioatividade e controlar sua liberação local nos tecidos alvo. A incorporação de fatores de crescimento em sistemas de liberação controlada tem sido uma importante estratégia para garantir estas propriedades no âmbito na regeneração cardíaca (FORMIGA et al, 2012).

Lipossomas são vesículas constituídas de uma ou mais bicamada lipídica e um núcleo aquoso entre as bicamadas. Caracterizam-se como nanocarreadores versáteis, pois são capazes de encapsular, tanto moléculas hidrofílicas quanto lipofílicas, dentro do compartimento aquoso e inserido ou adsorvido na membrana lipídica, respectivamente (BATISTA, CARVALHO, & MAGALHÃES, 2007; LEVCHENKO, HARTNER, & TORCHILIN, 2012). Estes nanocarreadores estão sendo amplamente explorados no tratamento e diagnóstico de doenças cardiovasculares, seja pela encapsulação de fármacos, materiais genéticos ou agentes de contraste (BOWEY, TANGUAY, & TABRIZIAN, 2012).

Na terapêutica experimental do IM, lipossomas têm sido investigados como sistemas de liberação de eritropoietina (YAMADA et al., 2013), oligonucleotídeos antítese do MicroRNA-1 (miR-1) (LIU et al., 2014), prostaglandina E1 (LI et al., 2011) e ATP (VERMA et al., 2005) com resultados promissores. Seguindo a mesma abordagem, existem relatos na literatura da encapsulação de fatores de crescimento em lipossomas, que proporcionou, de forma geral, melhora da função cardíaca, redução da deposição de colágeno e angiogênese (SCOTT et al., 2009; TANG et al., 2014; HWANG et al., 2016). Contudo ainda é pequeno o número de pesquisas direcionadas ao uso de lipossomas como carreadores de fatores de crescimento para a regeneração cardíaca, embora os mesmos tenham obtido

êxito em suas abordagens. Desta forma, é encorajador e inovador explorar o uso desses nanocarreadores na veiculação de fatores de crescimento em modelos experimentais de IM.

No contexto da pesquisa em novas formulações de fatores de crescimento aplicados à cardiologia, este projeto encontra-se delineado para investigar o potencial de lipossomas para a liberação local e controlada de FGF-2.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma formulação lipossomal de FGF-2 para regeneração cardiovascular experimental.

1.1.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar lipossomas com diferentes tamanhos e marcados com rodamina (Lipo-Rhod);
- Avaliar a compatibilidade *in vitro* dos Lipo-Rhod em fibroblastos e cardiomiócitos;
- Padronizar um procedimento semi-invasivo de administração intracardíaca dos lipossomas através de injeção transtorácica em camundongos infartados;
- Realizar um estudo de biocompatibilidade e retenção cardíaca dos Lipo-Rhod em um modelo animal de infarto do miocárdio de camundongos C57BL/6;
- Encapsular FGF-2 em lipossomas (Lipo-FGF-2) e caracterizá-los;
- Avaliar a atividade biológica *in vitro* do FGF-2 encapsulado em lipossomas em linhagens de células HUVECS.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

2.1.1 Epidemiologia

As DCV continuam a ser a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo ocidental, com uma estimativa de morte de 17,1 milhões de pessoas por ano. Em 2030, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 23,6 milhões de pessoas venham a óbito por doenças cardíacas (BOLLINI; SMART; RILEY, 2011). O conceito de DCV inclui vários distúrbios do coração e vasos sanguíneos, tal como isquemia, doença cardíaca reumática e inflamatória (WHO, 2008).

Nos Estados Unidos, de acordo com o Projeto Nacional sobre Custo e Uso de Serviços de Saúde, em 2012 as despesas relacionadas à DCV, como investimentos hospitalares para cirurgia cardiovascular, revascularização e intervenções percutâneas foram de aproximadamente US \$ 300.000 bilhões, superando os custos de outras patologias, como o câncer (MOZAFFARIAN et al., 2016).

A DIC é uma patologia de destaque entre as DCV, apresentando altos índices de mortalidade, bem como, alto impacto econômico. (THOM et al., 2006). No Brasil, o estado de Pernambuco apresenta a maior taxa de mortalidade específica para doenças isquêmicas do coração (73,8 óbitos para cada 100.000 habitantes), estando acima da média nacional (53,8 óbitos para cada 100.000 habitantes) (DATASUS, 2011). A DIC ocorre quando uma artéria coronariana sofre estreitamento ou oclusão, frequentemente como resultado da aterosclerose, o fluxo de sangue no coração torna-se insuficiente, resultando em angina, infarto do miocárdio, ou até mesmo morte súbita (KURRELMMEYER et al., 1998).

O IM representa a manifestação mais impactante da doença isquêmica do coração e também está associado à elevada morbimortalidade (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016). É responsável por aproximadamente 7,3 milhões de mortes por ano em todo o mundo (CHERAGHI et al., 2017). A Organização Mundial de Saúde (OMS) destacou no último relatório, sobre o controle e prevenção de doenças cardiovasculares, que a expectativa é de aumento da mortalidade, devido à elevação da prevalência de fatores de risco para IM, tais como, fatores comportamentais e metabólicos (PASCUAL-GIL et al., 2015). Nos Estados Unidos, quase um milhão de pessoas são acometidas por IM a cada ano, enquanto mais de cinco milhões de pacientes sofrem de

insuficiência cardíaca crônica, uma ocorrência comum após IM (LERMAN et al., 2016). Em adição, a insuficiência cardíaca crônica caracteriza-se como uma doença com uma taxa de sobrevivência de 50% ao longo de 5 anos (GERBIN; MURRY, 2015).

Embora contribuições para a redução na mortalidade por DCV sejam corriqueiras, como a disponibilização e acesso a procedimentos avançados de revascularização (cateterismo, angioplastia, by-pass), uma quantidade significativa de pacientes não são candidatos a essas intervenções ou apresentam revascularização incompleta com tais procedimentos. Em decorrência, em uma boa parcela dos pacientes os sintomas de isquemia cardíaca persistem, caracterizando possivelmente indivíduos que sofrem de doença aterosclerótica severa difusa, a qual não pode ser tratada com cirurgia ou angioplastia (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA 2016). Configurando o transplante cardíaco como única alternativa de tratamento para sobrevivência.

Apesar dos pacientes acometidos por DCV em geral, ainda contarem com a possibilidade de tratamento com transplante cardíaco, a crescente demanda de pacientes que necessitam dessa abordagem terapêutica não corresponde ao aumento no número de doadores desse órgão (BOLLINI et al., 2011a).

No Brasil, existe a esperança que o quadro de doadores aumente, visto que, apenas 11% dos potenciais doadores representam estatisticamente os corações transplantados (MANGINI et al., 2015). Dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, evidenciam perspectivas otimistas em decorrência do aumento de doações nos últimos 3 anos, com média recorde em 2015 de 1,7 transplante por milhão de população. Contudo a mortalidade na fila de espera foi de 32,58% (dados pediátricos não considerados) no primeiro trimestre de 2016, evidenciando que a demanda ainda é maior do que a oferta. Atualmente, existem 261 pacientes ativos em lista de espera, desses 37 são pediátricos (ABTO, 2016).

2.1.2 Fisiopatologia do infarto do miocárdio

Em patologia, o IM é definido como a morte de células do miocárdio em decorrência de isquemia prolongada. Apresenta como etiologia principal, processos ateroscleróticos e trombose, que desencadeiam a oclusão de uma artéria coronariana e a consequente redução do fluxo sanguíneo (Figura 1) (THYGESEN et al., 2013). Dependendo do grau da isquemia gerado, leva a morte substancial de cardiomiócitos, podendo causar a perda de cerca de 50 gramas do miocárdio, o que representa de 1-2 bilhões de cardiomiócitos (DOBACZEWSKI; GONZALEZ-QUESADA; FRANGOIANNIS, 2010; VENUGOPAL et al., 2012).

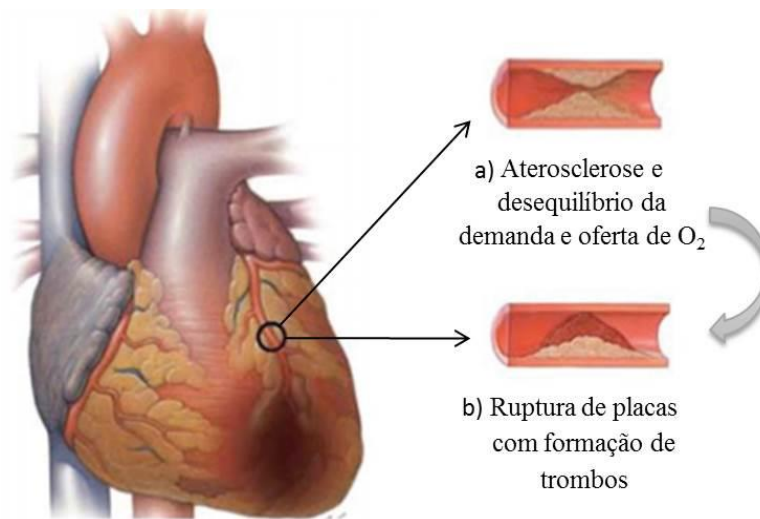


Figura 1 – Infarto do miocárdio como consequência de aterosclerose e trombose. a. Placas de ateroma reduzindo ou ocluindo o fluxo sanguíneo. b. Ruptura da placa de ateroma e a consequente formação de trombos. Fonte: Adaptado de Thygesen et al. (2012)

Inicialmente, a isquemia leva a morte do cardiomiócito por necrose ou apoptose, gerando uma área infartada e causando um déficit na função contrátil (FORMIGA et al., 2012). A morte celular histológica não é de imediato, a necrose completa das células do miocárdio em risco requer, pelo menos, 2-4 horas, ou mais, isso irá depender da presença de circulação colateral para a zona isquêmica, oclusão arterial coronária permanente ou intermitente, sensibilidade dos miócitos a isquemia, e a demanda individual de oxigênio e nutrientes (THYGESSEN et al., 2013).

Paralelamente, uma rápida migração de citocinas, quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão, iniciam uma intensa resposta inflamatória na zona infartada; proteases são ativadas e degradam a matrix extracelular. Macrófagos agem fagocitando os cardiomiócitos necróticos e a matriz extracelular degradada. Essa “limpeza” é importante para o reparo do tecido, estimulado mais adiante pela repressão da resposta inflamatória (FRANGOIANNIS, 2014) Enquanto ocorrem todas essas alterações moleculares e celulares, o coração inicia um processo de remodelação ventricular. As mudanças estruturais conduzem a um afinamento da parede e dilatação do ventrículo. Como consequência, o estresse sistólico e diastólico no músculo cardíaco, e as alterações na arquitetura ventricular, aumentam a sobrecarga na parede desencadeando a hipertrofia do miocárdio não infartado (SUTTON;

SHARPE, 2000). Por último, inicia um processo de cura e de reparo com a geração de uma cicatriz de colágeno na área infartada (LERMAN et al., 2016)

Todas estas modificações estimulam o desenvolvimento de uma geometria cardíaca, mais larga, fina e esférica. A cicatriz rica em colágeno previne a total desintegração da parede do ventrículo esquerdo, todavia o progresso da remodelação cardíaca pós-isquemia, frequentemente resulta em insuficiência cardíaca e morte (PASCUAL-GIL et al., 2015). Ainda assim, sobre condições de sobrevivência, a cicatriz de colágeno forma um “tecido acelular”, sem as propriedades bioquímicas dos cardiomiócitos, o que leva a disfunção elétrica e mecânica, perda da integridade estrutural, e finalmente, resultando em dilatação cardiomiopática (JOGGERST; HATZOPOULOS, 2009). Uma representação esquemática dos eventos que acometem o coração após o IM está descrita na figura 2.

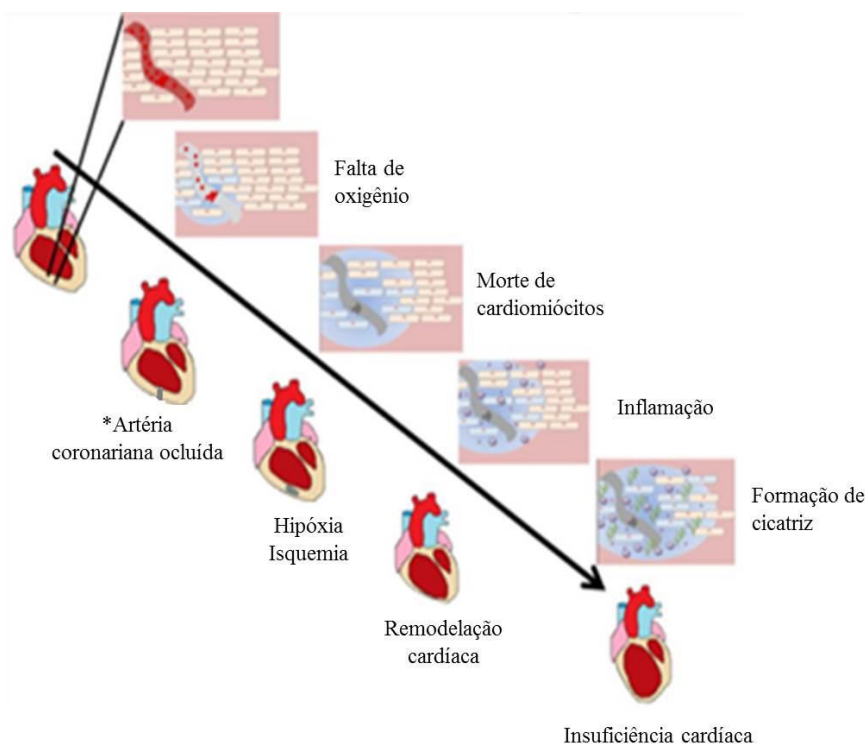


Figura 2 – Fisiopatologia do infarto do miocárdio. Representação esquemática do desenvolvimento do IM incluindo os principais pontos. Após a oclusão arterial (*), o coração gradualmente perde sua função e sofre uma remodelação negativa que culmina em insuficiência cardíaca total. A flecha preta indica a progressão da patologia. Fonte: Adaptado de Pascual-Gil et al. (2015).

2.1.3 Regeneração cardíaca

Muitos sistemas orgânicos em mamíferos, durante toda a vida adulta, exibem renovação permanente, tal como, a pele, intestino, fígado e osso. Contudo, apesar do seu papel crítico na homeostasia do organismo, o coração adulto dos mamíferos não regenera eficientemente, naturalmente (JUDD et al., 2016).

Os vertebrados inferiores, tal como, a salamandra e o peixe-zebra tem capacidade espontânea para substituir o tecido cardíaco perdido, em contrapartida, tem sido um dogma de longa data a concepção de que o coração de mamíferos não poderia se regenerar, reforçado pela crença de que células cardíacas adultas não realizavam mitose (UYGUR; LEE, 2016). A visão tradicional de que os miócitos de corações humanos adultos eram incapazes de serem renovados foi substituída recentemente pela noção de que alguns mamíferos, inclusive os humanos, exibem uma capacidade limitada de regeneração. (SEGBERS; LEE, 2008).

Com a consequente integração do carbono 14 (C14), gerado durante a Guerra Fria em decorrência dos testes com bombas nucleares, Bergmann e colaboradores (2009) utilizaram da datação do C14 no DNA para determinar a idade de cardiomiócitos em seres humanos. Os mesmos, identificaram que os cardiomiócitos sofrem renovação ao longo da vida sob condições fisiológicas, esta acontece a uma taxa de 1% ao ano em um adulto jovem, com 25 anos, e declina para 0,45% em um idoso, com 75 anos (BERGMANN et al., 2009). Existem muitas evidências da renovação de cardiomiócitos durante o envelhecimento em mamíferos, quanto à fonte da substituição celular, dois mecanismos são os mais descritos e estudados para explicar esse fenômeno: (1) Células progenitoras cardíacas se diferenciando em cardiomiócitos ou (2) Cardiomiócitos pré-existentes sofrendo desdiferenciação parcial, reentram no ciclo celular, sofrem mitose e originam novos cardiomiócitos (GARBERN; LEE, 2013) (Figura 3).

À medida que foi postulado e identificado a renovação de células cardíacas ao longo da vida humana, pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de estudar esse fenômeno no coração de mamíferos submetidos à lesão cardíaca.

Porrello e colaboradores (2013), descreveram a capacidade regenerativa de camundongos com 1 dia de vida em resposta a indução de IM. O coração neonatal apresentou uma capacidade regenerativa robusta, em decorrência da proliferação de cardiomiócitos, resultando em recuperação funcional completa, dentro de 21 dias. O mesmo grupo, já havia demonstrado essa capacidade regenerativa frente à lesão cardíaca provocada pela remoção do

ápice do ventrículo. Contudo a resposta regenerativa foi perdida nos animais após o 7º dia de nascimento.

Ainda no mesmo trabalho, os autores, identificaram que a inibição da família de miR-5 de microRNAs desde a idade pós-natal precoce (após 7 dias) até a idade adulta, aumenta a proliferação de miócitos no coração adulto e melhora a função sistólica ventricular esquerda após IM. Sugerindo que esses microRNAs modulam a regeneração cardíaca ao longo dos anos através da inibição da proliferação cardíaca pós-natal.

Ainda existem controvérsias do quanto à extensão que o coração de mamíferos adultos podem regenerar (VAN BERLO; MOLKENTIN, 2014). Sabe-se que em resposta a lesão, os mamíferos adultos, incluindo os seres humanos, não regenera a maioria dos cardiomiócitos perdidos e, em vez disso, substitui o músculo por um tecido cicatricial. A perda de cardiomiócitos compromete a contratilidade do miocárdio remanescente, levando a insuficiência cardíaca e morte quando a extensão da lesão é grave (UYGUR; LEE, 2016).

Diferentemente, peixes e anfíbios apresentam uma capacidade robusta para regeneração ao longo de toda vida. O peixe-zebra, é um exemplo, após amputação de 20% do seu ventrículo, ele apresenta recuperação funcional total do coração e ainda na ausência de cicatriz 2 meses após a lesão (XIN; OLSON; BASSEL-DUBY, 2013).

Malliaras e colaboradores (2013), realizaram um estudo de mapeamento do destino genético em combinação com pulsação de BrDU a longo prazo para identificar a origem da cardiomiogênese pós-natal no coração de ratos normais e infartados. Observou-se que a rotatividade de cardiomiócitos no coração dos ratos normais ocorre predominantemente, através da proliferação de cardiomiócitos residentes, ou seja, pré-existentes, a uma taxa de 1,3-4 % ano. Já após o IM, os novos cardiomiócitos surgiram de células progenitoras cardíacas (CPCs), bem como, de cardiomiócitos pré-existentes (residentes). Esses achados, foram também destacados por Lerman et al. (2016), em seu artigo de revisão sobre regeneração e reparo cardíaco, como as duas teorias que explicam o processo de reparação intrínseco do coração após dano isquêmico. Contudo, outros autores defendem também a participação de células-tronco periféricas recrutadas da medula óssea na regeneração, que juntamente com as CPCs, encontra-se em maior número após a lesão cardíaca (FINAN; RICHARD, 2015) (Figura 3).

As CPCs, detectadas recentemente no coração de mamíferos adultos, são células-tronco cardíacas endógenas que se diferenciam em cardiomiócitos, através da regulação autócrina e de fatores inflamatórios, e representam 1% da população total de células cardíacas; distribuídas em três grupos identificados conforme a expressão de marcadores de

membrana, em células c-kit +, Sca-1 + e ISL-1 +. Ainda não está bem esclarecida, qual a origem das CPCs, se são recrutadas da medula-óssea ou localizam-se em uma espécie de reservatório, no átrio e ventrículo direito. Tem sido investigada também, a participação dessas células na renovação fisiológica de cardiomiócitos e de células endoteliais vasculares (LERMAN et al., 2016).

A capacidade de gerar cardiomiócitos no coração humano adulto sugere que o desenvolvimento de estratégias terapêuticas destinadas a estimular esse processo, no tratamento de patologias cardíacas, é bem embasado e racional (BERGMANN et al., 2009). Contudo, a cardiomiogênese é limitada, conduzindo a pertinência de determinar quais barreiras poderiam estar impedindo a eficácia da regeneração (SEGRS; LEE, 2008).

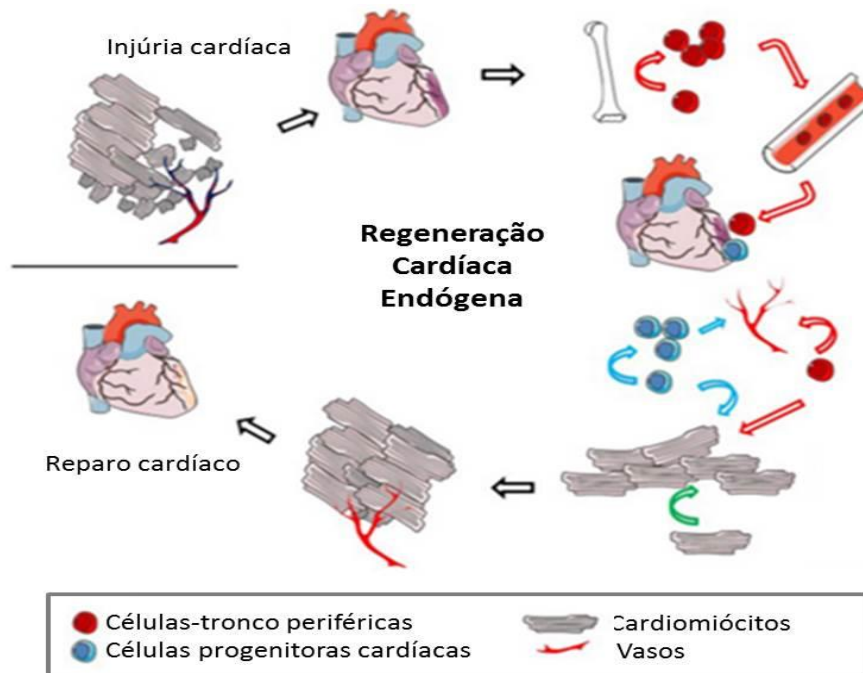


Figura 3 - Regeneração cardíaca endógena após dano isquêmico. As células que participam do processo de regeneração endógena, incluem os cardiomiócitos (células cinzas. Linhas brancas), células progenitoras cardíacas locais (células em azul), e células-tronco periféricas recrutadas (células em vermelho). Estas células tem o potencial de se proliferar e participar da regeneração dos miócitos cardíacos, angiogênese, e da liberação de fatores trópicos que podem reduzir a morte cardíaca celular. As células também são identificadas na figura pela cor das flechas (células-tronco periférica, vermelho; células progenitoras cardíacas, azul; cardiomiócitos, verde). Fonte: Adaptada de Finan; Richard (2015)

Para Segers & Lee (2008), a resposta fisiopatológica do miocárdio infartado, caracterizada por isquemia, inflamação, fibrose e angiogênese inadequada, compõe um microambiente hostil, que deve evitar, por exemplo, a ativação de CPCs. Do mesmo modo, a formação de fibrose que é requerida para evitar a ruptura do miocárdio, dependendo da extensão e devido à sua natureza densa torna-se uma barreira física para regeneração das células (SEGERS; LEE, 2008). Diante disso, a redução do microambiente hostil (Figura 4), através de estratégias que minimizem a inflamação, fibrose, apoptose, e adicionalmente, o estímulo a angiogênese, na área isquêmica, deve contribuir para o reparo cardíaco (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016).

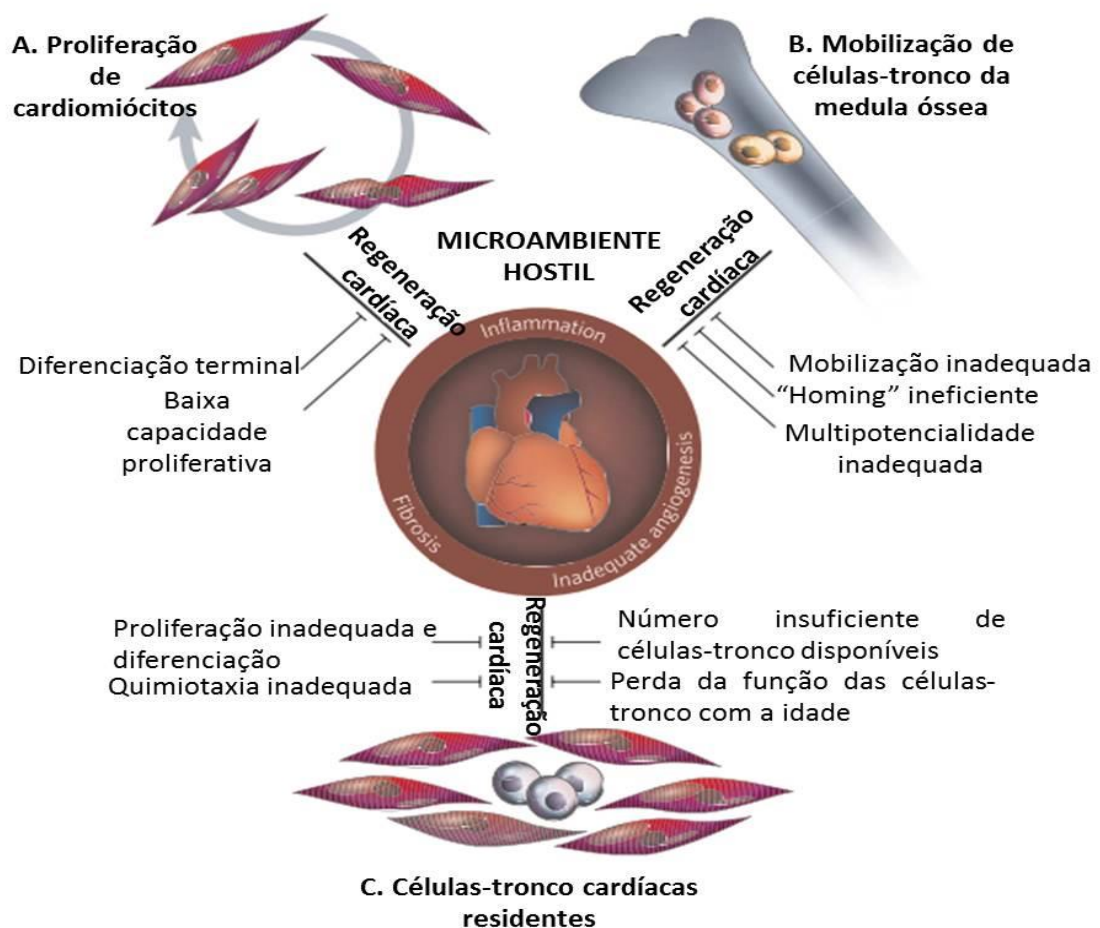


Figura 4 - Mecanismos e barreiras potenciais para regeneração cardíaca endógena. Os mecanismos de regeneração após isquemia cardíaca são descritos e representados em a, b e c. Potenciais limitações dos mecanismos também são descritos, apresentando o ambiente hostil, exemplificado aqui por inflamação, fibrose e angiogênese inadequada, como barreira para resposta regenerativa endógena eficaz. Fonte: Adaptado de Segers; Lee (2008)

2.1.4 Tratamentos convencionais

As modalidades vigentes no tratamento do IM envolvem terapia farmacológica, revascularização precoce, com ICP e cirurgia de revascularização, também conhecida por bypass coronariano; auxiliares mecânicos, tal como, dispositivos de assistência ventricular esquerda, seguido de abordagens terapêuticas para fatores de risco na aterosclerose, remodelamento ventricular tardio e arritmias cardíacas. Essas abordagens buscam restaurar a função ou limitar a progressão dos efeitos fisiopatológicos pós-isquêmicos, mas nem sempre são efetivas a longo prazo (FORMIGA et al., 2012; LERMAN et al., 2016).

A terapia farmacológica faz uso de agentes antiplaquetários, anticoagulantes orais, nitratos, bloqueadores β -adrenérgicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, entre outros (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016). De forma geral, o tratamento medicamentoso visa reduzir a carga cardíaca, melhorar o desempenho sistólico, e também, oferecer proteção contra os fatores humorais tóxicos que são ativados durante a insuficiência cardíaca (RADHAKRISHNAN; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2014).

A revascularização do miocárdio tem como objetivo, em todas as modalidades, restabelecer o fluxo sanguíneo adequado ao músculo cardíaco. A cirurgia de revascularização, realizada pela primeira vez em 1945, por Vineberg, propôs o uso da artéria torácica esquerda na recondução indireta do sangue para o miocárdio isquêmico. Em 1959, com o surgimento dos exames de cateterismo cardíaco, foi possível comprovar a eficácia desse método. Outros vasos, como a veia safena, foram testados e incorporados na clínica. Desde então, a cirurgia de revascularização passa por aprimoramentos progressivos, objetivando menor agressão ao paciente e o emprego de enxertos de maior durabilidade (PÊGO-FERNANDES; GAIOTTO; GUIMARÃES-FERNANDES, 2008). Com o advento da intervenção coronária percutânea (ICP), em 1977, o perfil de pacientes candidatos à cirurgia de revascularização mudou, estando limitada a pacientes mais graves e que apresentem condições clínicas mais complexas. A ICP é caracterizada pela inserção arterial periférica de um cateter balão conduzido até o sistema coronariano (PÊGO-FERNANDES; GAIOTTO; GUIMARÃES-FERNANDES, 2008; PIEGAS; HADDAD, 2011). Uma das complicações frequentes logo após a disseminação da ICP foi à reestenose coronariana, ou retomada da obstrução da luz arterial meses após a intervenção (CAIXETA; BECK, 2004). A implantação de stents coronarianos, não recobertos e posteriormente, com associação farmacológica, ditos stents farmacológicos (sirolimus, paclitaxel, entre outros agentes terapêuticos), tornaram a reestenose e a necessidade de reintervenção menos frequentes (PIEGAS; HADDAD, 2011).

As melhorias no tratamento do infarto agudo do miocárdio (IAM) levaram a uma maior sobrevida e melhores prognósticos. Pacientes que sobreviveriam independente das terapias de revascularização cardíaca, por exemplo, passaram a ter uma redução da extensão da lesão ventricular, já os que dependeram dessa modalidade de tratamento para sobreviver, ainda são acometidos por danos substanciais ao ventrículo esquerdo. Até então, é incerto o risco desses pacientes, de perfis opostos, quanto às chances de desenvolver insuficiência cardíaca (IC), porém vários ensaios clínicos e registros apontam a IC como uma ocorrência comum após o IAM, assim, tem sucedido a preocupação que um “pool” crescente de sobreviventes do IAM possa alimentar uma epidemia de IC (LERMAN et al., 2016).

Apesar dos recentes avanços na terapia médica, de dispositivos e melhorias no atendimento ao longo dos últimos 20 anos, as perspectivas para pacientes com IC continuam baixas, e as taxas de sobrevivência são piores do que para pacientes com câncer de intestino, mama ou da próstata (BRENNER et al., 2012; SIEGEL et al., 2012).

Embora ainda haja a possibilidade do transplante cardíaco, considerado padrão ouro no tratamento da IC avançada, a demanda não acompanha a disponibilidade de doadores, bem como, as complicações decorrentes do tratamento imunossupressor, clamam pelo desenvolvimento de novas estratégias para reparar e regenerar o coração lesado (PTASZEK et al., 2012; RADHAKRISHNAN et al., 2014).

2.1.5 Tratamentos emergentes

O estabelecimento de novas modalidades de tratamento voltadas para melhorias no prognóstico de pacientes acometidos por IAM reduzindo complicações de difícil trato, tal como a IC, é essencial. Estas novas terapias devem objetivar a regeneração funcional da contratilidade miocárdica, através de abordagens que interfiram entre outros pontos, em cada etapa do processo de remodelação patológica, minimizando a inflamação, fibrose e apoptose, em outras palavras, mitigando o microambiente hostil do pós-infarto; e também estimulando angiogênese na região isquêmica. Assim, tem sido fomentado e realizado uma crescente investigação sobre novas estratégias para regeneração do miocárdio lesionado, incluindo como tratamentos emergentes, a terapia gênica, engenharia de tecidos, terapia celular, e a utilização de fatores de crescimento (Figura 5) (DOPPLER et al., 2013; LERMAN et al., 2016; REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA et al., 2016).

A terapia gênica é caracterizada pela entrega de material genético, pequenas moléculas de DNA ou RNA, a células, tecidos ou órgãos humanos, visando fornecer novas funções

terapêuticas, ou corrigir um defeito genético, com o objetivo de atuar na prevenção ou tratamento de doenças (LYON et al., 2008). Com relação ao reparo do músculo cardíaco, algumas estratégias são exploradas pela terapia gênica, tais como, a atuação sobre etapas do ciclo celular que restringem a proliferação dos cardiomiócitos, inibição das vias apoptóticas induzidas por hipóxia, melhora dos mecanismos angiogênicos para aumentar o fornecimento de oxigênio e nutrientes, estímulo à diferenciação de células-tronco em células do músculo cardíaco, e aumento do potencial contrátil dos cardiomiócitos remanescentes (MASON et al., 2015). Contudo, mesmo com todo seu potencial para atuar no tratamento de doenças cardíacas, alguns problemas ainda limitam a eficácia da terapia gênica, estes incluem, o delivery ineficiente para o tecido alvo, resposta imune negativa e perda do efeito terapêutico (SASANO et al., 2007).

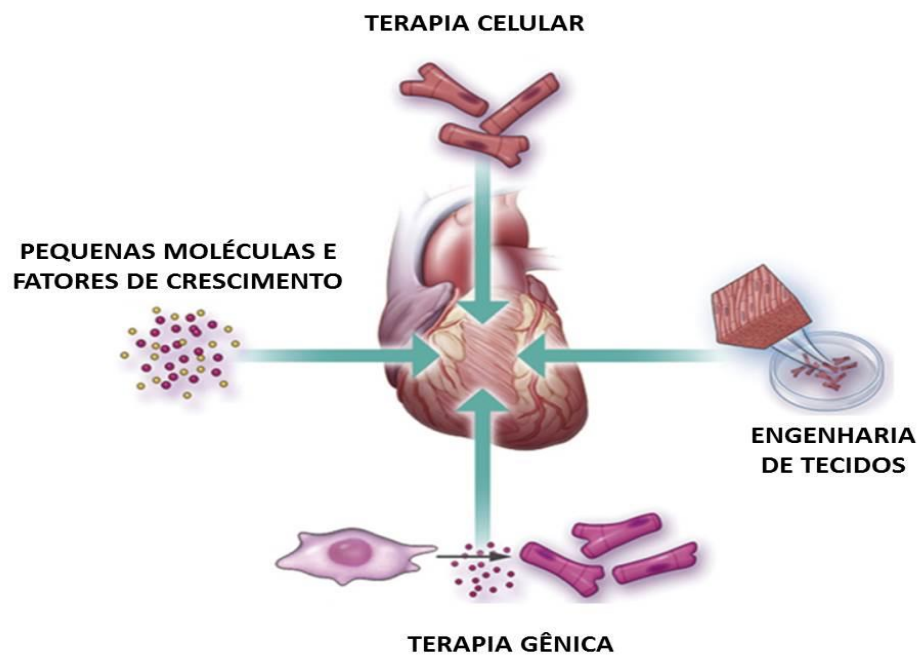


Figura 5 – Abordagens terapêuticas emergentes para regeneração cardíaca. Estão sendo investigadas múltiplas estratégias para promover a regeneração do miocárdio em doenças cardíacas (no sentido horário do topo): (1) a terapia celular com células cultivadas e injetadas no miocárdio ou artérias coronárias está em ensaios clínicos, espera-se que essas células tornam-se cardiomiócitos funcionais; (2) abordagens de engenharia de tecidos que associam células com biomateriais para criar tecidos funcionais *in vitro* e posterior transplante no coração; (3) a reprogramação de não cardiomiócitos em cardiomiócitos *in situ* pode ser realizada com vírus, pequenas moléculas ou microRNAs; e (4) pequenas moléculas, tais como fatores de crescimento ou microRNAs, que são administrados para promover a proliferação de cardiomiócitos ou angiogênese. Fonte: Adaptado de Garbern; Lee (2013)

Já a engenharia de tecidos, outra abordagem terapêutica emergente na regeneração cardíaca, aplica os conhecimentos das áreas de engenharia e ciências para compreender a relação entre estrutura e função nos tecidos de mamíferos mediante condições fisiológicas e patológicas, e assim, atua na produção de substitutos biológicos para reparar, melhorar ou manter a função de um tecido (VUNJAK-NOVAKOVIC, 2016). Quanto à aplicação da engenharia de tecidos para o coração, válvulas cardíacas, enxertos coronários e o miocárdio apresentam-se como os principais alvos (CHAUDHURI et al., 2017). Essa modalidade terapêutica vem se mostrando promissora e utiliza-se de várias estratégias para reparar o miocárdio lesionado, dentre elas, a implantação de scaffolds acelulares, e o uso dos scaffolds combinados com células, genes ou fatores de crescimento (RADHAKRISHNAN et al., 2014).

A terapia celular é a modalidade de tratamento emergente mais explorada nos ensaios clínicos direcionados a regeneração cardíaca, caracterizada pelo transplante ou infusão de células com potencial progenitor atuante sobre o miocárdio infartado. Os tipos de células-tronco envolvidas na entrega exógena ao coração compreendem células-tronco embrionárias, pluripotentes induzíveis, e células progenitoras adultas, neste último grupo, incluem células cardíacas, da medula óssea e mioblastos esqueléticos (GARBERN; LEE, 2013). Muitos estudos pré-clínicos têm analisado o potencial dessa terapia emergente, como na injeção de células c-kit⁺, um tipo de célula progenitora cardíaca adulta, no coração de roedores que promoveu a formação de novos cardiomiócitos e vasos sanguíneos funcionais (LIN; PU, 2014). Ainda assim, estudos sugerem que os benefícios da terapia celular são modestos, e que a resposta positiva está vinculada a efeitos parácrinos no miocárdio lesionado (JOGGERST; HATZOPOULOS, 2009).

Estes efeitos parácrinos são associados à liberação de fatores de crescimento pelas células. Diante disso, o emprego de fatores de crescimento na terapia regenerativa do coração, representa uma opção atraente, que já é explorada e promove a revascularização do tecido em modelos animais de isquemia cardíaca. (FORMIGA et al., 2010).

2.2 FATORES DE CRESCIMENTO

Entre os novos agentes terapêuticos, peptídeos e proteínas representam um recurso acelular bem consolidado na regeneração do tecido cardíaco após uma doença isquêmica (HASTINGS et al., 2015). Fatores de crescimento são proteínas que atuam na regeneração cardíaca através da indução da proliferação de cardiomiócitos, ativação de células progenitoras cardíacas residentes no local da lesão, recrutamento de células progenitoras para

o coração injuriado ou de células funcionais capazes de induzir a neovascularização (angiogênese). O controle das funções celulares é mediado pelos FC através da ativação específica de vias de sinalização, atuando sobre diferentes rotas biológicas e órgãos (HASTINGS et al., 2015).

Com a descoberta do envolvimento de fatores de crescimento no desenvolvimento do sistema cardiovascular durante a embriogênese, essas moléculas tornaram-se alvo de pesquisa de muitos cientistas, objetivando estudar o papel desses fatores no reparo cardíaco de organismos adultos. Em decorrência desse interesse, atualmente, sabe-se que fatores pró-angiogênicos encontrados no embrião, são também, expressadas no coração de adultos após situações de estresse ou hipóxia (FORMIGA et al., 2012).

Muitos fatores de crescimento foram e são estudados quanto a sua capacidade regenerativa no músculo cardíaco, dentre eles, IGF (fator de crescimento de insulina) (MOURKIOTI; ROSENTHAL, 2005), HGF (fator de crescimento de hepatócito) (ELLISON et al., 2011), FGF (fator de crescimento de fibroblastos) Iwakura et al. (2003), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (PAYNE et al., 2007), neurorregulina-1 (POLIZZOTTI et al., 2015), intermedina (ZHANG et al., 2009). Dentre os exemplos citados, VEGF e FGF-2, um tipo de FGF, são os fatores mais explorados e estudados nos estudos clínicos desenvolvidos com FC para regeneração cardíaca (AVILES; ANNEX; LEDERMAN, 2003).

2.2.1. Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) foi descoberto em 1973 a partir de extratos da hipófise, é um peptídeo encontrado em vertebrados e invertebrados e amplamente expresso em células e tecidos (YUN et al., 2010). A família de FGF consiste de 23 membros que são distinguidos pelo seu padrão de expressão, presença de uma sequência líder (ausente em FGF-1 e 2) e afinidade pelas diferentes subclasses de isoformas do receptor (FGFR) (ANNEX, 2013; POST et al., 2001).

A maioria dos FGFs apresenta peso molecular entre 16-18 kDa e caracterizam-se pela alta afinidade a heparina e ao sulfato de heparano. De modo geral, os FGFs ligam-se a superfície das células na presença de proteoglicanos de heparina e desencadeiam uma variedade de funções celulares (JACOBS, 2007). Entre os FGFs, FGF-1 (ácido) e FGF-2 (básico), são os mais estudados e foram os únicos correlacionados com a regeneração cardíaca. No miocárdio, FGFs portam-se como moléculas pleiotrópicas, atuando sobre várias células, tal como, células do músculo liso, células endoteliais e mioblastos (FORMIGA et al.,

2012). Curiosamente, HAO e colaboradores (2016), demonstraram recentemente, que outro tipo de FGF, o FGF-23, induz uma resposta contrária ao reparo cardíaco. Os mesmos correlacionaram o FGF-23 a presença de fibrose e exacerbação da disfunção diastólica induzida por IM em camundongos. Anteriormente, esse tipo de FGF já havia sido descrito por induzir hipertrofia ventricular patológica (HAO et al., 2016).

A ligação dos FGFs aos receptores do tipo tirosina quinase, identificados por FGFR-1, 2, 3 e 4, desencadeia a dimerização e autofosforilação do receptor (CROSS; CLAEISSON-WELSH, 2001). Este evento promove a ativação e recrutamento de moléculas específicas que se ligam a parte citosólica do receptor de tirosina quinase, e desencadeiam a atividade de uma série de vias de sinalização. A natureza da resposta fisiológica dependerá da via de sinalização ativada pela interação entre o tipo de FGF e o tipo do receptor (YUN et al., 2010).

Muitos trabalhos têm evidenciado as funções biológicas dos FGFs, dentre elas, indução da proliferação celular e produção do ativador de plasminogênio uroquinase (uPA) em células endoteliais GM 7373 da aorta bovina fetal Rusnati et al. (1996); controle da migração de células-tronco mesenquimais humanas (SCHMIDT et al., 2006); indução indireta de angiogênese por estimular a liberação de VEGF de células endoteliais no coração (CARMELIET; JAIN, 2011); diferenciação celular (YUN et al., 2010); sobrevivência de cardiomiócitos, células do músculo liso e células endoteliais; e promoção da maturação e estabilização de novos vasos formados pela indução da expressão do receptor PDGF em células do músculo liso vascular (FORMIGA et al., 2012).

2.2.2 Angiogênese terapêutica

A rede de vasos sanguíneos apresenta como funções fundamentais, a distribuição de oxigênio, nutrientes e eliminação de resíduos metabólicos, agregada a essas atividades, também promove a circulação de células do sistema imune, permitindo um tráfico rápido, quando necessário. Essa última característica atua de forma fundamental em diversos processos biológicos, incluindo a regulação do metabolismo, regeneração, resposta imune, cura e o desenvolvimento de muitas doenças (SUN; ALTALHI; NUNES, 2016).

Artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias, representam os diferentes tipos de vasos sanguíneos. Em síntese, as artérias são responsáveis por distribuir o sangue do coração para todos os órgãos e tecidos; e as veias permitem o retorno do sangue para o coração (SUN; ALTALHI; NUNES, 2016). O fornecimento de nutrientes e oxigênio para os tecidos acontece na interface da microvasculatura, a rede de pequenos vasos sanguíneos, composta

por arteríolas, capilares e vênulas que se interpõem entre os sistemas arterial e venoso (STAICULESCU et al., 2014).

Os dois componentes críticos da composição celular vascular são as células endoteliais (CEs) e as células perivasculares (CP). Estas últimas, representadas pelas células do músculo liso e pericitos, que circundam as CEs, conferindo suporte e estabilidade. As células do músculo liso são encontradas nas camadas internas das artérias e veias maiores, enquanto que os pericitos envolvem vasos sanguíneos menores ou da microvasculatura (WANJARE; KUSUMA; GERECHT, 2013).

A formação dos vasos sanguíneos ocorre em decorrência de três processos que se inter-relacionam, são eles, a vasculogênese, angiogênese e arteriogênese (DEVEZA; CHOI; YANG, 2012).

A vasculogênese é o processo de formação de um novo vaso a partir de células-tronco endoteliais pluripotentes. Durante o desenvolvimento embrionário, é responsável pela síntese do plexo vascular primitivo, que posteriormente conta com a contribuição de outros tipos de células vasculares para completar o processo de formação dos vasos (POST et al., 2001). Diferentemente, na angiogênese, o novo vaso é formado a partir de micro vasos pré-existente, por meio de brotação e processos de divisão celular. Já a arteriogênese, refere-se ao surgimento de novas artérias, compostas por uma túnica média bastante desenvolvida e envolvida por células do músculo liso e pericitos (POST et al., 2001).

A angiogênese é um fenômeno essencial durante a embriogênese, mas também é identificada no tecido adulto mediante algumas circunstâncias fisiológicas, tal como, ovulação, resposta imune, inflamação e reparo tecidual (FORMIGA et al., 2012). Acompanhada da arteriogênese, a angiogênese é primordial na revascularização de tecidos subsupridos (DEVEZA; CHOI; YANG, 2012).

Angiogênese é um processo complicado envolvendo vários tipos de células, numerosos fatores de crescimento, complexos controles e balanços orquestrados por fatores inibitórios e estimulatórios (HUANG et al., 2015). Em condições de homeostasia, células endoteliais são mantidas em um estado estacionário por sinalizações autócrinas. O estado quiescente das células pode ser interrompido, em decorrência de condições de baixo suprimento de O₂, tal como, inflamação, cicatrização de feridas ou de desenvolvimento tumoral (DEVEZA; CHOI; YANG, 2012). Estas condições promovem a liberação de sinais angiogênicos, tal como, VEGF, ANG-2, FGF e quimiocinas, que desencadeiam a separação dos pericitos de vasos pré-existentes e posterior liberação da membrana basal por degradação proteolítica, isto permite que as células endoteliais se soltem das junções intercelulares, como

descrito na figura 6. O vaso nascente dilata, VEGF aumenta a permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de proteínas plasmáticas que passam a funcionar como uma matriz extracelular provisória para onde as células endoteliais migram, em resposta a sinalização de integrinas. Para controlar e orientar a migração das CE, uma CE, conhecida como célula de ponta, é eleita para liderar a ponta do vaso em crescimento, as células posteriores são responsáveis pelo alongamento do vaso em brotação em decorrência da proliferação celular. O fluxo sanguíneo é estabelecido após a fusão de dois ramos de vasos. Os mesmos tornam-se estáveis após o recobrimento com pericitos e as junções intercelulares são restabelecidas, permitindo que os vasos se tornem funcionais. Se os vasos não conseguirem perfundir eles regressam (CARMELIET; JAIN, 2011).

Os eventos de angiogênese, arteriogênese e vasculogênese que se inter-relacionam e ocorrem em condições de hipóxia, e em até certo ponto fisiologicamente, sofrem influências de fatores genéticos. Porém são também, objetivos da manipulação farmacológica e genética na angiogênese terapêutica (ANNEX, 2013).

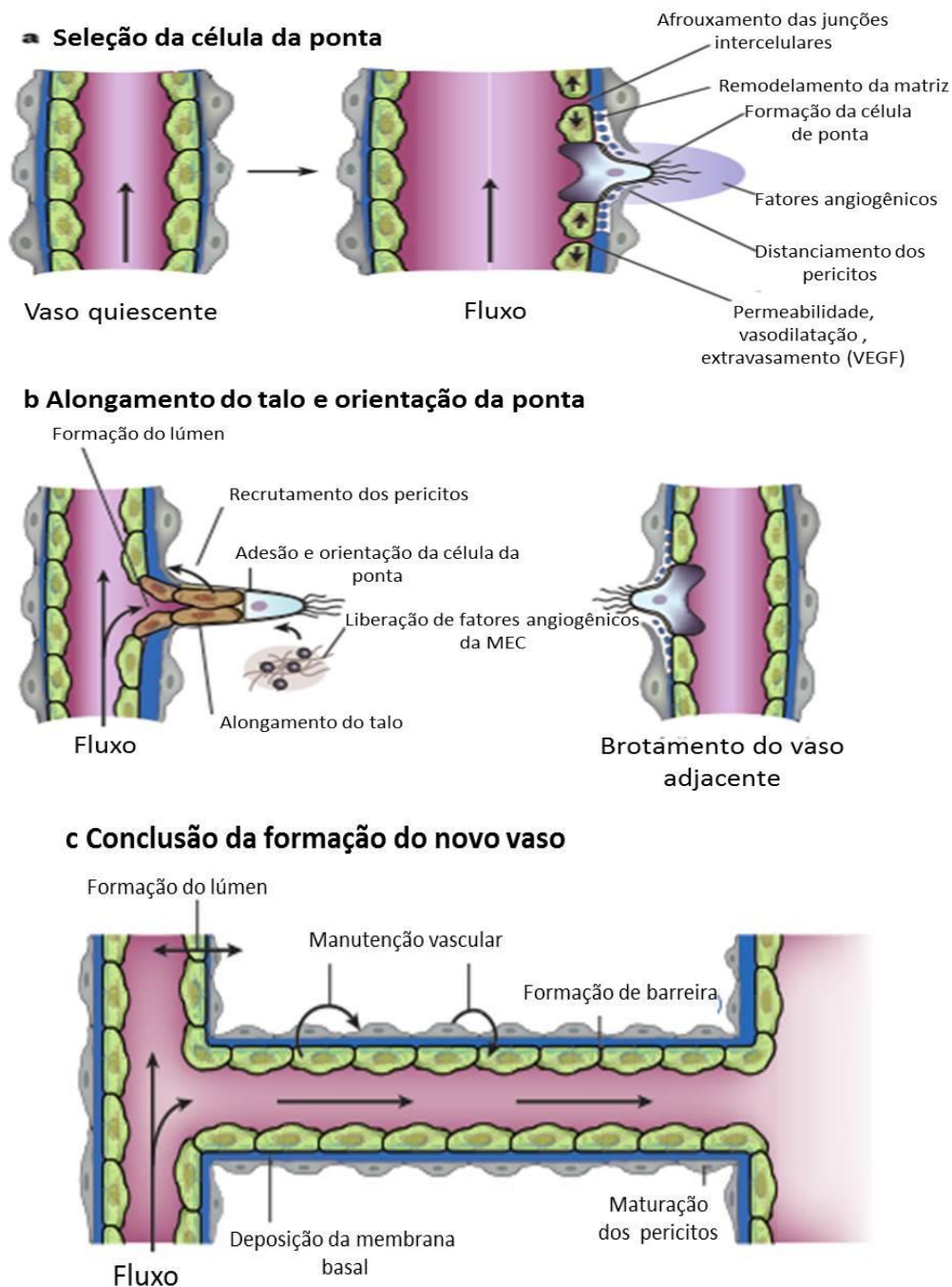


Figura 6 – Base molecular do brotamento de um vaso. Os passos consecutivos do brotamento de vasos sanguíneos são demonstrados. a Início do brotamento do novo vaso pela seleção da célula da ponta, separação dos pericitos, aumento da permeabilidade, todos eventos em decorrência do estímulo de fatores angiogênicos. b. A célula da ponta segue uma direção orientada por sinais de moléculas como epinefrinas, enquanto as células posteriores proliferam, alongam-se e formam o lúmen do vaso em formação. c. Após a fusão com um ramo vizinho, a formação do lúmen permite a perfusão do novo vaso, que é possível em decorrência da deposição da membrana basal, maturação dos pericitos, e produção de sinais de manutenção vascular. Fonte: Adaptado de Carmeliet; Jain (2011)

O fornecimento de fatores de crescimento, células-tronco e células progenitoras, são as ferramentas empregadas na angiogênese terapêutica. Na terapia celular, a resposta angiogênica pode ser induzida pela liberação de fatores parácrinos. Vários estudos demonstraram que o reparo cardíaco induzido após implantação de células-tronco, na sua maior parte, era consequência do efeito parácrino de fatores de crescimento secretados pelas células administradas, do que pela ação direta das próprias células. Isso deu uma grande importância ao uso dos fatores de crescimento no contexto da terapia celular e angiogênica. Para os fatores de crescimento, essa modalidade terapêutica pode ser estabelecida pela administração da própria proteína, ou genes que a codificam (DEVEZA; CHOI; YANG et al., 2012; REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016).

No que diz respeito ao miocárdio isquêmico, fatores de crescimento permitem recuperar miócitos em situação de risco de apoptose e/ou necrose, mediante hipóxia, através da formação de novos vasos que passam a suprir o tecido, controlando assim, alterações na estrutura e função cardíaca que poderiam culminar em insuficiência cardíaca. De fato, a angiogênese é o principal mecanismo de reparo cardíaco promovido por FC, desta forma, é também o mais investigado em estudos experimentais e ensaios clínicos para esta aplicação (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016).

Na angiogênese terapêutica, com proteínas exógenas, esses fatores solúveis são administrados individualmente ou em combinação objetivando interferir em processos endógenos, seja na redução da resposta inflamatória, controle da renovação da matriz extracelular, ou promovendo sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração de células (FORMIGA et al., 2012). Destaca-se, entre os fatores mais estudados quanto ao potencial angiogênico, o VEGF e o FGF (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016).

2.2.2.1 Papel do FGF-2 na angiogênese terapêutica

FGF-2, também conhecido por bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico), uma proteína de ligação a heparina, peso molecular de 16,5 kD e 146 aminoácidos, foi a primeira molécula angiogênica a ser identificada (CROSS; CLAESSEON-WELSH, 2001; LAHAM et al., 2000).

Ao isolar células endoteliais *in vitro*, independente da sua heterogeneidade quanto ao tipo de origem animal e das diferenças entre o endotélio microvascular e de vasos de grande calibre, vários estudos evidenciaram que FGF-2 e também FGF-1, induzem *in vitro* um "complexo fenótipo angiogênico" (Figura 7). Este fenótipo se assemelha a muitos aspectos de

processos angiogênicos *in vivo*, incluindo, modulação da proliferação de células endoteliais, migração, produção de proteases, expressão do receptor de caderinas e integrinas, e comunicação das junções-gap intercelulares (PRESTA et al., 2005).

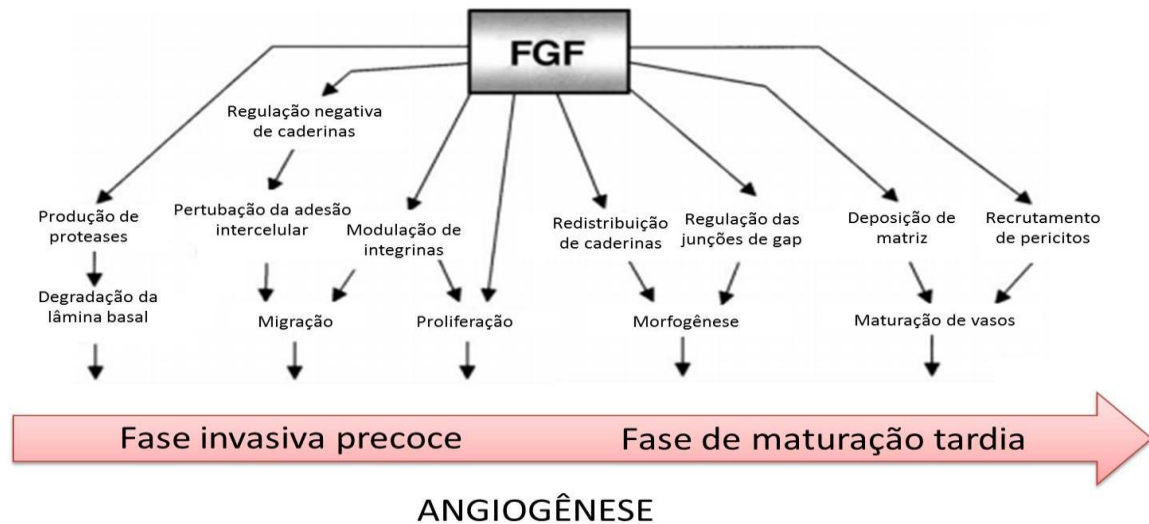


Figura 7 – Fenótipo angiogênico dos FGF's. Representação esquemática dos eventos desencadeados por FGFs em células endoteliais que contribuem para a aquisição do fenótipo angiogênico *in vitro* e para neovascularização *in vivo*. Fonte: Adaptado de Presta et al. (2005)

Vários estudos pré-clínicos evidenciaram a atividade angiogênica do FGF-2. Yanagisawa-Miwa e colaboradores (1992), por exemplo, demonstraram que a administração intracoronariana de FGF-2 em um modelo experimental de IM em cães, aumentou o número de capilares e arteríolas na região do infarto, o que colaborou com a melhora da função sistólica cardíaca e redução do tamanho do infarto nos grupos tratados com o fator de crescimento.

Outro trabalho evidenciou o aumento da perfusão do miocárdio isquêmico em um modelo de isquemia cardíaca crônica em porcos, o FGF-2 foi administrado por injeção intrapericárdica, e não houve evidências de efeitos adversos (LAHAM et al., 2000).

2.2.2.2 Papel do FGF-2 sobre outros mecanismos de regeneração cardíaca

Em adição a angiogênese, FGF-2 também propicia outros benefícios terapêuticos, incluindo o aumento da sobrevivência dos miócitos cardíacos e indução de diferenciação de células progenitoras cardíacas residentes em cardiomiócitos (CHU et al., 2013). Como no estudo desenvolvido por Rosenblatt-Velin e colaboradores (2005), que isolaram precursores

cardíacos indiferenciados, células progenitoras cardíacas residentes, expandiram e induziram a diferenciação em cardiomiócitos funcionais. Ao estudar o papel de FGF-2 na diferenciação celular *in vitro*, observaram que este FC regulou o processo de diferenciação. Assim, ainda sugeriram que FGF-2 poderia facilitar a mobilização e diferenciação desses precursores celulares *in vivo*, atuando no tratamento de doenças cardiovasculares.

2.2.3 Estudos clínicos com fatores de crescimento

Em decorrências dos benefícios da angiogênese terapêutica utilizando FC, bastante explorados em estudos pré-clínicos, em especial com VEGF e FGF-2, muitos ensaios clínicos foram desenvolvidos em pacientes com doenças isquêmicas do coração. Os primeiros estudos clínicos com FGF-2 parenteral foram realizados pelos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA. A hipotensão foi um efeito adverso identificado após a administração em bolus do FGF-2, na dose de 30 a 100 µg/kg, este efeito foi contornado por estudos subsequentes com a redução da dose terapêutica, acompanhada da recomendação de pré-hidratação (AVILES; ANNEX; LEDERMAN, 2003).

Em um ensaio de fase I, Laham e colaboradores (1999), demonstraram a viabilidade e segurança do tratamento de FGF-2 em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização coronariana (bypass coronário), demonstrada pela tendência a redução do tamanho do infarto e ausência de angina, nos grupos que receberam 100 µg de FGF-2, maior dose testada, e ainda, pela ausência de efeitos adversos. O mesmo grupo, seguiu no ensaio de fase II, onde o FGF-2 foi implantado concomitantemente a realização de cirurgia de revascularização do miocárdio, o tratamento resultou em alívio completo da angina e melhoras funcionais ao longo de três meses de acompanhamento, sugerindo o benefício da associação terapêutica (RUEL et al., 2002). Outro estudo de fase I avaliou a segurança e eficácia da administração intracoronariana de FGF-2 em pacientes acometidos por doença cardíaca isquêmica, e que não eram candidatos a cirurgias de revascularização. Como conclusão, a administração de FGF-2, iniciando na dose de 0,33 a 0,36 µg/kg pareceu ser segura e não apresentou efeitos adversos (LAHAM et al., 2000). Todavia, no estudo de fase II, a eficácia do tratamento se restringiu aos primeiros 90 dias, quando avaliado com 180 dias não demonstrou diferenças quando comparado com o grupo placebo (SIMONS, 2002).

Conforme os relatos acima, e segundo CHU e colaboradores (2013), os estudos clínicos com FGF-2 parecem ser seguros, porém sua eficácia ainda não está tão bem comprovada, esse quadro acompanha os demais ensaios com humanos para outros fatores angiogênicos, deste

modo, ainda não existe nenhum agente angiogênico aprovado pela FDA para uso humano. Os autores acrescentam, que o conhecimento ainda insuficiente sobre a neovascularização e resposta endógena do ambiente isquêmico, acompanhado da baixa bioatividade das proteínas após administração, são os principais fatores que contribuem para as frustrações dos ensaios clínicos.

Outra colocação pertinente e que pode estar relacionada com a limitação dos efeitos da terapia angiogênica, seja no âmbito genético, celular ou com FC, é que a maioria dos estudos pré-clínicos, foram realizados com animais jovens. No contexto clínico, deve-se considerar que pacientes acometidos por doença arterial coronariana, tem em sua maioria idade avançada e são acometidos por outras patologias, como diabetes e hipertensão arterial (LOSORDO; DIMMELER, 2004).

2.2.4 Entrega de fatores de crescimento no tecido cardíaco

Conforme já mencionado, uma série de fatores pode estar relacionados à resposta clínica limitada na terapia angiogênica com fatores de crescimento. A maneira como essas proteínas são entregues é um ponto que merece atenção, visto que, geralmente, após administração, o FC sofre rápida difusão, apresenta baixa biodisponibilidade e uma meia-vida curta *in vivo*. Concomitantemente, por muitas vezes em decorrência dos problemas farmacocinéticos citados, faz-se necessário, o uso de doses suprafisiológicas ou a administração de múltiplas injeções, deixando uma margem para a ocorrência de efeitos tóxicos, como o estímulo a angiogênese em locais indesejados. (DEVEZA et al., 2012). Sendo assim, e devido o alto potencial angiogênico dessas moléculas, é conveniente e também objetivo da terapia angiogênica, a manutenção de níveis locais altos do FC, ao mesmo tempo, que se almeja uma baixa distribuição sistêmica. Para isso, as tecnologias emergentes de entrega desses biofármacos, devem ser submetidas a avaliações contínuas (POST et al., 2001).

A administração dos FC como o FGF-2, pode ser realizada de forma sistêmica ou local. A administração sistêmica apresenta como vantagem a facilidade do acesso a via endovenosa, contudo esbarra na biodistribuição inespecífica óbvia e que pode acarretar em respostas tóxicas ao FC, que é um agente biológico pluripotente. Já a administração local promove um aumento da biodisponibilidade do FGF-2 no local de ação, enquanto reduz a exposição não específica (AVILES; ANNEX; LEDERMAN, 2003).

A figura 8 ilustra algumas das diferentes rotas de entrega de FC já testadas, a administração intravenosa, intracoronariana, intramiocárdia e perivascular. Técnicas baseadas

em cateter apresentam-se como uma alternativa viável e fácil na entrega dos FC pela rota intracoronariana, em contrapartida ocorre baixa deposição da proteína no miocárdio, fato destacado, por exemplo, por Laham e colaboradores (1999), que avaliaram a absorção e retenção de FGF-2 no miocárdio, resultando de apenas 0,9% e 0,05%, após 1 e 24 horas da administração, respectivamente. Métodos de administração local, como a intramiocárdica, possibilitam entregar o FC diretamente na região isquêmica, permitindo assim uma disponibilidade maior do fármaco no local de ação, bem como, uma retenção mais prolongada, desta forma, é uma das rotas preferidas (FORMIGA et al., 2012).

Entretanto, na maioria dos casos, nos estudos pré-clínicos que utilizaram esse método e inclusive evidenciaram a eficácia do tratamento, faz-se necessário à exposição do coração através de toracotomia para administração intramiocárdica, o que reflete na necessidade de intervenção cirúrgica, caracterizando a complexidade do método e também limitação sob certas condições (DAVIS et al., 2006; FORMIGA et al., 2010, 2014). Alternativamente, injeção endocárdica com um cateter intraventricular especializado pode entregar os FC dentro do miocárdio e as zonas do epicárdio podem ser acessadas por toracoscopia, isentando a necessidade de exposição cardíaca cirúrgica (FORMIGA et al., 2012).

As diferentes rotas de entrega dos fatores de crescimento visando o miocárdio isquêmico apresentam vantagens e desvantagens como mencionado acima, que de forma geral podem vim influenciar no sucesso da resposta terapêutica. Todavia, independente da via de administração, os fatores de crescimento na sua forma livre, ainda apresentam vida biológica curta, baixa estabilidade em plasma, e pouca especificidade aos órgãos-alvo, que são em partes, minimizados pela administração local, como já mencionado. Assim, novas tecnologias de formulação que sejam capazes de manter a bioatividade, aumentar a meia-vida e ainda controlar a liberação local dos fatores de crescimento no músculo cardíaco, são essenciais para utilização clínica dessas proteínas. Sob essa perspectiva, plataformas de liberação de moléculas bioativas, como sistemas micro e nanoestruturados, são descritos como estratégias promissoras na terapia cardíaca regenerativa utilizando FC (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA et al., 2016). Vários estudos pré-clínicos, tem demonstrado a restauração funcional e morfológica do coração através do uso de biomateriais como sistemas de entrega de fármacos que encapsulam ou incorporam os fatores de crescimento, conferindo aos mesmos, entre outras coisas, proteção contra degradação *in vivo* (CHERAGHI et al., 2017).

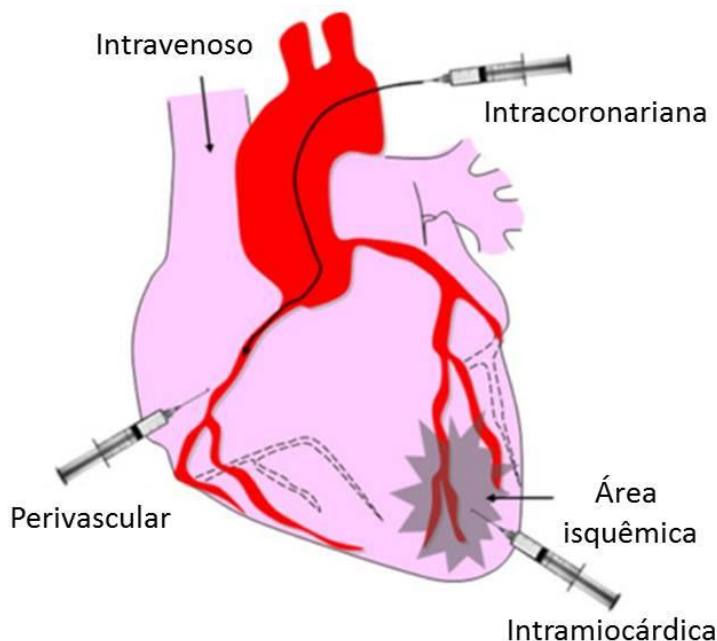


Figura 8 – Rotas de entrega de fatores de crescimento para o miocárdio. As proteínas podem ser direcionadas para o miocárdio por várias rotas e cada uma apresenta suas vantagens e desvantagens. Fonte: Adaptado de Formiga et al. (2012)

2.3 ESTRATÉGIAS DE FORMULAÇÃO PARA O DELIVERY CARDÍACO DE FATORES DE CRESCIMENTO: SISTEMAS MICRO E NANOESTRUTURADOS

2.3.1 Sistemas de liberação controlada de fármacos e biomoléculas

O controle da cinética de liberação apresenta como um dos principais objetivos a manutenção dos níveis do fármaco no sangue dentro da faixa terapêutica, para isso, os níveis devem ser mantidos entre a concentração efetiva mínima (CEM) e a concentração tóxica mínima (CTM). Medicamentos convencionais são comumente administrados através de múltiplas dosagens, mediante intervalos de tempo constantes. Contudo, a necessidade de reposições periódicas da medicação, implica na elevação da concentração do fármaco acima da CTM que pode ocasionar efeitos colaterais tóxicos e ainda refletir na não adesão do paciente. Sendo assim, é desejável o desenvolvimento de carreadores de fármacos que condicionem ao mesmo uma liberação controlada, aliada a uma baixa frequência de administração (Figura 9). Para isto, uma taxa de liberação constante do fármaco, caracterizada pelo perfil de liberação de ordem zero, é muito aplicada. Adicionalmente, ainda existem outros perfis de liberação de medicamentos prolongados, que se mostram oportunos em certas circunstâncias, como a liberação pulsátil ou a responsiva a estímulos (LEE;YEO, 2015).

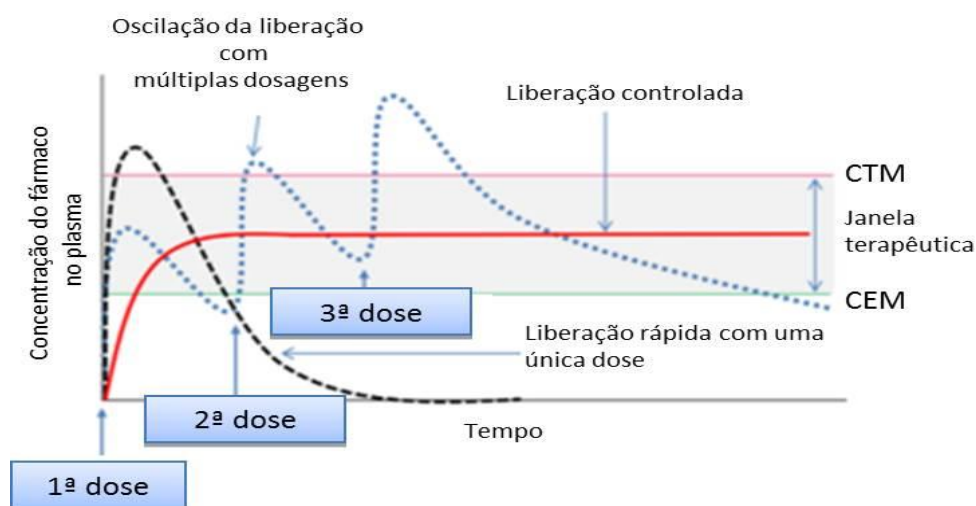


Figura 9 – Perfil da concentração do fármaco no plasma obtido com a administração de medicamentos convencionais em uma única dosagem (linha pontilhada preta), múltiplas dosagens (linha pontilhada azul) e na liberação controlada (linha vermelha). A faixa entre a CEM e CTM representa a janela terapêutica, quando o fármaco é efetivo sem causar toxicidade. Fonte: Adaptado de Lee; Yeo (2015)

Os avanços significativos em sistemas de entrega de fármacos, ocorridos nas últimas décadas, proporcionaram uma administração de medicamentos mais eficaz (SHAIK; KORSAPATI; PANATI, 2012). Dentre esses veículos, merece destaque, os sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos, que desde o início da década de 1970 atraem uma crescente atenção (SAFARI; ZARNEGAR, 2014). O emprego desses SLC implica no uso de abordagens interdisciplinares que combinam produtos farmacêuticos, ciências de polímeros, química de bioconjugados e biologia molecular (KULKARNI; YADAV; VAIDYA, 2011).

A liberação controlada implica na associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados, tenham a capacidade de controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação/entrega do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou conduzi-lo até o tecido em que este deve atuar. (KHAN, 2001). Assim os fármacos se acoplam a um sistema transportador, tal como nanopartículas (dispositivos do tipo matrix), nanocápsulas (dispositivos do tipo reservatório) e lipossomas, que modulam as características de liberação e de absorção do fármaco (VASIR; TAMBWEKAR; GARG, 2003; COUVREUR, 2013).

Os SLC de fármacos, micro e nanoestruturados, apresentam muitas vantagens em comparação a apresentações farmacêuticas convencionais. Entre elas, visam o direcionamento ativo para órgãos ou estruturas-alvo, consequentemente, minimizam efeitos colaterais indesejados e a atuação sobre tecidos vitais, ainda sobre essa mesma estratégia, aumentam a

biodisponibilidade do fármaco, possibilitando assim, a redução da dose terapêutica. Adicionalmente, oferecem proteção contra rápida degradação e depuração do fármaco no sangue e entrega controlada do mesmo no local de ação, todas essas características culminam em uma melhor adesão do paciente ao tratamento. (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016; WILCZEWSKA et al., 2012).

Os nanocarreadores apresentam ainda propriedades físico-químicas e biológicas otimizadas, que lhe conferem algumas vantagens, como a internalização celular facilitada em comparação a moléculas grandes, assim esses sistemas são utilizados com sucesso na entrega de compostos bioativos atualmente disponíveis. Muitos nanocarreadores já foram testados como sistemas de entrega de fármacos, tal como, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas magnéticas, dendrímeros e lipossomas (WILCZEWSKA et al., 2012). Os fármacos podem ser carregados de diferentes formas nos nanosistemas, sejam adsorvidos ou conjugados na superfície da partícula, encapsulados, ou dissolvidos na matriz polimérica. Mediante estas conformações/interações, os nanocarreadores podem proteger os fármacos de ambientes críticos, e ainda mascarar as propriedades biofarmacêuticas desfavoráveis do composto ativo, de forma que elas passam a ser substituídas pelas propriedades dos nanomateriais (BAMRUNGSAP et al., 2012).

2.3.2 Sistemas de liberação controlada associados a fatores de crescimento na regeneração cardíaca

Os benefícios máximos alcançados pela angiogênese terapêutica, mediada por FC, dependem do tempo de exposição e da capacidade de controlar a liberação temporal da proteína (DEVEZA et al., 2012).

Os SLC apresentam-se como uma alternativa promissora frente aos desafios da administração em bolus de proteínas para o reparo cardíaco após IM. Esses sistemas podem ser projetados para conferir proteção, sustentação, controle e entrega local da proteína no miocárdio isquêmico. Adicionalmente, certos biomateriais constituintes de alguns sistemas de “delivery” são capazes de isoladamente promover benefícios terapêuticos, atuando como suporte mecânico, assim minimizando a remodelação negativa do ventrículo esquerdo (AWADA; HWANGA; WANG, 2016).

Tendo em vista, o surgimento de inúmeros fármacos de natureza proteica e outros destinados a atuar sobre muitos processos celulares, desencadeou-se uma demanda pelo desenvolvimento de SLC de fármacos que possam agir diretamente sobre condições

fisiopatológicas. Esses sistemas inteligentes se distribuem na escala micro e nanométrica e, apresentam a capacidade de identificar e responder rapidamente a patologias, com uma atuação local, poupando células e tecidos saudáveis, assim oferecendo uma melhor qualidade de vida ao paciente (SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

Dentre os SLC, que possibilitam o “delivery” de FC para o coração, podem ser citados os sistemas de natureza polimérica, os hidrógeis, “scaffolds”, nano e microcápsulas poliméricas, nano e microesferas; e sistemas lipídicos, como lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas (Figura 10). Tais sistemas podem ser constituídos tanto por biomateriais (ex: quitosana, colágeno, gelatina, lipídeos e fibrina), quanto por materiais sintéticos (ex: poliéster, derivados de poliacrilamida) (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016).

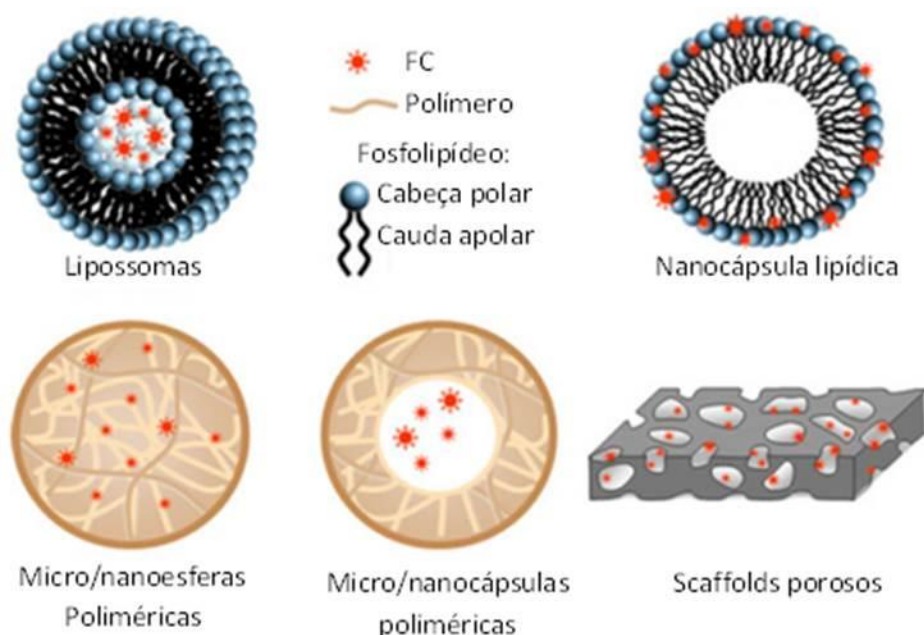


Figura 10 – Sistemas de liberação controlada de fármacos e fatores de crescimento. Representação esquemática de diferentes abordagens de carreamento de fármacos utilizados como plataformas para entrega de fatores de crescimento. Os pontos em vermelho representam os FC dispostos nos compartimentos de natureza hidrofílica dos SLC. Fonte: Adaptado de Formiga et al (2012)

Para Hastings e colaboradores (2015), os esforços e pesquisas voltados para regeneração do tecido cardíaco ao longo das últimas décadas, desencadearam inúmeras e potenciais estratégias de tratamento. Merecendo destaque para as estratégias de entrega avançadas de agentes terapêuticos, entre elas pode-se citar:

1. Terapia focada em biomateriais: Caracteriza a entrega de agentes terapêuticos, tais como células e fatores de crescimento em veículos constituídos por biomateriais, sendo os hidrogéis injetáveis e scaffolds, os principais representantes dessa categoria. Estes são administrados no miocárdio ou epicárdio e conferem uma liberação controlada ao FC, o que reflete na melhora da sua eficácia terapêutica; e ainda no caso da terapia celular, os biomateriais agem dentre outras maneiras, mimetizando a matriz extracelular, resultando no aumento da sobrevivência das células pós-transplante.
2. Encapsulação em sistemas nanoparticulados: Diz respeito ao carreamento de fármacos em sistemas nanoparticulados promovendo o aumento da biodisponibilidade do agente terapêutico no miocárdio isquêmico, ao mesmo tempo, que reduz a distribuição para outros tecidos.
3. Abordagens multimodais: Envolvem a entrega de mais de um agente terapêutico, como a associação de células e fatores de crescimento, aliados as abordagens com biomateriais e sistemas nanoparticulados, para atingir eficácia sinérgica.

2.3.2.1 Micro e nanopartículas poliméricas

Micropartículas poliméricas também vem sendo empregadas como SLC para viabilização da terapia com FC no reparo cardíaco. Esses sistemas se referem a partículas poliméricas na forma de esferas sólidas ou cápsulas, das quais, o fármaco é liberado por meio da degradação do polímero ou por difusão (LEE; YEO, 2015).

Nesse sentido, e ainda utilizando como rota de entrega à injeção intramiocárdica, pesquisas como a de Iwakura e colaboradores (2003), utilizaram microesferas de gelatina (tamanho médio = 10 μm) para encapsular FGF-2 (MicroG-FGF-2). Ratos receberam MicroG-FGF-2 ou solução salina, 4 semanas após indução cirúrgica de infarto. O tratamento induziu significativa angiogênese nas regiões isquêmicas e melhorou a função sistólica e diastólica ventricular esquerda do miocárdio em comparação ao grupo controle. Formiga e colaboradores (2010), encapsularam VEGF em microcápsulas de PLGA (micro-PLGA) e as detectaram mais de um mês após a administração no miocárdio dos animais infartados. Adicionalmente, a administração de VEGF contido nas micro-PLGA resultou em angiogênese, arteriogênese e remodelação positiva do coração caracterizada pelo aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo. Nenhum desses achados foi observado nos grupos que receberam VEGF livre e micropartículas vazias, concluindo que a veiculação do FC em um SLC foi essencial para o sucesso terapêutico. Mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa avaliou a administração individual e concomitante de IGF-1 e neuroregulina,

veiculados nas micro-PLGA. A terapia promoveu mitigação do ambiente hostil, recrutamento de células progenitoras cardíacas e proliferação de cardiomiócitos nos grupos tratados com as micro-PLGA contendo os FC (IGF-1, neurorregulina, IGF-1/neurorregulina). Contudo, não foram observados efeitos sinérgicos consistentes nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Ainda, a associação dos FC, demonstrou menor efeito do que a terapia individual com cada fator. Acredita-se que ambos os FC atuem sobre as mesmas vias de sinalização e assim podem competir, o que limitou o efeito combinado. Esta observação deve ser levada em consideração, quando forem planejados novos estudos com terapias combinadas de FC (FORMIGA et al., 2014).

2.3.2.2 Hidrogéis

Hidrogéis são produzidos a partir da reticulação química ou física de polímeros, criando assim, uma rede hidrofílica inchada (encharcada por água) pela água. Tais polímeros podem ser de origem sintética ou natural, neste último caso, por exemplo, formados por polissacarídeos, proteínas e seus derivados. Apresentam um perfil de liberação do tipo “burst” para as proteínas incorporadas e sustentam sua liberação por um estreito período de tempo (AWADA; HWANGA; WANG, 2016; RADHAKRISHNAN et al., 2014).

Visando a regeneração cardíaca, hidrogéis de diferentes origens vem sendo comumente utilizados como veículos de entrega de FC e implantados na superfície do miocárdio isquêmico de animais. Assim, FUGITA e colaboradores (2005) incorporaram FGF-2 em hidrogéis de quitosana e evidenciaram a atividade angiogênica do FC biologicamente ativo liberado do hidrogel. Awada, Johnson e Wang (2015), utilizaram um hidrogel de fibrina para a entrega de VEGF e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas humanas), este último ainda associado a um coacervado a base de heparina, e seus benefícios foram demonstrados em um modelo de IM de ratos. Os resultados demonstraram a melhora da função cardíaca ventricular esquerda e espessura da parede do ventrículo, estímulo a angiogênese, redução de fibrose e inflamação, quando comparado aos grupos controle, FC livre e veículo (hidrogel). Em outro estudo, foi hipotetizado que a associação terapêutica de dois FC, IGF-1 e HGF e a incorporação em um hidrogel de alginato maximizaria seus efeitos terapêuticos. O tratamento demonstrou potencial para induzir regeneração endógena no miocárdio, evidenciado pela indução da reentrada de cardiomiócitos no ciclo celular, e ainda estimulou angiogênese e redução de fibrose (RUVINOV; LEOR; COHEN, 2011). Um hidrogel responsivo a temperatura e pH foi associado a FGF-2 e implantado no miocárdio

infartado de ratos, essa estratégia promoveu, ao sétimo dia da administração, a retenção 10 vezes maior do FGF-2 em comparação a sua veiculação em salina. Como resultado, foi evidenciado melhora da angiogênese e função cardíaca (GARBERN et al., 2011).

2.3.2.3 Sistemas lipídicos

Awada, Hwanga, Wang, (2016), afirmam que além dos sistemas “delivery” citados que buscam a entrega de proteínas biologicamente ativas ao coração isquêmico, têm sido utilizados também nanocarreadores lipídicos como os lipossomas.

Lipossomas foram descritos pela primeira vez a mais de 50 anos atrás por Bangham e colaboradores, ainda na década de 1970, foram considerados potentes sistemas de liberação de fármacos e atualmente, integram pesquisas e aplicações clínicas no campo da nanomedicina (PATTON; CHUPIN; TORCHILIN, 2015). Os lipossomas têm demonstrado uma ampla variedade de aplicações em contextos clínicos, desde o tocante das áreas de diagnóstico, terapêutica e teragnóstica, essa última e mais recente aplicação, que é caracterizada pela coencapsulação de agentes de imagem e terapêuticos em uma única dispersão lipossomal (LILA; ISHIDA, 2017).

Lipossomas são vesículas constituídas de uma ou mais bicamada lipídica e um núcleo aquoso entre as bicamadas. Caracterizam-se como nanocarreadores versáteis, pois são capazes de encapsular, tanto moléculas hidrofílicas quanto lipofílicas, dentro do compartimento aquoso e inserido ou adsorvido na membrana lipídica, respectivamente (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; LEVCHENKO; HARTNER; TORCHILIN, 2012).

Lipossomas são compostos principalmente de lipídeos anfifílicos (fosfolipídeos, esfingolipídeos e glicolipídeos), juntamente com colesterol, além de proteínas de membrana e polímeros. Os constituintes dos lipossomas influenciam no comportamento dos nanosistemas em fluidos biológicos, como a presença do colesterol, que interfere na fluidez e na permeabilidade da membrana lipídica, bem como na estabilidade das vesículas (ARIAS, 2013).

Os lipossomas são classificados de acordo com seu tamanho, número de bicamadas lipídicas e composição. Aqueles que apresentam apenas uma lamela (bicamada) são chamados de unilamelares e ainda subdivididos, conforme o tamanho, em vesículas unilamelares pequenas (20-100 nm), vesículas unilamelares largas (> 100 nm), vesículas unilamelares gigantes (> 1000 nm). A presença de mais de uma lamela classifica os lipossomas em vesículas oligolamelares, para os tamanhos compreendidos entre 100-1000 nm

e vesículas multilamelares (> 500 nm). Conforme a composição, as vesículas são identificadas como lipossomas convencionais, lipossomas de longa circulação, lipossomas catiônicos, lipossomas sensíveis ao estímulo (pH, temperatura e campo magnético) e imunolipossomas (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015).

Lipossomas convencionais são constituídos de fosfolípidos e colesterol, e ainda podem ser compostos de lipídeos de carga positiva ou negativa, o que confere aos mesmos uma maior estabilidade em suspensão (BATISTA et al., 2007). Após a administração sistêmica, os lipossomas são reconhecidos como partículas estranhas e, portanto, estão sujeitas a fagocitose por células dos sistemas retículo endotelial (SRE) (LASIC, 1998). O reconhecimento e a incorporação das vesículas por macrófagos e proteínas plasmáticas resultam em uma meia-vida muito curta dos lipossomas convencionais, e consequentemente a redução da biodisponibilidade do fármaco. No entanto, a fagocitose de lipossomas pelo SRE pode ser uma abordagem interessante em algumas circunstâncias, como nas doenças que afetam os macrófagos (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015).

Os lipossomas de circulação prolongada têm a sua superfície funcionalizada com uma cadeia de polímero hidrofílico (por exemplo, poli (etilenoglicol) (PEG)), que estabiliza estericamente as vesículas e evita a interação com proteínas do sangue, células endoteliais vasculares e outras células (ARIAS, 2013). Moléculas de direcionamento podem ser utilizadas para aumentar o acúmulo local dos lipossomas ou promover a internalização por células-alvo. A estratégia de “targeting ativo” resulta da modificação da superfície do lipossoma por ligantes que se ligam e interagem com epítomos específicos de células ou tecidos (FORSSSEN; WILLIS, 1998; SAWANT; TORCHILIN, 2012). Quando anticorpos constituem os lipossomas e assim agem como moléculas de direcionamento, esses sistemas são classificados como imunolipossomas. (MASTROBATTISTA; KONING; STORM, 1999).

Ao longo dos anos, várias maneiras de formular lipossomas foram desenvolvidas e otimizadas. De forma geral, podem ser agrupadas em métodos de “massa”, consistindo na formação dos lipossomas a partir da transferência dos fosfolípidos de uma fase orgânica para uma fase aquosa; e métodos de filme, nos quais um filme lipídico é depositado em um substrato e posteriormente hidratado (PATIL; JADHAV, 2014). Nesse último caso, a hidratação do filme permite o inchaço das folhas lipídicas e, o auto-fechamento das vesículas que culmina na formação de lipossomas multilamelares. O tamanho e a morfologia das vesículas podem ser posteriormente alterados pela aplicação de energia mecânica ou sônica (Figura 11) (GARG; GOYAL, 2014).

As técnicas de preparo dos lipossomas, também podem ser classificadas de acordo com a forma de encapsulação do agente terapêutico em: técnica de carregamento passivo, na qual o agente encapsulado é adicionado antes ou durante a formação dos lipossomas, e técnica de carregamento ativo. Esta última ocorre da encapsulação do agente após a formação das vesículas (GARG; GOYAL, 2014; DUA; RANA; BHANDARI, 2012).

Para caracterizar as populações de lipossomas alguns parâmetros físico-químicos são essenciais. A determinação do tamanho médio das vesículas é uma delas, e inclui várias técnicas como a dispersão de luz estática e dinâmica, microscopia, cromatografia de exclusão de tamanho, fracionamento de fluxo de campo e centrifugação analítica (EDWARDS; BAEUMNER, 2006). A carga superficial é outro parâmetro avaliado nos lipossomas e é determinado pelo potencial zeta, o qual representa uma maneira simples e direta de medir o potencial eletrocinético em sistemas coloidais. O potencial zeta pode ser medido por microeletroforese, que apresenta como vantagem produzir uma imagem das partículas em movimento ou por dispersão da luz eletroforética, que se baseia na dispersão de luz dinâmica (HONARY; ZAHIR, 2013).

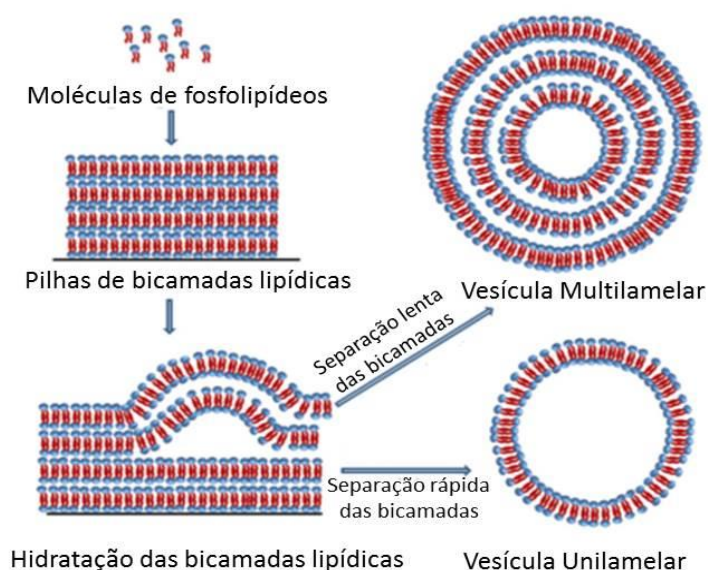


Figura 11- Auto-montagem dos fosfolipídeos envolvidos na formação de lipossomas. Após hidratação do filme lipídico, as vesículas são formadas conforme a força de agitação empregada, de forma mais lenta para as vesículas multilamelares e mais rápida para vesículas unilamelares, estas últimas geralmente se formam após a quebra das vesículas multilamelares por energia mecânica ou sônica. Fonte: Adaptada de Patil & Jadhav (2014)

2.4 LIPOSSOMAS: POTENCIAIS CARREADORES DE FATORES DE CRESCIMENTO

2.4.1 Lipossomas

Em decorrência da versatilidade dos lipossomas e seus benefícios para os agentes terapêuticos e de diagnósticos encapsulados, esses nanocarreadores estão sendo amplamente explorados no tratamento e diagnóstico de doenças cardiovasculares, seja pela encapsulação de fármacos, materiais genéticos ou agentes de contraste (BOWEY; TANGUAY; TABRIZIAN, 2012).

Assim, utilizando esses nanossistemas, Scott e colaboradores (2009), desenvolveram lipossomas conjugados com o anticorpo anti-P-selectina (Lipo-P) contendo VEGF para administração na veia caudal de ratos submetidos a um modelo de infarto. A entrega direcionada do VEGF contido nos lipossomas proporcionou uma melhora na função cardíaca acompanhada do aumento no número de vasos anatômicos (21%) e de vasos reperfundidos (74%), não ocorrendo melhoras significativas da função cardíaca para o grupo de animais não tratados, tratados com VEGF livre e sistêmico, lipossomas sem direcionamento (sem anti-P-selectina) e imunolipossomas vazios. Outro estudo foi realizado por Tang e colaboradores (2014), que também utilizaram Lipo-P para carrear VEGF, porém neste caso, em combinação com o transplante de células-tronco mesenquimais (CTMs). A baixa sobrevivência de CTMs transplantadas em modelos experimentais de IM é associada com um baixo suprimento sanguíneo. Assim, eles hipotetizaram que a entrega direcionada de VEGF lipossomal induziria angiogênese e viabilizaria a terapia com CTMs. Como resultados, o tratamento combinado de VEGF e CTMS aumentou a densidade dos vasos sanguíneos (80%), reduziu a deposição de colágeno (33%) e demonstrou maior atenuação da perda da função cardíaca do que a terapia isolada.

Em um estudo mais recente, Hwang e colaboradores (2016), encapsularam um peptídeo análogo à sequência de aminoácidos do epítipo funcional dominante do VEGF em lipossomas, e avaliaram a eficácia do peptídeo encapsulado em um modelo de IM de ratos. Como resultado o tratamento proporcionou melhora nos defeitos de perfusão miocárdica e aumento da densidade vascular.

2.4.2 Lipossomas no delivery cardíaco

Algumas pesquisas vêm explorando o emprego de lipossomas para fins terapêuticos e diagnósticos no IM. Assim, como exemplo, lipossomas convencionais e marcados foram utilizados na identificação e quantificação de macrófagos/monócitos em camundongos infartados (NARESH et al., 2012); lipossomas contendo fostatidilserina moldaram a resposta anti-inflamatória pós-IM em roedores ao mimetizar células apoptóticas, minimizando o tamanho da cicatriz de colágeno e prevenindo a remodelação ventricular negativa (HAREL-ADARET et al., 2010); também, imunolipossomas (IL) funcionalizados com o anticorpo antimiosina de cães, proporcionaram a sobrevivência ($> 50\%$ do que o controle) de células em um modelo *in vitro* de hipóxia de cardiomiócitos. Adicionalmente, ainda ofereceram cardioproteção quando administrados, concomitantemente com a oclusão da artéria coronária em ratos. Estes resultados sugeriram que os IL promoveram um mecanismo de “Plugue e selagem”, pois além de promover o “plugue” diretamente nos pontos de lesão celular, também evitaram a morte dos cardiomiócitos ao selar as lesões da membrana, graças a uma possível fusão dos lipossomas com a membrana celular. (KHAW; DA SILVA; HARTNER, 2007; KHAW et al., 1998).

Com relação à encapsulação de agentes terapêuticos, imunolipossomas acoplados a um ligante específico para troponina I, outro alvo cardíaco, foram empregados no encapsulamento de um oligonucleotídeo antítese de um RNA de interferência (RNAi) e assim, promoveram o silenciamento do RNAi, que levou ao alívio de arritmias em ratos infartados (LIU et al., 2014). Em outro estudo, Okuda e colaboradores, (2016), investigaram a distribuição de lipossomas contendo FK506 (Lipo-FK506), um fármaco imunossupressor, e seu efeito na função cardíaca em um modelo experimental de miocardite autoimune de ratos. Ocorreu acúmulo dos lipossomas nas regiões de inflamação do miocárdio, enquanto não houve retenção nas porções do músculo saudável. Ainda, o tratamento com Lipo-FK506 suprimiu a expressão de citocinas inflamatórias, e reduziu inflamação e fibrose no miocárdio quando comparados ao grupo tratado com FK506 livre.

Mediante o exposto, constata-se que os lipossomas configuram-se como SLC para o delivery cardíaco, seja para fins diagnósticos ou terapêuticos, contudo ainda é pequeno o número de pesquisas abordando o seu uso como carreadores de fatores de crescimento para a regeneração cardíaca, embora os estudos tenham obtido êxito em suas abordagens. Desta forma, é encorajador e inovador explorar o uso desses nanocarreadores na veiculação de FGF-2 em modelos experimentais de IM.

3 RESULTADOS

3.1 ADVANCED LIPOSOME-MEDIATED CARDIAC DELIVERY OF BIOPHARMACEUTICALS

Laís de Macedo Ferreira Santos¹, Helenita Costa Quadros², Rafaela de Siqueira Ferraz-Carvalho¹, Fabio Rocha Formiga^{2,3*}, Nereide Stela Santos-Magalhães^{1*}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil;

²Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador/BA, Brazil;

³Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brazil.

Corresponding Authors:

Prof. Nereide Stela Santos-Magalhães, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife/PE, Brazil. Tel: + 55 81 21268587; Fax: +55 81 21268485. E-mail: nssm@ufpe.br;

Dr. Fabio Rocha Formiga, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP 40296-710, Salvador/BA, Brazil. Tel. +55 71 3176 2211. E-mails: fabio.formiga@bahia.fiocruz.br; fabio.formiga@upe.br.

* Both authors contributed equally to this manuscript.

Abstract

Myocardial infarction (MI) one of most important manifestation of ischemic heart disease worldwide. Emerging and innovative strategies for cardiac regeneration include administration of biopharmaceuticals such as proteins and peptides, growth factors, genes, RNA interference (RNAi), micro RNA (miRNA) and stem cells. However, issues associated with myocardial drug delivery have been the limitation of these approaches. In addition, the short biological half-life, low plasma stability and low specificity reduce the chance to deliver biopharmaceuticals to the myocardium in an efficient and reliable manner. In turn, liposomes are thought to be safe and useful carriers in the field of drug delivery systems. Liposomes are nontoxic and biodegradable, but the potential of liposomes for cardiac targeting of biopharmaceuticals has not been fully explored. This review details the strategies for the targeting of liposomes to heart, more specifically to the infarcted myocardium, for both passive and active drug delivery. This review also evidences the feasibility of liposomal formulations for cardiac regeneration.

Keywords: Liposomes; myocardial infarction; biopharmaceuticals; cardiac repair; targeting; cardiac delivery.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) have high rates of mortality and morbidity all around the world. Among CVD, myocardial infarction (MI) is the most significant manifestation of ischemic cardiomyopathy, accounting 15.6 million global deaths per year [1]. In order to mitigate the damage caused by injury, current treatments for MI including opioids, nitrates, beta blockers, antiplatelet agents, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors [2], beyond revascularization treatments such as heart bypass and the percutaneous coronary intervention called angioplasty [3]. Although conventional treatment regimens can, to a certain extent, reduce the pathological burden of CVD, they not able to repair or regeneration of damaged ischemic myocardial tissue [4].

Under this scenario, new therapeutic strategies for CVD has emerged, namely, cell therapy, gene therapy and the use of growth factors. Despite their therapeutic potential, critical issues related to short biological half-life, low tissue retention and lack of specificity have been minimized by using drug delivery systems. These include polymeric micro- and nanoparticles, nanofibers, hydrogels and others. Intensive research has been dedicated to deliver genes and proteins into micro- and nanoparticles [5,6,7]. Hydrogels and other biomaterials have also been investigated to delivery and recruitment of stem cells towards cardiac regeneration [8,9,10]. Lipid-based drug delivery systems have been also considered for CVD, including solid lipid nanoparticles [11]. and liposomes [12]., this latter being the focus of this review.

The history research of liposomes for CVD begins with the pioneer work of Caride and Zaret at the end of the 1970s, demonstrating the potential of liposomes as vehicles for drug delivery to infarct zones [13].

Liposomes have demonstrated capacity to deliver several materials such as low molecular weight drugs and biopharmaceuticals, including imaging agents, peptides, proteins,

and nucleic acids. The versatility of lipid systems for size, their release kinetics and targeting properties of liposomes can be refined and this ability seems to be essential to deliver therapeutics precisely to the infarcted heart [14].

Therefore, this manuscript seeks to review strategies to target the myocardium using liposomes, with focus on their safety and efficacy in biopharmaceutical-based cardiac regeneration.

2. Global impact of ischemic disease

CVD are the leading cause of death in worldwide, accounting for 17.3 million deaths per year, a number that is expected to grow to more than 23.6 million by 2030 [15,16]. The global impact has increased during the past decade by 12.5% and now this public health problem comprising for approximately 31% of all deaths [17].

According to WHO, CVD include a set of heart diseases and blood vessels disorders, consisting of coronary heart diseases, cerebrovascular diseases and other circulatory diseases [18]. In the US population, CVD account for nearly 801,000 deaths per year, *i.e.* one out of every three deaths [19]. Due to the high impact, a report by the National Project on the Cost and Use of Health Services (2012) showed expenditures related to CVD and stroke reaching \$316.6 billion, more than any major diagnostic group [20].

In Europe and European Union (EU), CVDs causes more than 3.9 million and over 1.8 million of deaths per year respectively, accounting for almost half (45%) of all deaths in Europe and over more one-third (37%) in EU. In 2015, more than 85 million people in Europe were living with CVDs and almost 49 million people were living with CVDs in the EU [21].

In 2006, CVDs-related expenditure in EU was estimated in €169 billion [22] and now these costs increased to €210 billion a year [21].

CVDs are also a major cause of death among men and women in Brazil, with impact in all geographic regions. According to the Information Technology Department of the Brazilian Health System, ischaemic heart disease (IHD) is the first cause of death accounting 100,000 deaths per year with specific mortality rate of 53.8 deaths for every 100,000 inhabitants [23]. This impact corresponds to healthcare costs about 1.74 % of Brazil's GDP [24]. These significant health and economic burden reflects the high cost of CVD treatment in both developing and developed countries. Therefore, there is urgent need for the development of new treatments based on safe, effective, affordable, and low-cost technologies from basic to patient-oriented research.

3. Physiopathology of myocardial infarction

MI results from reduced blood supply to the heart muscle. According to the degree of ischemia, this process can lead to the substantial death of cardiomyocytes [25,26]. Usually, atherosclerosis process is the main cause of MI, triggering to the thrombosis stage and obstruction of the blood flow [27]. **Figure 1** shows the events related to physiopathology of MI.

After an ischemic event, necrotic and apoptotic processes occur in cardiac cells and lead to a contractile dysfunction [28]. In parallel, a quick migration of cytokine and chemokine takes place besides high expression of adhesion molecules. An intense inflammatory response reaches the infarcted zone and then proteases are activated leading to cardiac extracellular matrix (ECM) degradation. Thereafter, the remaining necrotic cardiomyocytes and matrix are removed by phagocytosis [29].

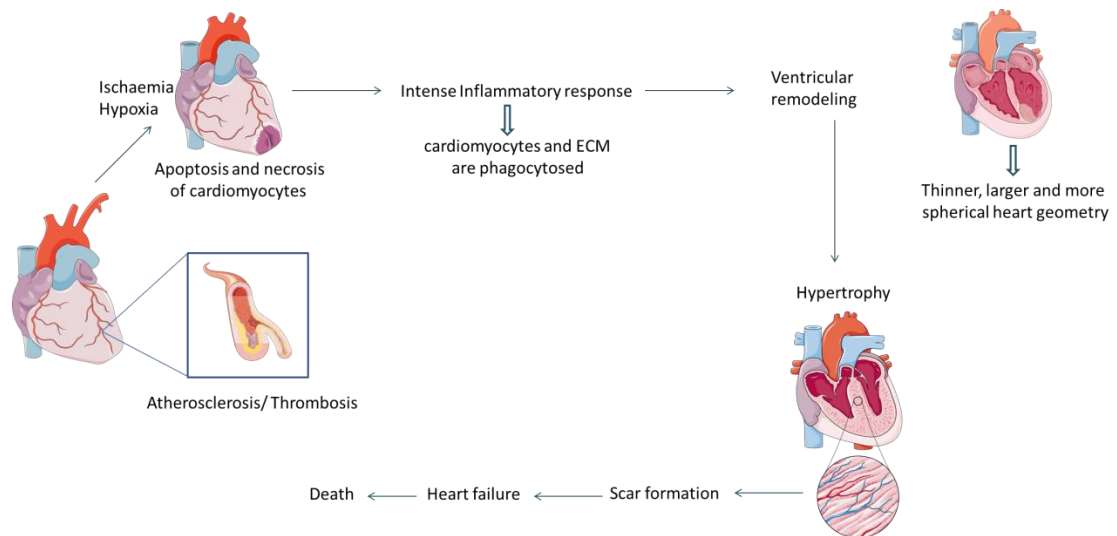


Fig. 1 Pathophysiology of myocardial infarction. Atherosclerotic and thrombosis trigger ischemia and consequent local hypoxia. Consequently, apoptotic processes and necrosis lead the death of cardiomyocytes. In parallel, an intense inflammatory response is initiated in the infarct zone, proteases degrade the extracellular matrix that is subsequently phagocytosed by macrophages, together with necrotic cardiomyocytes. After molecular and cellular changes, heart initiates a ventricle remodeling process which conducts in wall thinning and ventricular dilatation. Also, non-infarcted myocardium hypertrophy. Finally, occur the generation of a collagen scar in the infarcted area, and the pathophysiology process leads to risk of heart failure and death.

After an ischemic event, necrotic and apoptotic processes occur in cardiac cells and lead to a contractile dysfunction. An intense inflammatory response reaches the infarcted zone and then proteases are activated leading to cardiac extracellular matrix (ECM) degradation. Thereafter, the remaining necrotic cardiomyocytes and matrix are removed by phagocytosis

While the biochemical events and molecular alterations occur at ECM and cell level, the myocardium triggers a left ventricle (LV) remodeling process. Structural changes conduct in

wall thinning and ventricular dilatation. As consequence, ventricular architecture alterations increase the wall stress, triggering the non-infarcted myocardium hypertrophy [30]. After this stage, the healing and repair processes are activated with the generation of a collagen scar in the infarcted area [3].

The modifications in ventricular geometry and structure promote the development of mechanical complications and subsequent progressive ventricular remodeling with risk of heart failure (HF) and death [31].

4. Therapies for myocardial infarction

4.1 Conventional therapies

Each day, patients with chest pain are admitted to hospitals and this scene is replayed millions of times in different countries around the world. Most deaths caused by MI occurs in first hours of disease appearance, being 40 to 65% in first hour and, approximately, 80% in first 24 hours. In this way, prehospital care is adopted in order to reduce hospital mortality, as medicines for pain, nitrates, anti-coagulants, beta-blockers, antiarrhythmic, in others [32]. The emergence of these practices lead a decrease on symptoms onset until first medical contact, leading to more timely access to reperfusion therapy [33].

Besides of pharmacologic therapies, angioplasty and surgical revascularization are interventional approaches with important functional outcomes. Also, left ventricular assist devices and therapeutic approaches to risk factors for atherosclerosis, late ventricular remodeling and cardiac arrhythmias are adopted [3]. These approaches seek to restore cardiac function or limit the progression of post-ischemic pathophysiological effects. However, they do not produce long-term benefits.

For the most severe cases, heart transplantation is a complex procedure available for patients that fit all immune compatibility criteria. In the last decade, between 3,600 and 3,850

heart transplants have been registered every year worldwide [34]. Unfortunately, the demand does not contemplate the availability of donors and complications resulting from immunosuppressive treatment get worse the scenario [35,36].

Taken together, drugs, reperfusion procedures, and vascular and bypass surgeries conducted to greater survival and prognosis in patients suffering MI. However, most patients who are dependent of these therapies to survive presents substantial LV injury. This may result on development of HF, which arouses concern due increased pool of MI survivors with reduced quality of life [3].

Despite their benefits, the aforementioned treatments do not achieve myocardial regeneration [37]. Therefore, the development of new therapies able to mitigate the adverse LV remodeling post-MI is crucial to patient quality of life and survival [38].

4.2 Emerging therapies

Advances on biotechnology research and development have led to increased quality and quantity of biopharmaceuticals for a wide range of diseases. For example, a great number of peptide therapeutics are currently being evaluated in clinical trials [39]. Besides traditional peptide design, a range of peptide technologies has been emerging that represent the opportunities and future directions within the peptide field [40,41].

In particular, novel and emerging therapies using biopharmaceuticals have been investigated aiming repair and regeneration of diseased myocardium. These biodrugs might be produced by secretome, which is a generalized term referring to the total byproduct produced and secreted by cells, including proteins, growth factors, cytokines, chemokines, microRNAs and similar soluble factors [42].

Intensive research has resulted in considerable advances in the discovery of therapeutic targets related to non-invasive strategies for cardiac repair and regeneration. To

date, a number of growth factors have been evaluated in clinical trials, which have demonstrated safety and potential efficacy for the treatment of heart disease [5,43,44,45].

Improvements in cardiac function after MI have been achieved by the delivery of growth factors that have restored cardiac function [46]. These proteins have been used in the context of heart disease due to restorative functions and distinct mechanisms of cardiac repair, such as angiogenesis [47] (Rodness et al., 2016), proliferation and migration [48] (Lakshmanan et al., 2016), and regeneration [49] (Izadifar, Kelly and Chen, 2016).

Many growth factors play important roles in the protection of cardiomyocytes and reduction of fibrosis in infarcted regions. Vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor beta (TGF- β), endothelin and epiregulin, neuregulin 1 (NRG-1), basic fibroblast growth factor (bFGF), among others, have been reported [42,45,50,51].

Nguyen and co-workers [52] demonstrated reduced left ventricular ejection fraction and collagen-rich scar formation in swine infarcted heart when treated with mesenchymal stem cells (MSC)-derived growth factors. This MSC supernatant contained epiregulin, endotheline, FGF-16, IL-1 α , secreted frizzled related protein 1 and 4 (sFRP-1 and sFRP-4), tissue inhibitor of matrix metalloprotease-2 (TIMP-2) and VEGF, which possess functional and protective effects in heart post-MI.

In other strategies, researches have demonstrated that thymosin β 4, a peptide involved in most biological functions, can promote cardiac cell migration, activate proliferation of cardiac fibroblasts and endothelial cells, and promote neoangiogenesis in a rodent MI model [53]. In another study now involving coenzyme Q10 encapsulated in nanoparticles, this coenzyme led to improved heart function, and it might be attributed to its antioxidant nature, ability to minimize inflammation and improve endothelial function [54].

Recently, the use nucleic acid, either by gene delivery or interference RNA (RNAi), that encoding and block the translation of an interest protein, respectively, has achieved

visibility. Gene therapy with gene delivery promotes a longer supply of therapeutic protein, while shows versatility with RNAi delivery by upregulated or downregulated of proteins aiming particular response [55].

Additionally, microRNAs (mirRNAs) such as miR-34, miR-210, miR-21, miR-15, miR-214 and miR-1 have been identified as protective and regulatory players in the damaged myocardial tissue with significant roles on cell viability, apoptosis, proliferation and hypertrophy [56]. Huang and colleagues [57] reported the first evidence of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) encapsulated in synthetic chemically modified mRNA (modRNA). This new approach could potentially target an early temporal window for cytoprotective intervention in the setting of acute MI. Cytoprotective therapy using IGF-1 demonstrated *in vivo* efficacy at 24 hours post-MI [57].

Cardiac regenerative therapy using stem cells has also demonstrated significant potential, especially preclinically [8,43,57]. Basic research and clinical trials suggest that cell-based therapies can improve cardiac function, and the implications of this for heart regeneration could result in clinical translation. Different cell types have been investigated, including embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, bone marrow and other adult tissue-derived mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells, endothelial progenitor cells and other extracardiac cells. Thus, stem cells present great therapeutic value as result of potential mechanisms of action, namely, differentiation into cardiomyocytes, endothelial cells or smooth muscle cells, and paracrine effects [58,59]. Consequently, injection or mobilization of stem cells could recover or improve cardiac function [37,60,61].

5. Cardiac delivery challenges of biopharmaceuticals

Mechanisms of growth factor biopharmaceutical-induced tissue regeneration are a great advance for treatment of MI. However, the therapeutic potential of these agents is limited by

their short *in vivo* half-life, low plasma stability and low specificity to target organs [5,6,7]. For example, while growth factors can stimulate many important cellular processes needed for healing, their stability and bioavailability are compromised due to the enzymatic degradation or rapid clearance [38].

Cardiac delivery of drugs or biopharmaceuticals by bolus injection requires either high doses or multiple applications to be effective, which can lead to unwanted effects and low patient compliance. Many clinical trials applying bolus delivery of angiogenic proteins showed little or no significant therapeutic benefit [61]. In this sense, the limited success achieved by protein-based angiogenic therapy may partially be related to the mode in which growth factors are delivered. Several delivery routes have been evaluated to overcome these challenges, including intravenous, intracoronary, intramyocardial, and perivascular administration [5,62]. Indeed, the delivery route represents a critical factor in determining protein deposition in the myocardium [5].

Intravenous infusions are appealing in light of practicality, but they can provide side effect due to pluripotentiality of GF [63]. Already intracoronary delivery is easily performed using catheter-based techniques, however can result in low levels of protein deposition in the myocardium. This case was observed by Laham et al. [62], which FGF-2 intracoronary delivery resulted in myocardial retention only 0.9% and 0.05% after 1 and 24 hours of administration, respectively [62]. While site-specific methods, such as intramyocardial delivery can efficiently achieve desired areas in the myocardium and increase the therapeutic agent bioavailability and, while decreasing non-specific exposure [63].

Besides the route of administration, the mode in which biopharmaceuticals are formulated represents another critical aspect for cardiac delivery. Lessons from experimental research and clinical trials indicate no availability of proteins on myocardium after bolus injection [64,65]. This is a critical issue because an effective therapy requires local

administration and continuous exposure of protein. Therefore, research on vehicles and carrier systems for delivery of biopharmaceuticals into the myocardium is pursued. These approaches might be able to maintain bioactivity, increase half-life, and control the local release of active agents in the heart tissue.

The local bioavailability of proteic drugs and small molecules in the myocardium is also related with a safe and tolerable therapy [5]. Cell function control mediated by GF is achieved through activation of specific signalling pathways that act on different biological routes and organs [8]. Many biopharmaceuticals with pleiotropic activities can induce side effects and hence endanger therapy success. For example, some angiogenic peptides cause undesired vascularization in non-target sites when delivered in an uncontrolled manner [5].

Regarding gene therapy in the treatment of ischemic heart disease, there are problems limiting its clinic application, such as the long-term safety of clinical trials, difficult in standardizing groups of patients involved in the assays, beyond dose-related issues and gene transfection efficiency [66].

A study development by Schawarz and colleagues [67] identified formation of angiomas after intramyocardial delivery of plasmid DNA encoding vascular endothelial growth factor (phVEGF165) in rats infarcted heart [67]. The choice of the appropriate dose is very important and should be considered a key point of the therapeutic strategies adopted, in this cited study the high dose of phVEGF165 (500mg) was administered. Such issue can be circumvented by use of biomaterial systems which control release rate of the encapsulated agent for an prolonged period of time, avoiding excessive high dose exposure by bolus administration and consequent side effects [55].

Critical issue for cell-based therapy is determining the optimal mode and route of delivery. Hou et al. [68], studied retention of peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) after delivery by different routes in an ischemic swine model. Intramyocardial (IM) delivery

resulted in the highest retention rate (11%), while intracoronary (IC) or intravenously (IV) delivery were $\sim 3\%$. High number of cells migrated to pulmonary circulation and accumulated in the lungs, with rates of 26 % (IM), 47% (IC) and 43% (IV). In this case, for all delivery modality the majority cells in not retained in the heart, which is a limitattion of cell therapy and may have significant clinical implications in non-target organs [68].

Refined strategies of combining advanced biomaterials and drug delivery systems for cytokines and growth factors might allow control of the microenvironment of the cells. Still, these approaches could improve cell retention, survival and functional integration of transplanted cells in the hostile microenvironment of injured myocardium [8,6,9,69,70]. Therefore, the delivery of growth factors to heart has been experimentally mediated by systems of polymeric nature, hydrogels, scaffolds, nano and polymeric microcapsules, nano and microspheres; and lipid systems such as liposomes and solid lipid nanoparticles [44].

Therefore, novel technologies able to efficiently deliver biopharmaceuticals in the heart tissue may increase the translational value of peptides, growth factors, genes, nucleic acids and stem cells in the setting of cardiac regeneration. In the field of nanomedine, nano-sized drug carriers can offer distinct pharmacokinetic properties, such as specific drug delivery, controlled release, high metabolic stability and long-lasting action [71,72]. Collectively, these attributes can improve the bioavailability and therapeutic index of drugs and biopharmaceuticals in a myriad of diseases, including CVD.

6. Liposomes as cardiac carriers for biopharmaceutical

The endothelial barrier ensures vascular homeostasis by flow control of macromolecules, acting as immune surveillance, in addition to promoting mechanisms to control local infections by fibrin deposition. On the other hand, uncontrolled vascular permeability can be initiated by many stimuli, such as inflammatory and ischemic processes in the heart, which leads an uncontrolled or prolonged vascular leakage [73].

Under this scenario, nano-sized carrier systems such as liposomes may exhibit preferential accumulation in the leaky vasculature resulting from MI [74,75]. Also, these systems can be designed to specifically target injured regions [76,77,78,79].

Particularly, liposomes has been explored in the treatment and diagnosis of cardiovascular diseases, either by encapsulation of drugs, genetic materials or contrast agents [80]. Aiming the myocardial targeting of biopharmaceuticals, a number of studies assessing liposomes have been considered in this review, which will be presented in the following sessions.

6.1 Liposomes properties for infarcted myocardium targeting

Liposomes are lipidic vesicles constituted of a single or more lipid bilayers and an aqueous core between the bilayer. They can incorporate both hydrophilic and lipophilic molecules, located in the aqueous compartment and inserted or adsorbed into the membrane lipidic, respectively [81]. Lipids used as component of liposomal formulations are mostly made of amphiphilic lipid (phospholipids, sphingolipids and glycolipids) along with cholesterol, membrane proteins or polymers. The constituents influence the behavior of nanosystems in biological fluids, such as the presence of cholesterol, which interfere with fluidity and permeability of lipid membrane, as well as the stability of the liposomal dispersion [82].

Classification of liposomes is based on their size, number of bilayers and composition. Liposomes having only one lamella are called unilamellar and are subdivided by size into small unilamellar vesicles (SUV 20-100 nm), large unilamellar vesicles (LUV > 100 nm), giant unilamellar vesicles (GUV > 1000 nm). The presence of more than one lamella classifies liposomes in oligolamellar vesicles (OLV 100-1000 nm) and multi-lamellar vesicles (MLV > 500 nm) (**Figure 2**) [83].

Liposomes size can be easily shaped by liposome size reduction techniques, such as sonic or mechanical energy [84,85]. Particularly, in the targeting liposomes to cardiovascular system, size is a characteristic to be considered in the improvement of these nanosystems for delivery of bioactive molecules [80].

After systemic administration, liposomes are recognized as foreign particles and, therefore, are subject to phagocytosis by cells of the reticulum-endothelial system (RES), liver and spleen composed this system [86]. The recognition and incorporation of vesicles by macrophages and plasma proteins, lead to a very short half-life and reduce drug distribution of the sites of action. In addition, RES less recognizes small liposomes than larger liposomes. However, liposome uptake by RES can be an interesting approach in some circumstances, as in diseases affecting macrophages [83].

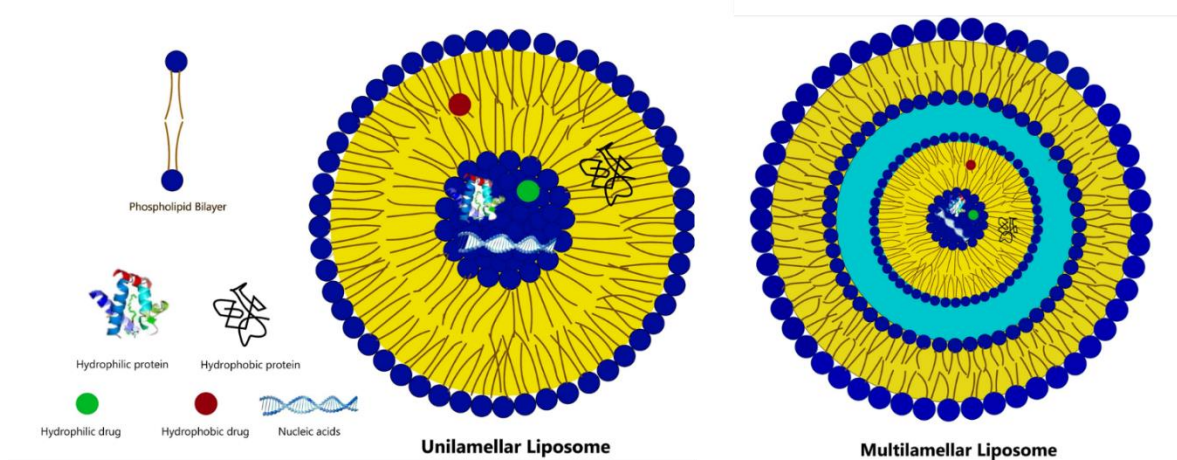


Fig. 2 Liposome features based on their number of bilayers for delivery of drugs or biopharmaceuticals

In view of the role of macrophages in the pathophysiology of MI, macrophage-targeted liposomes have been developed aimed at therapeutic and diagnostic applications. In the context, Naresh and colleagues [87] quantify and label macrophages and monocytes infiltrate infarcted myocardial with larger liposomes by magnetic resonance imaging. Contrast

agents labeled-liposomes ($0.5 \pm 0.25 \mu\text{m}$) size was selected for enhanced spleen uptake. As result, macrophages and monocytes recruited to infarct zone had maximum quantification on day 4 compared on day 1 e 7 after MI, corroborating with prior histologic studies.

Regarding still classification of liposomes, based on their composition, vesicles are identified as conventional liposomes, long-circulating liposomes (stealthy liposomes), cationic liposomes, stimuli-sensitive liposomes and immunoliposomes [83].

As opposed to conventional liposomes, long-circulation liposomes have their surface functionalized with a hydrophilic polymer chain, such as poly (ethylene glycol) (PEG), that offer sterically stabilizes vesicles, repulsion between the nanosystem and blood components, and avoids interaction with blood proteins, resulting in a smaller capture by the reticulum-endothelial system (RES) and in a time delayed circulation [82,88].

In a pioneer work, Torchilin and colleagues [89] evaluated the factors influencing targeted accumulation liposomes in the rabbits infarcted myocardium. Size, presence or absence of PEG and infarct-specific antibody on the liposome biodistribution in vivo were considered. Small liposomes (120-150 nm, SL) and larger liposomes (350-400 nm, LL) prepared with cholesterol, phosphatidylcholine and stearylamine were injected intravenously. There was no difference in the accumulation in the infarction zone for the different sizes liposome tested (0.02% vs. 0.02%, expressed as %dose per g of the tissue). However, for SL the addition of PEG and an infarct-specific antimyosin antibody (SL-PEG-A) reflected maximum uptake in the infarct zone (0.25%). This result was correlated with the presence of PEG on the liposomes surface since vesicles circulation time was increased (15% to $\cong 65$ to injected dose, SL vs. SL-PEG-A). Beyond strong influence of the infarct-specific antibody, showed by the increase uptake in the infarcted myocardium as compared PEG-liposomes (without antibody, 0.13% to 0.25 %, SL-PEG vs. SL-PEG-A) [89].

Antibody-targeted liposomes are reported to as immunoliposomes [90]. Besides antibody [91,92], other moieties have been employed to development of infarct-specific targeting liposomes, such as proteins [76,77], carbohydrate [93] and lipids [12].

Dasa et al. [76], identified peptides specific for cardiomyocytes, endothelial cells, myofibroblasts, and c-Kit + cells present in the microenvironment of post-MI. These peptides were conjugated to liposomes and evaluated concerning to their biodistribution in infarcted mice. Results indicated the higher accumulation for each type peptide-conjugated liposomes in the infarct/border zone than unconjugated liposomes with the peptides. In addition, cardiac-targeted peptide-conjugated liposomes were able to shift the liposomes away from macrophages, differently from unconjugated liposomes with the peptides, which showed significantly uptake by RES.

The resident and recruited macrophages on infarct area during the inflammatory response induced by cardiac injury initially exhibit proinflammatory activity, followed by inflammation resolution phase, which characterized by the action reparative macrophages. Also, aspects such as duration and extent of the early inflammatory phase negatively affect the size infarct and ventricle remodeling. Aiming modulation of cardiac macrophages, Harel-Adar et al. [12] reported phosphatidylserine-presenting liposomes (PS-liposomes) able to mimic the apoptotic cells aiming their anti-inflammatory effects. This strategy based on recognition of apoptotic cells by macrophages via surface ligands, which apoptotic cells are known to suppress inflammation by inhibiting the release of proinflammatory cytokines from macrophages. Results demonstrated an upregulation of the anti-inflammatory response and also preservation small infarct, and prevention ventricular dilatation and remodeling.

Torchilin et al. [94] described for the first time the development of modified liposomes by covalent coupling to canine cardiac antimyosin and they shown experimentally the accumulation of liposomes in the canine infarcted myocardium. Later, Khaw et al. [95] used

antimyosin-immunoliposomes (IL) to reveal cell membrane lesions. *In vitro* experiments with a hypoxic model of injury in rat embryonic cardiomyocytes revealed a high survival of hypoxic cells in the presence of IL (up to 95%) when compared to controls (about 40%). The authors suggested that IL besides promoting 'plug' directly into the holes of damaged cells, also prevent cell deaths by sealing membrane lesions evidenced by possible fusion of liposomes with cell membrane. In addition, the intracellular delivery of a plasmid and subsequent expression of its genetic products confirmed the fusion of IL with the cell membrane of hypoxic cardiocytes. In order to evaluate the *in vivo* applicability of ILs, Khaw, DaSilva, & Hartner [78] tested the "Plug and Sealing" approach of these immunoliposomes in the protection of the myocardium in a rabbit model of acute MI. The results of absence of necrosis in the IL-treated groups and reduction of 5 times the size of infarction compared to controls (placebo and nonspecific liposomes) demonstrated that IL effectively offered cardioprotection when administered concomitant with coronary artery occlusion in the induction of experimental MI. The authors also suggested that the use of IL could be an adjunct approach to reperfusion therapy, resulting in improved preservation of cardiac tissue after MI.

6.2 Strategies to target the myocardium using liposomes

The research on liposome has been demonstrated a wide variety of clinical approaches. Their applications include therapeutics, diagnostic and theranostics, this latter more recently described, and characterized by the co-encapsulation of therapeutic and imaging agents in a single liposomal dispersion [96].

Nanocarriers modify drug kinetics *in vivo*, concerning the targeting of the encapsulated agent to the site of action through of two strategies, namely, passive and active targeting. When targeting depends on physiopathological mechanism such as enhanced

permeability and retention effect (EPR) and incorporation by the RES this targeting is called passive. On the contrary, if the targeting is linked to a specific nanosystem, which is designed to bind to a target molecule that is specific for a certain disease process, in this case it's an active targeting [97]. **Figure 3** illustrates liposomes characteristics mandatory for passive and active targeting. Both strategies, passive and active targeting, are used to improve delivery of drugs and biopharmaceuticals encapsulated in liposomes to cardiovascular system.

Different controlled release systems have been used for growth factor therapy in the setting of experimental MI [5,98,99]. For liposomes, few studies have been dedicated to these systems as carriers of peptide or small molecules for cardiac repair. However, due to their properties and the search for safe and effective carriers, interest in utilizing liposomes as cardiac carrier for biopharmaceuticals has been growing recently (**Table 1**).

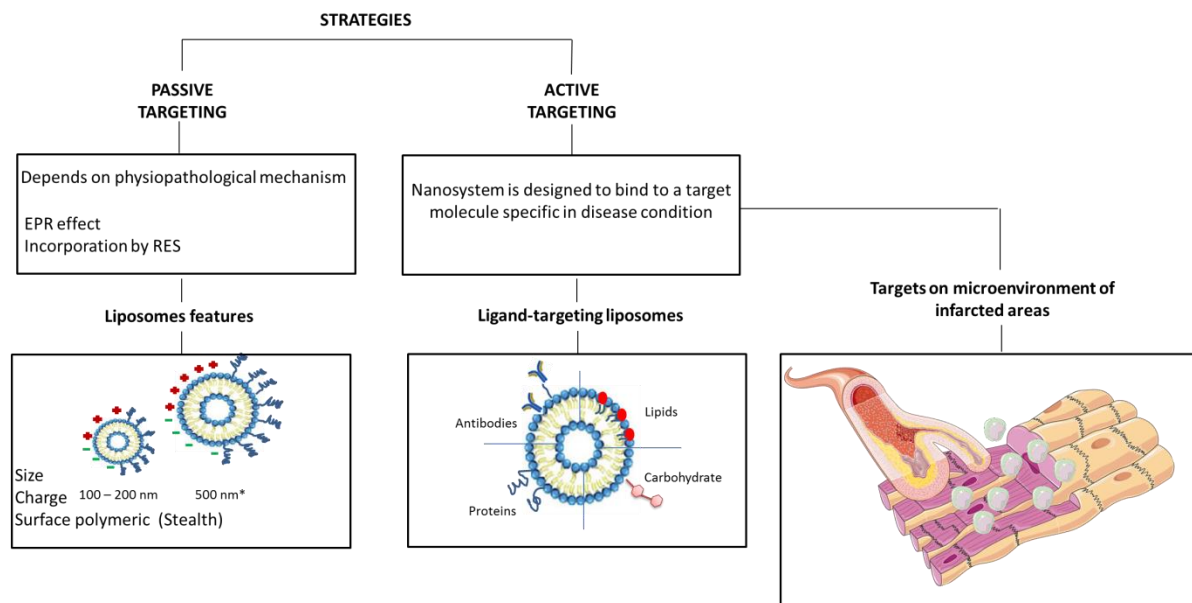


Fig. 3 Targeting strategies of liposomes for infarcted heart. Liposomes can be targeting to infarcted myocardium through of two strategies, named passive and active targeting's. Liposomes' characteristics such as size, charge, and polymeric surface are determinant for passive targeting that is related to physiopathological mechanisms, like enhanced permeability and retention effect (EPR) and incorporation by the reticulum-endothelial system (RES). While in the active targeting, the targeting is linked to a specific

nanosystem, which is designed to bind to a target molecule that is specific for a certain disease process. Ligand-targeting liposomes are designed with antibodies, proteins, carbohydrate and lipids (e.g. phosphatidylserine) aimed infarct zone's microenvironment targets (e.g. cardiomyocytes, macrophage, myosin, troponin 1, P-selectin, AT1-receptor)

6.2.1 Passive targeting

Regarding the passive targeting, liposome's characteristics such as size, charge, and polymeric surface coatings affect their cellular uptake, distribution and blood clearance [80]. Thus, conventional liposomes, long-circulating liposomes, and cationic liposomes can be employed by passive targeting strategies to infarcted heart.

Table 1
Pre-clinical studies that used biopharmaceuticals encapsulated into liposomes to treat myocardial infarction/ to cardiac regeneration.

Biopharmaceutical	Lipid constitution	Type of liposomes	Size (nm)	Animal model	Route	Outcomes	References
VEGF	HSPC, CH, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG-maleimide.	Immunoliposomes	~ 180	Rats Myocardial infarction	Intravenously	Increase in the number of vessels. Significant increase in fractional shortening and improved systolic function.	[79]
VEGF + MSCs	HSPC, CH, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG-maleimide.	Immunoliposomes	NA	Rats Myocardial infarction	Intravenously	The combination treatment provided: Increased of MSCs engraftment. Increased blood vessel density. Reduced collagen deposition. Greater attenuation of cardiac function loss.	[100]
hVEGF165 gene + hSkM	CH, DOTAP	Cationic liposomes	~ 100.9	Rats Myocardial infarction	Intramyocardial	The combination treatment provided: Transfected hSkM expressed hVEGF165 up to day-18. Reduced apoptosis, improved angiogenesis, and better LV ejection fraction.	[101]
AMO-1	EPC, CH, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG-maleimide.	Immunoliposomes	~ 105	Rats Myocardial infarction	Intravenously	Relief of arrhythmias. ST segment elevation attenuation. Restoration of the depolarized resting membrane.	[102]
ATP	EPC, CH, mPEG2000-DSPE, DOTAP, Rh-PE.	Cationic liposome	~ 189.8	Model ischemia/reperfusion <i>in vivo</i> with rat hearts	Intravenously	Better preservation of the systolic and diastolic function against ischemic damage.	[103]

MSCs (mesenchymal stem cells), hVEGF165 gene (vascular endothelial growth factor-165 gene), AMO-1 (anti-MicroRNA-1 antisense oligonucleotides), CoQ10 (Coenzyme Q10), HSPC (hydrogenated soy L- α -phosphatidylcholine), CHO (cholesterol), DSPE-PEG2000 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[(polyethylene glycol)2000]), NA (not available), LV (left ventricle), DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane), EPC (egg phosphatidylcholine), mPEG2000-DSPE (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[(methoxy)polyethylene glycol]-2000)), Rh-PE (rhodamine-phosphatidylethanolamine), PEG-PE (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[(methoxy)polyethylene glycol]-2000)), DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine), DPPE (dipalmitoylphosphatidylethanolamine), DHP (dihexadecylphosphate), SPC (soy phosphatidylcholine)

Table 1
Continued

Biopharmaceutical	Lipid constitution	Type of liposomes	Size (nm)	Animal model	Route	Outcomes	References
ATP	EPC, CH, PEG-PE, DOTAP.	Cationic liposome	~200	Rabbits Myocardial infarction	Intracoronary	Protected the heart muscle cells from ischemic damage.	[104]
ATP	HSPC, CH, DSPE-PEG2000	Stealth liposomes	~134	Rats Myocardial infarction	Intravenously	Attenuation of unfavorable hemodynamic effects. Reduced MI size.	[75]
CoQ10	EPC, CH, mPEG2000-DSPE, DOTAP	Stealth liposomes	~177.2	Rabbits Myocardial infarction	Intracoronary	Protected the heart muscle cells from ischemic damage.	[105]
erythropoietin (EPO)	DPPC, CH, DHP, ganglioside, DPPE	Site-specific liposomes	~100	Rabbits Myocardial infarction	Intravenously	Reduced the area of fibrosis. Increased vessel numbers. Improved left ventricular remodeling and function.	[106]
Hemin	SPC, CH, DPPE, Rh-PE	Site-specific liposomes	NA	Mice Myocardial infarction	Intravenously	Preserved left ventricle wall thickness. Improves angiogenesis. Improves infarct-related regional function.	[107]

MSCs (mesenchymal stem cells), hVEGF165 gene (vascular endothelial growth factor-165 gene), AMO-1 (anti-MicroRNA-1 antisense oligonucleotides), CoQ10 (Coenzyme Q10), HSPC (hydrogenated soy L- α -phosphatidylcholine), CHO (cholesterol), DSPE-PEG2000 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[(polyethylene glycol)2000]), NA (not available), LV (left ventricle), DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane), EPC (egg phosphatidylcholine), mPEG2000-DSPE (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]), Rh-PE (rhodamine-phosphatidylethanolamine), PEG-PE (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]), DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine), DPPE (dipalmitoylphosphatidylethanolamine), DHP (dihexadecylphosphate), SPC (soy phosphatidylcholine)

In a study developed by Caride, Zaret [13], the authors observed that the surface charge of the liposome membrane influenced on the vesicles accumulation into dogs infarcted myocardium. Dicytylphosphate and stearylamine were used to prepare negatively and positively charged liposomes, respectively, while liposomes uncharged were constituted of cholesterol and lecithin only. After intravenously administration of the radioactively labeled conventional liposomes, ⁸⁵Sr-labeled carbonized microspheres were also administered, which allowed to correlate the concentration of liposomes in the infarct areas with the regional myocardial blood flow. As a result, positively charged and neutral liposomes were concentrated in the infarct areas, while the negatively charged liposomes accumulated preferentially in the myocardium non-infarcted regions.

Understanding the molecular basis of the EPR effect, Lipinski et al. (2016) [74] demonstrated presence of long-circulation liposomes after intravenously delivery in the mice infarcted myocardial by different imaging techniques. Liposomes were preferentially concentrated in the infarcted zone, so it was possible to identify the cardiac lesion. They also suggested these liposomes may serve as vehicles for cardiac drug delivery.

Ye et al. [101] assessed the synergism of engraftment of stem cells with VEGF165 genes- loaded cationic liposomes (VEGF165-L) for regeneration cardiac in rats. Combined therapy of human skeletal myoblasts (hSkM) and human VEGF165-L revealed reduced apoptosis, improved angiogenesis, and better ejection fraction as compared with the results of the groups of animals treated with DMEM or hSkM with empty cationic liposomes. In addition, the transfection of VEGF165 gene contained liposomes into hSkM was enabled expression of hVEGF165 sufficient to induce increased blood flow in the infarcted heart and stimulate cytokinesis in hSkM, resulting in improved cardiac function.

Recently, Hwang et al. [108] encapsulated a peptide analogous to the amino acid sequence of the dominant functional epitope of VEGF. They evaluated the efficacy of encapsulated peptide in a rat MI model. This strategy provided a significant increase in vessel density when compared to control groups, and also improved reperfusion defects in the infarcted myocardium.

Another biopharmaceutical, adenosine, may have its safety and therapeutic efficiency in preventing post-reperfusion myocardium injury conferred using controlled release systems, such as liposomes. According this, Verma, Levchenko, Bernstein, & Torchilin [103] encapsulated ATP into cationic and stealthy liposomes (ATP-L1) and evaluated the effect of ATP-L on the cardiac mechanical function in the Langendorff isolated heart model submitted ischemic/reperfusion. The administration of ATP-L1 (1 minute) before reperfusion (30 minutes) showed better preservation systolic and diastolic function compared to controls, Krebs–Henseleit (KH) buffer, free ATP (F-ATP), and empty liposomes (EL). Additionally, encapsulation of ATP in liposomes was effective in protecting ATP to hydrolysis in the presence of ATPase. In another study performed by Takahama et al. [75], intravenously delivery of ATP-loaded stealthy liposomal (L-ATP2) led to reduction negative hemodynamic effects on blood pressure and heart rate as compared with the same dose of free adenosine. In addition, L-ATP2 acting as cardioprotector, promoting the reduction about 44.55% infarct size compared with saline treated groups.

The same search group demonstrated increase intracellular delivery of coenzyme Q10 (CoQ10) encapsulated into cationic and stealth liposomes (CoQ10-L) in a rabbit myocardial infarction model. Herein, CoQ10-L intracoronary delivery was performed in similar conditions by Verma et al. [104], reported previously text. Additionally, resulted in final irreversible damage lower in the animals treated with CoQ10-L (30%) of the total area at risk compared with control groups, empty liposomes (60%) and buffer (70%). As conclusion,

liposomes as ATP and CoQ10 carrier to evidenced approaches in the use direct or indirect sources of exogenous energies to "myocardial reperfusion injury" prophylaxis resulting of inadequate energy supply.

6.2.2 Active targeting

Targeting moieties can be used to increase local accumulation or promote cellular internalization by target cells. The active targeting strategy arises from liposome surface modification by ligands which bind and interact with specific cellular or tissue epitope [109,110]. Several microenvironment of infarcted tissue have been explored as active targeting strategies of liposomes, such as myosin [78], P-selectin [92], angiotensin II receptor type 1 [77], macrophage [12] and troponin I [102].

Recently, Ben-Mordechai et al. [107] tested a therapeutic strategy based on macrophage modulation aiming to interfere in the LV adverse remodeling after MI. The authors developed macrophage-targeted liposomes to deliver of hemin, a porphyrin activates heme oxygenase-1 (HO-1) enzyme. It acts suppressing pro-inflammatory (M1) macrophage and activating reparative (M2) macrophage, thus reducing the inflammation. Rhodamine-PE-labeled liposomes were injected by tail vein in infarcted-mice, allowing confirmation of targeting to infarct macrophages. This approach also preserved LV wall thickness, improved angiogenesis and infarct-related regional function.

Scott et al. [79] developed anti-P-selectin-conjugated liposomes containing VEGF to targeting in rat infarcted myocardium and it also assessed changes in cardiac function and vasculature structure after MI. Immunoliposomes targeted delivery containing growth factors resulted in improvement of systolic function, increase in blood vessel density and perfusion.

Also, Tang et al. [100] used anti-P-selectin-conjugated liposomes to deliver VEGF in combination with the graft mesenchymal stem cells (MSCs). The low survival of transplanted

MSCs in experimental models of MI is associated with low blood supply. Then, they hypothesized that targeted delivery of VEGF-liposomal would induce angiogenesis and feasible MSCS therapy. As result, therapeutic association of VEGF and MSC increased viability of engrafted cells, increased in 80% in the number of blood vessel, reduced in 33% of collagen deposition, and better preservation of cardiac function than isolated therapy.

Erythropoietin (EPO) has been reported to present therapeutic effects upon MI, but its benefits after systemic administration are also accompanied by polycythemia [106]. Hence, Yamada et al. [106] developed cardiac-targeting liposomes to deliver EPO (L-EPO) in the infarcted myocardium. As a result, L-EPO selectively accumulated in the infarcted zone, reducing the area of fibrosis, increased vessel density and improved the LV remodeling and function.

In an elegant strategy, Liu et al. [102] encapsulated anti-MicroRNA-1 antisense oligonucleotides (AMO-1) into troponin 1-antigen specific immunoliposomes to specific delivery to injured heart tissue and down-regulated MicroRNA-1 expression in ischemic cardiomyocytes. The strategy was successful achieved with MicroRNA-1 silencing, leading relief of arrhythmias, ST segment elevation attenuation and restoration of the depolarized resting membrane potential in MI rats.

7. Future directions

Reducing mortality rates due to acute myocardial infarction is currently a tangible challenge, but one can still see strategic points for the implantation of a better prognosis. The investigation of new intervention strategies continues to intensify, such as induction myocardial regeneration, attenuation of lesions by reperfusion therapies and mitigation inflammatory response. Such strategies have promising outcomes but have not yet their proven benefits in the acute care setting of MI [111].

Progress on biopharmaceutical research and development have led to increase the quality and quantity of biopharmaceuticals such as peptides, growth factors, genes, nucleic acids and stem cells. These biopharmaceuticals are endowed with distinct mechanisms able to repair and regenerate the infarcted myocardium. However, novel technologies able to efficiently deliver these biopharmaceuticals in the heart tissue may increase their translational value.

As detailed in this review, liposomes can be targeted to heart by passive and active targeting, the choice of how the encapsulated agent will be directed to the site of action depends on the target in the pathophysiological process of the MI. This target can be macrophages or, in the majority of cases, directly to injured myocardium. Modifications of liposomes with hydrophilic chain polymers, such as PEG, present complementary strategies that enhance therapeutic response.

The clinical potential of liposomes as versatile carriers for a myriad of old and newfound biopharmaceuticals is provided thanks the ability to manipulate their characteristics according to the application interest, including CVD. Additionally, the application of nanosystems as teragnostic platforms is pointed as a new path, in view of the ability of liposomes to co-encapsulate diagnostic and therapeutic agents [96].

In conclusion, we believe that in addition to investigating new specific targeting molecules to post-infarction microenvironment, it would also be enlightened to conduct comparative studies between the different myocardium targeting molecules to design liposomes already explored individually in experimental studies. Also it's encouraging to study the behavior cardiac tissue following the administration of liposomes, as well as their retention by administration routes not yet considered, such as local. Collectively, these studies could generate important contributions in the field of cardiovascular regenerative therapy.

Author contributions

Conception and design of the research and Critical revision of the manuscript for intellectual content: Santos LMF, Quadros HC, Ferraz-Carvalho RS, Formiga FR, Santos-Magalhães NS; Acquisition of data: Santos LMF, Quadros HC, Formiga FR; Analysis and interpretation of the data and writing of the manuscript: Santos LMF, Quadros HC, Formiga FR; Financial support: Santos-Magalhães NS, Formiga FR.

Acknowledgements

The authors are grateful to Brazilian Ministry of Science and Technology MCTI (SisNANO/LARNano-UFPE, CNPq # 402282/2013-2, CNPq # 461865/2014-9), Foundation of Research and Technology Development of the State of Pernambuco - FACEPE (PhD scholarship IBPG # 0165-2, AMD # 0211 - 2.00/15), Foundation for Research Support of the State of Bahia- FAPESB (# JCB0018/2016), Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/BA.

References

1. Mensah GA, Moran AE, Roth GA, Narula J. The global burden of cardiovascular diseases, 1990-2010. *Global Heart*. 2014; 9(1):183–184. [PubMed: 25432128]
2. Pesaro AEP, Serrano CVJr, Nicolau JC. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2004; 50(2):214–220. [PubMed: 15286873]
3. Lerman DA, Alotti N, Ume KL, Péault B. Cardiac Repair and Regeneration: The Value of Cell Therapies. *Eur Cardiol*. 2016; 11(1):43–48. [PubMed: 27499812]
4. Lakshmanan R, Maulik N. Development of next generation cardiovascular therapeutics through bio-assisted nanotechnology. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2017; 106(5):2072-2083 [PubMed: 28950048]
5. Formiga FR, Tamayo E, Simón-Yarza et al. Angiogenic therapy for cardiac repair based on protein delivery systems. *Heart Failure Reviews*. 2012; 17(3): 449–473. [PubMed: 21979836]
6. Saludas L, Paucual-Gil S, Prósper F, et al. Hydrogel based approaches for cardiac tissue engineering. *Int J Pharmaceut*. 2017; 523 (2): 454-475. [PubMed: 27989830].
7. Awada HK, Hwang MP, Wang Y. Towards comprehensive cardiac repair and regeneration

- after myocardial infarction: Aspects to consider and proteins to deliver. 2016; 82:94-112. [PubMed: 26757257]
8. Hastings CL, Roche ET, Ruiz-Hernandez E, et al. Drug and cell delivery for cardiac regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015; 84:85-106.
 9. Pascual-Gil S, et al. Tracking the in vivo release of bioactive NRG from PLGA and PEG-PLGA microparticles in infarcted hearts. *J Control Release*. 2015; **220**(Pt A): 388-396. [PubMed: 26546270]
 10. Wang LL, Burdick JA. Engineered Hydrogels for Local and Sustained Delivery of RNA-Interference Therapies. *Adv Healthc Mater*. 2017; 6(1). [PubMed: 27976524]
 11. Maranhão RC, Guido MC, de Lima AD, et al. Methotrexate carried in lipid core nanoparticles reduces myocardial infarction size and improves cardiac function in rats. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12:3767-3784. [PubMed: 28553113]
 12. Harel-Adar T, Ben Mordechai T, Amsalem Y, et al. Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(5):1827–1832. [PubMed: 21245355]
 13. Caride VJ, Zaret BL. Liposome accumulation in regions of experimental myocardial infarction. *Science*. 1977; 198(4318):735-8. [PubMed: 910155]
 14. Cheraghi M, Negahdari B, Daraee H, et al. and Eatemadi, A. Heart targeted nanoliposomal/nanoparticles drug delivery: An updated review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017; 86: 316–323. [PubMed: 28011379]
 15. Smith SC Jr, Collins A, Ferrari R et al. Our Time: A Call to Save Preventable Death From Cardiovascular Disease (Heart Disease and Stroke). *J Am Coll Cardiol*. 2012, 60(22): 2343-8. [PubMed: 22995536].
 16. Roth GA, Huffman MD, Moran AE, et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. *Circulation*. 2015; 132(17):1667–1678. [PubMed: 26503749]
 17. Joseph P, Leong D, McKee M, et al. Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circulation research*. 2017; 121(6): 677–694. [PubMed: 28860318]
 18. WHO (2008). The global burden of disease: 2004 update. Available in: http://www.who.int/entity/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf. Accessed in: 2015.
 19. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017; 135(10): e146–e603. [PubMed:28122885]

20. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Executive Summary : Heart Disease and Stroke Statistics — 2016 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016; 133(4):447-54. [PubMed: 26811276]
21. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition. European Heart Network:Brussels. 2017.
22. Leal J, Luengo-Fernández R, Gray A, et al. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *European Heart Journal*. 2006; 27(13):1610–1619. [PubMed: 16495286]
23. Ministério da Saúde Datasus 2011. Sistema de informações de mortalidade. [Acesso em 2017 Dez 22]. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c08.def>. Accessed in: October 20, 2017
24. Balbinotto NG, Silva EN. The costs of cardiovascular disease in Brazil: a brief economic comment. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*. 2008; 91(4):198-9. [PubMed: 19009169]
25. Venugopal JR, Prabhakaran MP, Mukherjee S, et al. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. *Journal of The Royal Society Interface*. 2012; 9(66):1–19. [PubMed: 21900319]
26. Zebrowski DC, Becker R, Engel FB. Towards regenerating the mammalian heart: challenges in evaluating experimentally induced adult mammalian cardiomyocyte proliferation. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2016; 310(9):H1045–H1054. [PubMed: 26921436]
27. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Glob Heart*. 2012; 7(4):275-95. [PubMed:25689940]
28. Kurrelmeyer K, Kalra D, Bozkurt B, et al. Cardiac remodeling as a consequence and cause of progressive heart failure. *Clinical cardiology*. 1998; 21(12 Suppl 1): I14–I19. [PubMed: 9853190]
29. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010; 48(3):504–511. [PubMed: 19631653]
30. Sutton MG, Sharpe, N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction Pathophysiology and Therapy. *Circulation*. 2000; 101:2981-2988.
31. Jugdutt BI. Ischemia/Infarction. *Heart Fail Clin*. 2012; 8(1):43-51. [PubMed: 22108726]
32. Avezum JÁ, Feldman A, Carvalho AC, et al. V Guideline of the Brazilian Society of Cardiology on Acute Myocardial Infarction Treatment with ST Segment Elevation. *Arq Bras Cardiol*. 2015; 105(2 Suppl 1):1-105. [PubMed: 26375058]

33. Shavadia J, Zheng Y, Dianati Maleki N, et al. Infarct Size, Shock, and Heart Failure: Does Reperfusion Strategy Matter in Early Presenting Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction?. *Journal of the American Heart Association*. 2015; 4(8): [PubMed: 26304934]
34. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: Twenty-eighth adult heart transplant report-2011. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2011; 30(10):1078-94. [PubMed: 21962016]
35. Ptaszek LM, Mansour M, Ruskin JN, Chien KR. Towards regenerative therapy for cardiac disease. *The Lancet*. 2012; 379(9819):933–42. [PubMed: 22405796]
36. Radhakrishnan J, Krishnan UM, Sethuraman S. Hydrogel based injectable scaffolds for cardiac tissue regeneration. *Biotechnology Advances*. 2014; 32(2):449–461. [PubMed: 24406815].
37. Kwon YW, Yang HM, Cho HJ. Cell therapy for myocardial infarction. *International Journal of Stem Cells*. 2010; 3(1): 8–15. [PubMed: 24855535]
38. Suarez S, Almutairi A, Christman KL. Micro- and Nanoparticles for Treating Cardiovascular Disease. *Biomater Sci*. 2015; 3(4):564-80. [PubMed: 26146548]
39. Clinicaltrials.gov
40. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. 2015; 20(1):122-128.
41. Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem*. 2017; 26(10):2700-2707. [PubMed: 28720325]
42. Broughton KM, Sussman MA. Myocardial Regeneration for Humans — Modifying Biology and Manipulating Evolution. *Circulation Journal*. 2016; 81(2):142–148.
43. Lewis FC, Kumar SD, Ellison-Hughes GM. Non-invasive strategies for stimulating endogenous repair and regenerative mechanisms in the damaged heart. *Pharmacological Research*. 2018; 127:33-40.
44. Rebouças JS, Santos-Magalhães NS, Formiga, FR. Cardiac Regeneration using Growth Factors: Advances and Challenges. *Arq Bras Cardiol*. 2016; 107(3): 271–275. [PubMed: 27355588]
45. Zhang J, Li Y. Therapeutic uses of FGFs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2016; 53:144-154. [PubMed: 26369258]
46. Cheraghi M, Namdari M, Negahdari B, et al. Recent advances in cardiac regeneration: Stem cell, biomaterial and growth factors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 87:37–45. [PubMed: 28739296]

47. Rodness J, Mihic A, Miyagi Y, et al. VEGF-loaded microsphere patch for local protein delivery to the ischemic heart. *Acta Biomaterialia*. 2016; 45:169–181. [PubMed: 27619839]
48. Lakshmanan R, Kumaraswamy P, Krishnan UM, Sethuraman S. Engineering a growth factor embedded nanofiber matrix niche to promote vascularization for functional cardiac regeneration. *Biomaterials*. 2016; 97:176–195. [PubMed: 27177129]
49. Izadifar M, Kelly ME, Chen X. Regulation of sequential release of growth factors using bilayer polymeric nanoparticles for cardiac tissue engineering. *Nanomedicine*. 2016; 11(24): 3237–3259. [PubMed: 27854552]
50. Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(9):519-30. [PubMed:23856679]
51. Kirabo A, Ryzhov S, Gupte M, et al. Neuregulin-1 β induces proliferation, survival and paracrine signaling in normal human cardiac ventricular fibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2017; 105: 59-69. [PubMed: 28263756]
52. Nguyen BK, Maltais S, Perrault LP, et al. Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2010; 3(5):547–558. [PubMed: 20559784]
53. Srivastava D, Ieda M, Fu J, Qian L. Cardiac repair with thymosin β 4 and cardiac reprogramming factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012. 1270(1): 66–72. [PubMed:23050819]
54. Simón-Yarza T, Tamayo E, Benavides C, et al. Functional benefits of PLGA particulates carrying VEGF and CoQ10 in an animal of myocardial ischemia. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013. 454(2):784–790. [PubMed:23639291]
55. Browne S, Pandit A. Engineered systems for therapeutic angiogenesis. *Current Opinion in Pharmacology*. 2017; 36:34–43.
56. Sluijter JPG. MicroRNAs in Cardiovascular Regenerative Medicine: Directing Tissue Repair and Cellular Differentiation. *ISRN Vascular Medicine*. 2013.
57. Huang CL, Leblond AL, Turner EC, et al. Synthetic chemically modified mRNA-based delivery of cytoprotective factor promotes early cardiomyocyte survival post-acute myocardial infarction. *Molecular Pharmaceutics*. 2015; 12(3): 991–996. [PubMed: 25588055]
58. Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008;451(7181):937-42. [PubMed: 18288183]
59. Menasché P. Cell therapy trials for heart regeneration - lessons learned and future directions. *Nat Rev Cardiol*. 2018. [PubMed: 29743563]
60. Krishna KA, Krishna KS, Berrocal R, Sambasiva, RKR. Myocardial infarction and stem

- cells. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2011; 3(2):182. [PubMed: 21687345]
61. Rufaihah AJ, Johari NA. Dual delivery of VEGF and ANG-1 in ischemic hearts using an injectable hydrogel. *Acta Biomaterialia*. 2016; 48:58-67. [PubMed: 27756647]
 62. Laham RJ, Chronos NA, Pike M, et al. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a Phase I open-label dose escalation study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000; 36(7): 2132–2139. [PubMed: 11127452]
 63. Aviles RJ, Snnex BH, Lederman, RJ. Testing clinical therapeutic angiogenesis using basic fibroblast growth factor (FGF-2). 2003; 140(4):637-46. [PubMed: 14534147]
 64. Voors AA, Belonje AM, Zijlstra F, et al. A single dose of erythropoietin in ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010; 31(21):2593-600. [PubMed: 20802250]
 65. Henry TD, et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*. 2003; 107(10):1359-65. [PubMed: 12642354]
 66. Lavu M, Gundewar S, Lefer DJ. Gene therapy for ischemic heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011; 50(5):742–750.
 67. Schwarz ER, Speakman M T, Patterson M et al. Evaluation of the Effects of Intramyocardial Injection of DNA Expressing Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in a Myocardial Infarction Model in the Rat—Angiogenesis and Angioma Formation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000; 35(5):1323-30 [PubMed: 10758976]
 68. Hou D, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*. 2005; 112:150-6. [PubMed: 16159808]
 69. Cutts J, Nikkhah M, Brafman DA. Biomaterial Approaches for Stem Cell-Based Myocardial Tissue Engineering: Supplementary Issue: Stem Cell Biology. *Biomarker insights*. 2015. 60 (22):2343–8. [PubMed: 26052226].
 70. Chaudhuri R, Ramachandran M, Moharil P, et al. Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering: Current choices. 2017; 79:950-957. [PubMed: 28629100]
 71. Petros RA, Desimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010; 9(8):615–627. [PubMed: 20616808]
 72. Onoue S, Yamada S, Chan HK. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9:1025-37. [PubMed: 24591825]
 73. Weis SM. Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer. *Current opinion in hematology*. 2008; 15(3):243–9. [PubMed: 18391792]
 74. Lipinski MJ, Albelda MT, Frias JC, et al. Multimodality imaging demonstrates trafficking of

- liposomes preferentially to ischemic myocardium. *Cardiovascular Revascularization Medicine*. 2016; 17(2): 106–112. [PubMed: 26874740]
75. Takahama H, Minamino T, Asanuma H, et al. Prolonged Targeting of Ischemic/Reperfused Myocardium by Liposomal Adenosine Augments Cardioprotection in Rats. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009. 53(8):709–717. [PubMed: 19232905]
 76. Dasa SSK, Suzuki R, Gutknecht M, et al. Development of target-specific liposomes for delivering small molecule drugs after reperfused myocardial infarction. *Journal of Controlled Release*. 2015; 220: 556–567. [PubMed: 26122651]
 77. Dvir T, Bauer M, Schroeder A, et al. Nanoparticles targeting the infarcted heart. *Nano Lett*. 2011; 11 (10): 4411–4414.
 78. Khaw BA, DaSilva J, Hartner WC. Cytoskeletal-antigen specific immunoliposome-targeted in vivo preservation of myocardial viability. *Journal of Controlled Release*. 2007; 120(1–2):35–40. [PubMed:17512999]
 79. Scott RC, Rosano JM, Ivanov Z, et al. Targeting VEGF-encapsulated immunoliposomes to MI heart improves vascularity and cardiac function. *The FASEB Journal*. 2009; 23(10):3361–7. [PubMed: 19535683]
 80. Bowey K, Tanguay JF, Tabrizian M. Liposome technology for cardiovascular disease treatment and diagnosis. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2012; 9(2): 249–265.
 81. Levchenko TS, Hartner WC, Torchilin VP. Liposomes in Diagnosis and Treatment of Cardiovascular Disorders. *Methodist DeBakey Cardiovasc J*. 2012; 8(1):36-41. [PubMed: 22891109]
 82. Arias JL. Liposomes in drug delivery: a patent review (2007 – present). *Expert Opin Ther Pat*. 2013; 23 (11): 1399-414. [PubMed: 23957267]
 83. Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chemical Reviews*. 2015; 115(19):10938-66. [PubMed: 26010257]
 84. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, et al. Preparation , Characterization and Applications of Liposomes : State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*. 2012; 1(2):147–168.
 85. Garg, T, Goyal, AK. Liposomes : Targeted and Controlled Delivery System. *Drug Delivery Letters*. 2014; 4:62–71.
 86. Lasic D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*. 1998; 16(7):307–321. [PubMed: 9675915]
 87. Naresh NK, Xu Y, Klivanov AL, et al. Monocyte and/or macrophage infiltration of heart after myocardial infarction: MR imaging by using T1-

- shortening liposomes. *Radiology*. 2012; 264(2):428-35. [PubMed: 22723500]
88. Eloy JO, Petrilli R, Trevizan, LNF, et al. Immunoliposomes : A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017; 159: 454–467. [PubMed: 28837895]
 89. Torchilin VP, Narula J, Halpern E, Khaw BA. Poly(ethylene glycol)-coated anti-cardiac myosin immunoliposomes: factors influencing targeted accumulation in the infarcted myocardium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1996; 1279(1):75–83. [PubMed: 8624365]
 90. Mastrobattista E, Koning GA, Storm G. Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999; 40(1–2):103–127. [PubMed: 10837783]
 91. Ko Y, Hartner W, Kale A, Torchilin V. Gene delivery into ischemic myocardium by double-targeted lipoplexes with anti-myosin antibody and TAT peptide. *Gene Ther*. 2009; 16(1):52–59. [PubMed:18701915]
 92. Scott RC, Wang B, Nallamotheu R, et al. Targeted Delivery of Antibody Conjugated Liposomal Drug Carriers to Rat Myocardial Infarction. *Biotechnology and bioengineering*. 2007; 96(4):795-802. [PubMed: 17051598]
 93. Lestini BJ, Sagnella SM, Xu Z, et al. Surface modification of liposomes for selective cell targeting in cardiovascular drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2002; 78(1–3): 235–247. [PubMed: 11772464]
 94. Torchilin VP, Khaw BA, Smirnov VN, Haber E. Preservation of antimyosin antibody activity after covalent coupling to liposomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1979; 89(4):1114–1119. [PubMed: 496941]
 95. Khaw BA, Narula J, Vural I, Torchilin VP. Cytoskeleton-specific immunoliposomes: sealing of hypoxic cells and intracellular delivery of DNA. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998; 162(1–2):71–76.
 96. Lila AS, Ishida T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2017; 40(1):1–10. [PubMed: 28049940]
 97. Matoba T, Egashira K. Nanoparticle-Mediated Drug Delivery System for Cardiovascular Disease. *International Heart Journal*. 2014; 55(4): 281–286. [PubMed: 24942639]
 98. Iwakura A, Fujita M; Kataoka K, et al. Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model. *Heart and Vessels*. 2003; 18(2): 93–99. [PubMed:12756606]

99. Oh KS, Song JY, Yoon SJ, et al. Temperature-induced gel formation of core/shell nanoparticles for the regeneration of ischemic heart. *Journal of Controlled Release*, 2010. 146 (2); 207–211. [PubMed: 20417673]
100. Tang Y, Gan X, Cheheltani R, et al. Targeted delivery of vascular endothelial growth factor improves stem cell therapy in a rat myocardial infarction model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2014; 10(8):1711–1718. [PubMed:24941463]
101. Ye L, Haider HK, Tan R, et al. Angiomyogenesis using liposome based vascular endothelial growth factor-165 transfection with skeletal myoblast for cardiac repair. *Biomaterials*. 2008. 29(13):2125–2137. [PubMed: 18279953]
102. Liu M, Li M, Sun S. The use of antibody modified liposomes loaded with AMO-1 to deliver oligonucleotides to ischemic myocardium for arrhythmia therapy. *Biomaterials*. 2014; 35(11):3697–3707. [PubMed: 24468403]
103. Verma DD, Levchenko TS, Bernstein EA, Torchilin VP. ATP-loaded liposomes effectively protect mechanical functions of the myocardium from global ischemia in an isolated rat heart model. *Journal of Controlled Release*. 2005. 108(2–3):460–471. [PubMed: 16233928]
104. Verma, DD, Hartner WC, Levchenko TS, et al. ATP-Loaded Liposomes Effectively Protect the Myocardium in Rabbits with an Acute Experimental Myocardial Infarction. *Pharmaceutical Research*. 2005; 22 (12): 2115–2120.
105. Verma DD, Hartner WC, Thakkar V, et al. Protective Effect of Coenzyme Q10-loaded Liposomes on the Myocardium in Rabbits with an Acute Experimental Myocardial Infarction. *Pharmaceutical Research*. 2007; 24(11): 2131–7. [PubMed: 17657597]
106. Yamada Y, Kobayashi H, Iwasa M, et al. Postinfarct active cardiac-targeted delivery of erythropoietin by liposomes with sialyl Lewis X repairs infarcted myocardium in rabbits. *American journal of physiology heart and circulatory physiology*. 2013; 304(8):H1124-33. [PubMed: 23417861]
107. Ben-Mordechai T, Kain D, Holbova R, et al. Targeting and modulating infarct macrophages with hemin formulated in designed lipid-based *particles improves cardiac remodeling and function. *Journal of Controlled Release*. 2017; 257:21–31. [PubMed: 28065861]
108. Hwang H, Jeong H, Oh P, et al. PEGylated nanoliposomes encapsulating angiogenic peptides improve perfusion defects: Radionuclide imaging-based study. *Nuclear Medicine and Biology*. 2016; 43(9): 552–558. [PubMed: 27395415]
109. Forssen E, Willis M. (1998). Ligand-targeted liposomes. *Advanced Drug Delivery*. 1998; 29(3):249–271.

- 110.Sawant RR, Torchilin VP. Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. The AAPS journal. 2012; 14(2);303–15. [PubMed: 22415612]
- 111.Anderson JL, Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. The New England Journal of Medicine. 2017; 376: 2053–2064. [PubMed: 28538121].

3.2 TISSUE RESPONSE AND RETENTION OF MICRO AND NANOSIZED LIPOSOMES IN MYOCARDIUM AFTER ULTRASOUND-GUIDED TRANSTHORACIC INJECTION

Laís de Macedo Ferreira Santos^a, Breno Cardim Barreto^b, Helenita Costa Quadros^b, Cássio Santana Meira^b, Rafaela de Siqueira Ferraz-Carvalho^a, Simone Garcia Macambira^{c,d}, Juliana Fraga Vasconcelos^c, Bruno Solano de Freitas Souza^{b,c}, Milena Botelho Pereira Soares^{b,c}, Fabio Rocha Formiga^{b,e,*}, Nereide Stela Santos-Magalhães^{a,*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brazil;

^bInstituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador/BA, Brazil;

^cCentro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador/BA, Brazil;

^dInstituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador/BA, Brazil;

^eLaboratório de Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife/PE, Brazil.

* Shared senior authorship.

Corresponding Authors:

Prof. Nereide Stela Santos-Magalhães, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife/PE, Brazil. Tel: + 55 81 21268587; Fax: +55 81 21268485. E-mail: nssm@ufpe.br

Prof. Fabio Rocha Formiga, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP 40296-710, Salvador/BA, Brazil. Tel. +55 71 3176 2211. E-mails: fabio.formiga@bahia.fiocruz.br; fabio.formiga@upe.br.

Abstract

Different carrier systems have been investigated for myocardial delivery of biopharmaceuticals for heart disease. Here, we aimed to evaluate the heart retention and tissue response of liposomes for intracardiac drug delivery. Liposomes were produced by the method of hydrating the lipid film. Cytocompatibility tests were performed in murine L929 fibroblast and H2c9 cardiomyocytes using the Alamar Blue assay. *In vivo* experiments were assessed in infarcted mice with isoproterenol (s.c., 150 mg/kg). Intramyocardial delivery of fluorescent liposomes (rhodamine B-labeled) with different mean sizes (165 nm, 468 nm, 1551 nm and 1954 nm) was performed by ultrasound-guided transthoracic injection. After three days, mice were euthanized for histological evaluation using optical and fluorescence microscopy. No cytotoxic lipid concentrations were determined in the range of 9.3-120 μ M for both cells lines tested. Large liposomes induced significant inflammation in myocardium compared with the control group ($p < 0.0001$). In contrast, heart mice injected with 468 nm-sized liposomes exhibited a lower number of inflammatory cells and a greater tissue retention 72 h post-injection was found. These findings remarkably indicate the potential of liposomes as versatile carriers of biopharmaceuticals for intracardiac delivery, supporting the development of further research on lipidic delivery systems for heart disease.

Keywords: Myocardial infarction, liposomes, biocompatibility, cardiac delivery system, microinjection.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are recognized as the leading causes of death in the world. In 2013, around 54 million deaths worldwide occurred and 32% of these deaths, or 17 million, were attributable to CVD. The majority of these CVD deaths were attributable to either ischemic heart disease (IHD) or cerebrovascular disease [1]. Globally, IHD has become the leading contributor to the burden of disease as assessed on the basis of disability-adjusted life-years [2]. Myocardial infarction (MI) is the most important manifestation of IHD and is associated with high morbidity and mortality worldwide [3]. Concurrently, the global burden of CVD and acute MI has shifted to low- and middle-income countries, where more than 80% of deaths from cardiovascular disease worldwide now occur [2, 4].

Despite of benefits with drugs, surgical reperfusion and revascularization procedures after post infarct, these strategies are limited because a significant number of patients are not candidates for coronary revascularization procedures or achieve incomplete revascularization with these approaches [5]. In addition, heart failure is emerging as a prominent longer-term illness, causing death of infarcted patients, and very high mortality rate (> 40%) among patients with cardiogenic shock after acute MI remains a particular challenge [6]. Therefore, novel therapeutic strategies are mandatory to prevent the high morbidity and mortality rates resulting from MI. In the past decade, growing investigation on new strategies for regeneration of the injured myocardium, including gene therapy [7], cell therapy [8] and the use of growth factors [9] are emerging. These innovative approaches have been challenged by hindrance to achieve the heart tissue and promote therapeutic benefits. For example, angiogenic growth factors clinically failed due to the short circulating half-life and high instability of proteins when systemically administered [10]. In turn, stem cell-based therapies still depend on delivery platforms and cytokine stimuli to maintain cell retention and viability

after transplantation [11, 12]. Thus, the clinical translation of emerging therapies using biopharmaceuticals such as plasmids or recombinant proteins or even stem cells depend on new technologies for myocardial-targeted delivery.

Different biomaterials have been investigated as potential platforms for delivering biopharmaceuticals to the myocardium for the treatment of MI [13, 14]. For example, the use of hydrogels for cardiac delivery may favor positive tissue remodeling in association with therapeutic proteins or growth factors [15]. In addition, polymeric micro- and nanoparticles have shown great potential to deliver cytokines to the myocardium, administered via intramyocardial injection in a rat MI model [16, 17]. In turn, liposomes are another example of a promising biomaterial intended to target drugs, biopharmaceuticals and cells to heart [18-20].

Also the emerging therapies for cardiac regeneration face on critical issue of myocardial delivery. The intramyocardial route (IM) allows high availability and tissue retention [21] but it is commonly performed by invasive procedures such as thoracotomy or sternotomy. Alternatively, ultrasound-guidance percutaneous intramyocardial injection is a feasible method able to access specific regions of the heart. Importantly, this approach eliminates the inherent complications of thoracotomy and surgical morbidity besides to allow the use of therapeutic regimens with multiples administration [22].

In particular, liposomes have been used as convenient delivery vehicle for biologically active molecules, they can incorporate both hydrophilic and lipophilic molecules, located in the aqueous compartment and inserted or adsorbed into the membrane lipidic, respectively [23]. The versatility of lipid systems for size, their release kinetics and targeting properties of liposomes can be refined and this ability seems to be essential to deliver therapeutics precisely to the infarcted heart [24]. However, liposomes potential for myocardial-targeted delivery has not been extensively explored.

Herein, we propose to administer liposomes through a minimally invasive method, the ultrasound-guidance transthoracic intramyocardial injection. Importantly, this is the first report of liposomes percutaneous delivery into myocardium. Through this approach, we aimed to evaluate the heart retention and tissue response of liposomes for cardiac delivery in a pharmacologically induced mice model of myocardial infarction.

Additionally, it is important to highlight that the liposomes were incorporated in a cellulose-based hydrogel. Previous studies have shown that hydrogel used in the present work is biocompatible with subcutaneous rabbit tissue and is capable to induce tissue remodeling [25], non-cytotoxic, genotoxic or acutely toxic [26]. This association was designed for future efficacy studies, when we intend to encapsulating a growth factor in the liposomes tested here, thus also the hydrogel can be will evaluated for its ability to positively influence post-infarction cardiac remodeling.

2. Material and methods

2.1. Material

Soybean phosphatidylcholine (Lipoid S 100®) was purchased from Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Germany). 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide sodium salt (Resazurin sodium salt) (M_w : 251.17) was supplied from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) to cell culture was furnished by Gibco (Grand Island, NY, USA). Cholesterol, Rhodamine B isothiocyanate, pararosaniline chloride and isoproterenol hydrochloride were supplied by Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, USA). The hydrogel bacterial cellulose hydrogel (0.8%) was produced and provided by Polisa,

Biopolymers for Health Ltd, linked to the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE).

All other chemicals were of analytical grade and used as received.

2.2. Preparation of liposomes

Fluorescence-labeled liposomes (Rhod-Lipo) were prepared using lipids at 120 mM (soya phosphatidylcholine and cholesterol; 8:2) and rhodamine B (0.5 mg/mL) by the thin film method [27]. Briefly, lipid constituents and rhodamine B were dissolved in a mixture of chloroform and methanol (3:1 v/v) under magnetic stirring. The solvents were removed under pressure (37 °C, 80 rpm) and the thin film formed was hydrated with 10 mL of trehalose (10%) in phosphate buffer solution (pH 7.4) resulting in large multilamellar vesicles (MLVs).

Liposome batches with different sizes at micro and nanoscale were prepared using an ultrasound probe in order to evaluate their retention in myocardium and biocompatibility. Therefore, liposomes were prepared according to sonication parameters which ranged in the power (1-5) and time (10-150 seconds). Lastly, liposomes were frozen at -80 °C, lyophilized and stored at 4 °C before use. Prior to *in vivo* studies, lyophilized liposomes were reconstituted in pH 7.4 phosphate buffer solution and incorporated in a cellulose-based hydrogel (1:1, v.v). The injectability [28] of liposomes incorporated in hydrogel was assessed by their ability to pass through a 29-gauge needle used for heart injection [15].

2.3 Liposome characterization

Liophilized liposomes were reconstituted in phosphate buffer solution (pH 7.4) and characterized in terms of particle size, polydispersity index (PDI) and surface charge (zeta potential) using dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic mobility techniques,

respectively (Particle AnalyzerTM Delsa Nano S, Beckman-Coulter, USA; ZetasizerNano-ZS90, Malvern, Worcestershire, UK).

2.4. Cytotoxicity of liposomes

Murine L929 fibroblast and H9c2 cardiomyocytes were used for evaluating the cytotoxicity of liposomes. Both cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, Brazil) and 50 µg/mL gentamicin (Novafarma, Anápolis-GO, Brazil). Fibroblasts and cardiomyocytes were plated into 96-well culture plates at densities of 10^4 cells/well and 5×10^3 cells/well, respectively. Cells were maintained in an incubator containing 5% CO₂ at 37 °C for 24 h. After incubation, Rhod-loaded liposomes with different sizes and lipid concentrations at 9.3, 15, 25.9, 43.2, 72, 120 µM were added to the cells and incubated for 72 h. DMEM was used as positive control and pararosaniline chloride (*p*-RANIL, 10 µM) as negative control. The cell viability was analyzed using resazurin sodium salt reagent (10%) after incubation for 4 h. Metabolic activity of cells was determined by measurements of reaction products using a multi-plate reader at 570 to 600 nm. In a separated set of experiments, the cytotoxicity of the hydrogel was also assessed in H9c2 and L929 cells using the aforementioned conditions. For that, cells were incubated with hydrogel at the concentrations ranging from 5.3 µg/mL to 170 µg/mL.

2.5. In vivo experiments

2.5.1. Myocardial infarction model

The investigation was carried out in agreement with the recommendations of Ethical Issues Guidelines and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Gonçalo Moniz Institute, FIOCRUZ/BA (# 010/2015). A total of 17 male C57BL/6 mice (25–30g) were supplied by the Center for Biotechnology and Cell Therapy Animal Facility, Hospital São Rafael (Salvador, Brazil). Animals were maintained with food and water available *ad libitum* and experiments were carried out using a model of isoproterenol (IPN) induced-myocardial infarction [29,30]. (Fig. 1). The induction of MI was performed through subcutaneous administration of isoproterenol hydrochloride (IPN, Sigma, St. Louis, USA) at 150 mg/kg/day for two consecutive days according to the experimental design (Fig. 1).

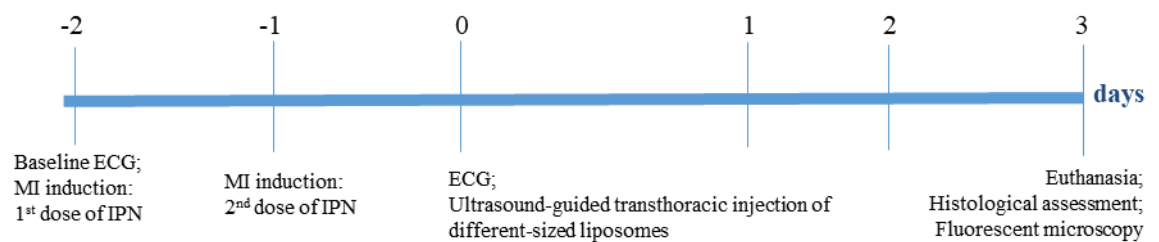


Fig. 1. Experimental design of liposome administration in the mice infarcted myocardium. The isoproterenol (IPN) induced-myocardial infarction (MI) model was used. Animals were monitored by electrocardiogram (ECG).

2.5.2. *Electrocardiography*

For electrocardiograms (ECG) recordings, mice were anesthetized with inhaled isoflurane (0.5-2%). ECG acquisition was performed using a bipolar I and II lead, obtained from the Bio Amp PowerLab System (PowerLab 2/20; ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia), allowing for the recording of biological signals in animals with complete electrical isolation. Recordings were bandpass-filtered (1–100 Hz) to minimize environmental signal disturbances at a sampling rate of 1 kHz. The ECG parameters including heart rate, P wave amplitude (mV), PR interval (ms), QRS duration (ms), QT interval (ms), frontal QRS axis ($\hat{A}QRS$), QR+S amplitude index and ST segment were analyzed using the Chart7 software (PowerLab). Mice with evident alterations in the ST segment were considered in the study.

2.5.3. *Intramyocardial delivery of liposomes in infarcted myocardium*

Twenty-four hours after the last dose of ISO, cardiac delivery of fluorescent liposomes incorporated in hydrogel was performed by ultrasound-guided transthoracic injection (Vevo 770, VisualSonics, Toronto, Canada). For validation purposes, injection of Evan's blue dye was performed before liposome administration to visualize the local injection in epicardium. Adequate sedation and ventilation of animals was performed (0.5-2% isoflurane, 0.5-0.8 L/min 100% oxygen) and they were placed onto animal platform. Next, syringes with 29G needle were loaded with liposomes for transthoracic injection by a needle/transducer.

Animals were divided in the following groups receiving liposomes incorporated in hydrogel (50 μ l, 1:1, v.v) with different size (nm): Rhod-Lipo₁₆₅ (n=3), Rhod-Lipo₄₆₈ (n=3), Rhod-Lipo₁₅₅₁ (n=3), Rhod-Lipo₁₉₅₄ (n=3) or only hydrogel (n=2). A control group of infarcted animals without treatment (n=2) was also added in this study. Mice were euthanized

after anesthesia with 5% ketamine (Vetanarcol; Konig, Santana de Parnaíba, Brazil) and 2% xylazine (Sedomin; Konig), 72 h after injection of liposomes or hydrogel. Before being harvested, the hearts of animals were perfused with PBS (5 minutes) and 10% paraformaldehyde (15 minutes), respectively. After perfusion, the hearts were harvested and maintained in 10% paraformaldehyde at 4 °C for 24 h. Next, hearts were sliced in three 4-mm-thick segments from apex to base and dehydrated with 70% ethanol at 4 °C for 24 h before histological analysis.

2.5.4. Histological assessment for myocardial response and retention of liposomes

Heart slices were embedded in paraffin, cutted 6 µm-sections and stained in sections alternating with hematoxylin–eosin (HE) and picosirius red (PSR) to visualize tissue structure, potential inflammation and fibrosis, by optical microscopy. Images were digitized using a color digital video camera (CoolSnap, Photometrics, Montreal, QC, Canada) adapted to a BX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Morphometric analyses were performed using the software Image-Pro Plus v.7.0 (Media Cybernetics, San Diego, CA, USA). The inflammatory cells were counted on 10 fields captured per heart (40× magnification). The retention of liposomes in the myocardium tissue was evaluated using fluorescence microscopy. All microscopic analyses were carried out as a blind test.

2.6. Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ S.D. Statistical analysis of data was performed with Prism 5.0 software (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). For cytotoxicity and *in vivo* assays, differences were assessed by ANOVA with a Tukey post-hoc correction. Shapiro–

Wilk test was used to justify the use of a parametric test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Liposome characterization

Aiming to assess the optimal size for tissue retention in infarcted hearts, liposomes with different sizes were prepared and characterized according to their mean diameter, PDI and surface charge (zeta potential) (Table 1). Rhod-Lipo presented mean particle size and PDI ranging from 165 to 1954 nm and 0.289 to 0.643, respectively. Liposomes presented surface charge varying from -1.09 ± 0.2 to -8.47 ± 0.6 mV.

Table 1. Physicochemical characterization of fluorescent-labeled liposomes with different size.

Liposome formulations	Sonication Parameters		Physicochemical parameters		
	Power	Time	Size $\pm$ SD	PDI	$\zeta \pm$ SD
	(W)	(sec)	(nm)		(mV)
Rhod-Lipo ₁₆₅	5	150	165 ± 01	0.289	-8.47 ± 0.6
Rhod-Lipo ₄₆₈	5	20-30	468 ± 16	0.323	-9.06 ± 1.3
Rhod-Lipo ₁₅₅₁	1	50	1551 ± 26	0.515	-2.70 ± 0.3
Rhod-Lipo ₁₉₅₄	1	10	1954 ± 60	0.643	-1.09 ± 0.2

Rhod-Lipo_{165,468,1551,1954} = rhodamine-loaded liposomes with different mean size of vesicles (nm). SD = standard deviation; ζ = zeta potential.

3.2. Cytotoxicity of liposomes

The effect of liposomes with different sizes (165, 468 and 1954 nm) on viability of murine L929 fibroblasts and H9c2 cardiomyocytes was evaluated. According to the ISO #10993-5, materials can be considered cytotoxic when they reduce the cell viability by more than 30% [31]. In these assays, liposomes did not alter cell viability of fibroblast and cardiomyocyte cell lines (Fig. 3) at the lipid concentrations ranging from 9.3 to 120 μ M. Hardiansyah and colleagues [32] and Guzman-Villanueva and colleagues [33] evaluated the cytotoxicity of stealthy (0.1-1 mg/ml, 100 nm) and conventional liposomes (10-300 μ g/ml, 80 nm) on L929 and H9c2 cells, respectively, and also no significant cytotoxicity was found. The stealthy liposomes consisted of DPPC, cholesterol, PEG-2000 at a composition of 80:20:5 mol% [32], while conventional liposomes were prepared in the 10 mg/mL concentration with ePC and cholesterol at a 70:30 ratio molar [33].

In the present study, the cytotoxicity of the cellulose-based hydrogel was also assessed in H9c2 and L929 cells, and 100% of cell viability was found at concentrations of 5.3 μ g/ml - 170 μ g/ml for both cells lines (results not shown). Our results are in agreement with that previously reported [26], in which no cytotoxicity of bacterial cellulose hydrogel evaluated on C3A hepatoma cell line C3A (HepG2/C3A) was verified. All these findings corroborate that bacterial cellulose is a nontoxic material for cells [34].

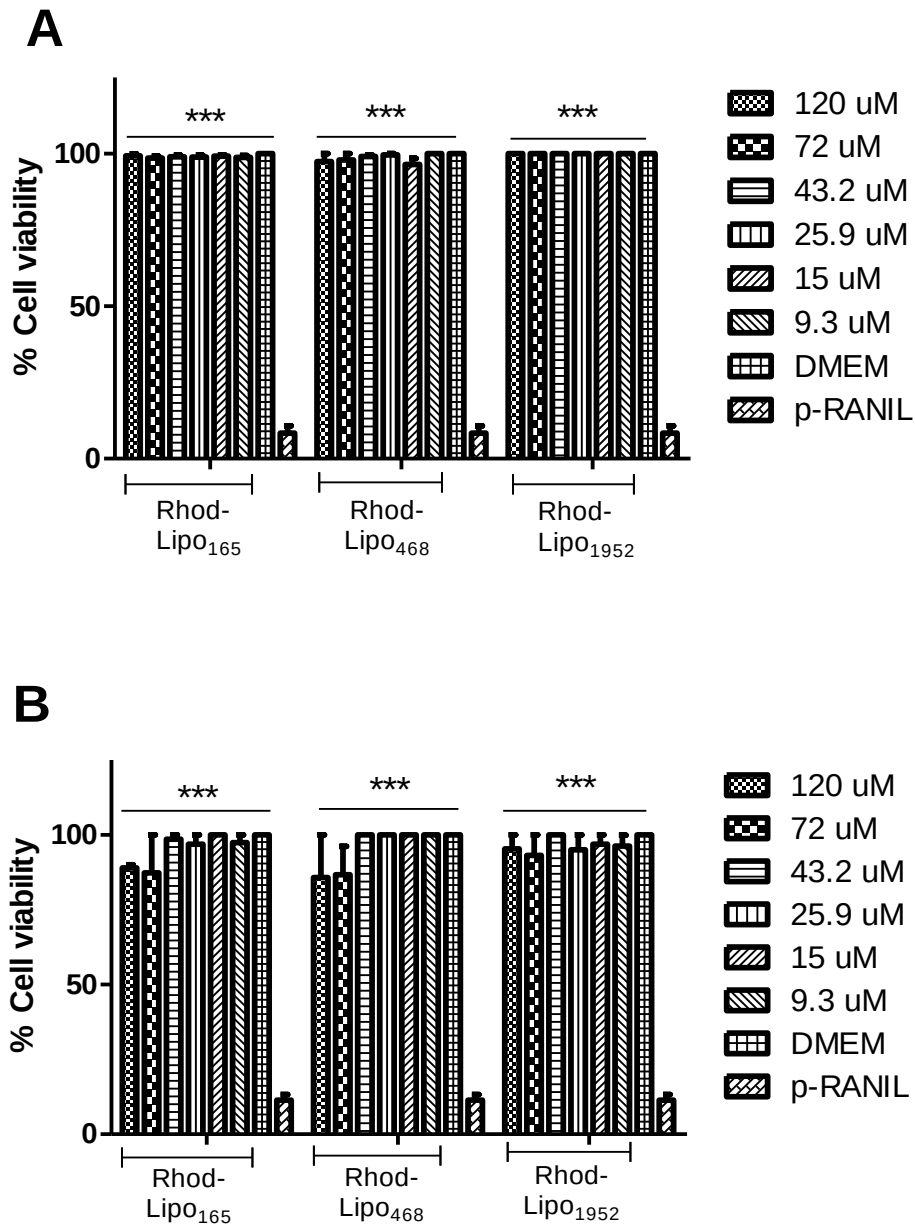


Fig. 2. Cytotoxicity of Rhodamine-loaded liposomes (Rhod-Lipo 165, 468 and 1950 nm) with different sizes (Rhod-Lipo in L929 fibroblasts (A) and H9c2 cardiomyocytes (B) at different lipid concentration using the Alamar Blue assay. *p*-RANIL (pararosaniline chloride, 10 μ M): positive control; DMEM: negative control. *** $p < 0.0001$ vs. *p*-RANIL.

3.3. Tissue response and retention of liposomes in infarcted myocardium

The induction of experimental myocardial damage has been previously performed through surgical procedures such as aortic attachment and coronary artery ligation [14]. Although the animal models of MI following coronary artery ligation reproduce many aspects of ischemic cardiomyopathy and heart failure in humans, they suffer from high early mortality and low rate of success of MI [35]. Alternatively, the administration of high doses of isoproterenol, a synthetic catecholamine, provides deleterious histological and biochemical changes in the heart tissue. These effects make for a good infarct model since it recapitulates much of the pathophysiology of left ventricular (LV) dysfunction after MI in humans [36]. In the present study, mice treated with isoproterenol showed a significant ST elevation in ECG (Fig. 4), an indicative finding of MI [37]. No deaths were related during isoproterenol administration and MI was suitable induced in mice using a non-invasive and reproducible method.

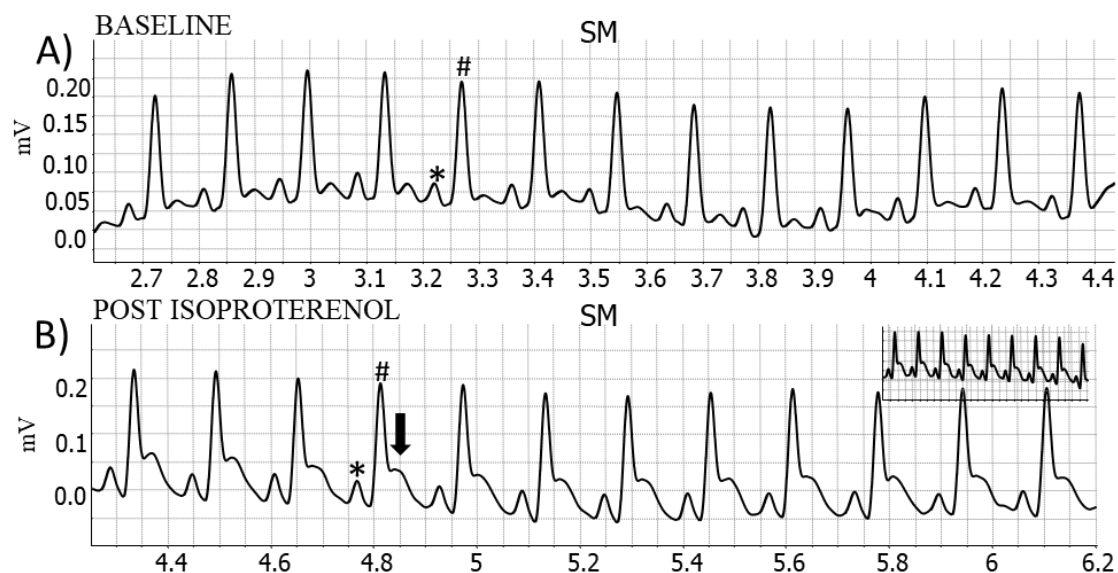


Fig. 3. Representative ECG of a mouse subjected to the isoproterenol-induced myocardial infarction (s.c. 150 mg/kg/day). Baseline ECG (A) and after infarction (B). A significant ST elevation indicates MI (black arrow). # QRS complex; * P wave.

Emerging therapies for cardiac regeneration using biopharmaceuticals, genes or stem cells face on critical issue of myocardial delivery. The intramyocardial route (IM) allows high availability and tissue retention [23], but it is commonly performed by invasive procedures such as thoracotomy or sternotomy. Alternatively, ultrasound-guidance percutaneous intramyocardial injection is a feasible method able to access specific regions of the heart. Importantly, this approach eliminates the inherent complications of thoracotomy and surgical morbidity besides to allow the use of therapeutic regimens with multiples administration [22].

This is the first report describing an ultrasound-guided injection of liposomes in ISO-infarcted mice. The procedure provided a real-time visualized liposome delivery on heart tissue in a minimally invasive manner (Fig. 5A). Prior to liposome injection, the procedure was validated by transthoracic injection of Evan's blue dye as previously reported [22]. Thus, it was possible to identify the injection point at epicardium and the tissue distribution of Evan's blue dye content towards LV and aorta (Fig 5B).

It is well established that the particle size, the presence of hydrophilic polymer and targeting moieties on surface of liposomes have influence on their retention in the injured cardiac tissue after systemic administration [38, 39]. Although the relevance in the design of liposomes as drug carriers for cardiac delivery, a few numbers of studies has been reported the investigation of the retention and tissue response of liposomes in animal models of MI [19, 38-41].

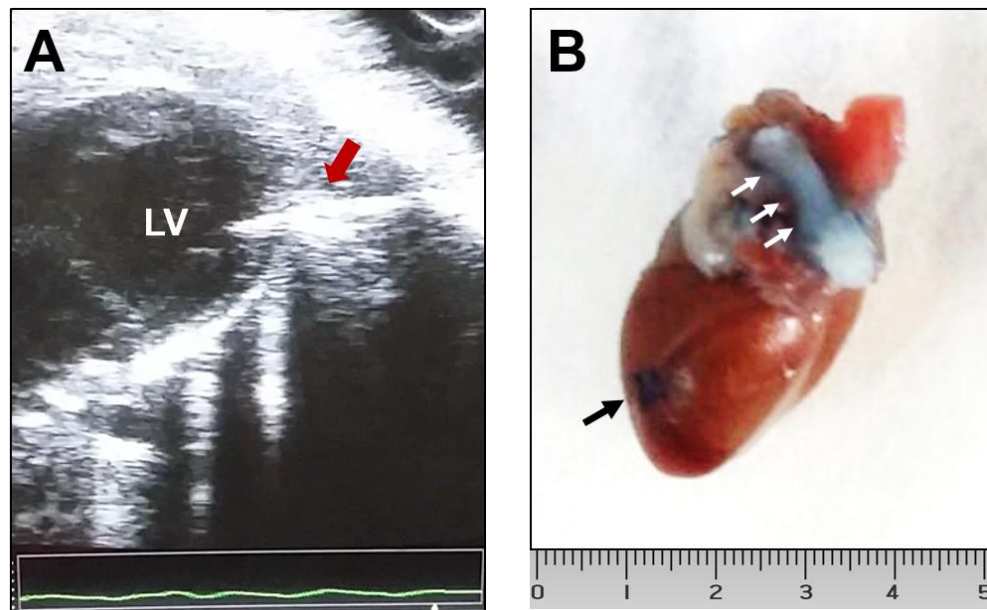


Fig. 4. Ultrasound-guided transthoracic injection of liposomes in ISO-infarcted mouse heart. LV short-axis echocardiography view of injected myocardium with needle reaching the anterior myocardial wall (A, red arrow). Injection point at epicardium (B, black arrow) and tissue distribution of Evan's blue dye towards aorta (B, white arrows). LV: left ventricle; scale in cm.

In the present study, zones with inflammatory infiltrates at different levels as a function of particle size of injected liposomes were observed in the heart of treated mice (Fig. 6C). Inflammatory cells were quantified in heart sections and no significant differences were found between hydrogel vehicle, Rhod-Lipo₁₆₅ and Rhod-Lipo₄₆₈ groups compared with the control group. On the other hand, the administration of large liposomes (Rhod-Lipo₁₅₅₁, Rhod-Lipo₁₉₅₄) evidenced a statistically significant increase of inflammation ($p < 0.0001$) (Fig. 7). For all liposome sizes, negligible fibrosis was visualized in tissue sections by PSR staining (not shown). Thus, the levels of inflammation induced by liposomes with 165 or 468 nm turn them suitable for safe intramyocardial delivery.

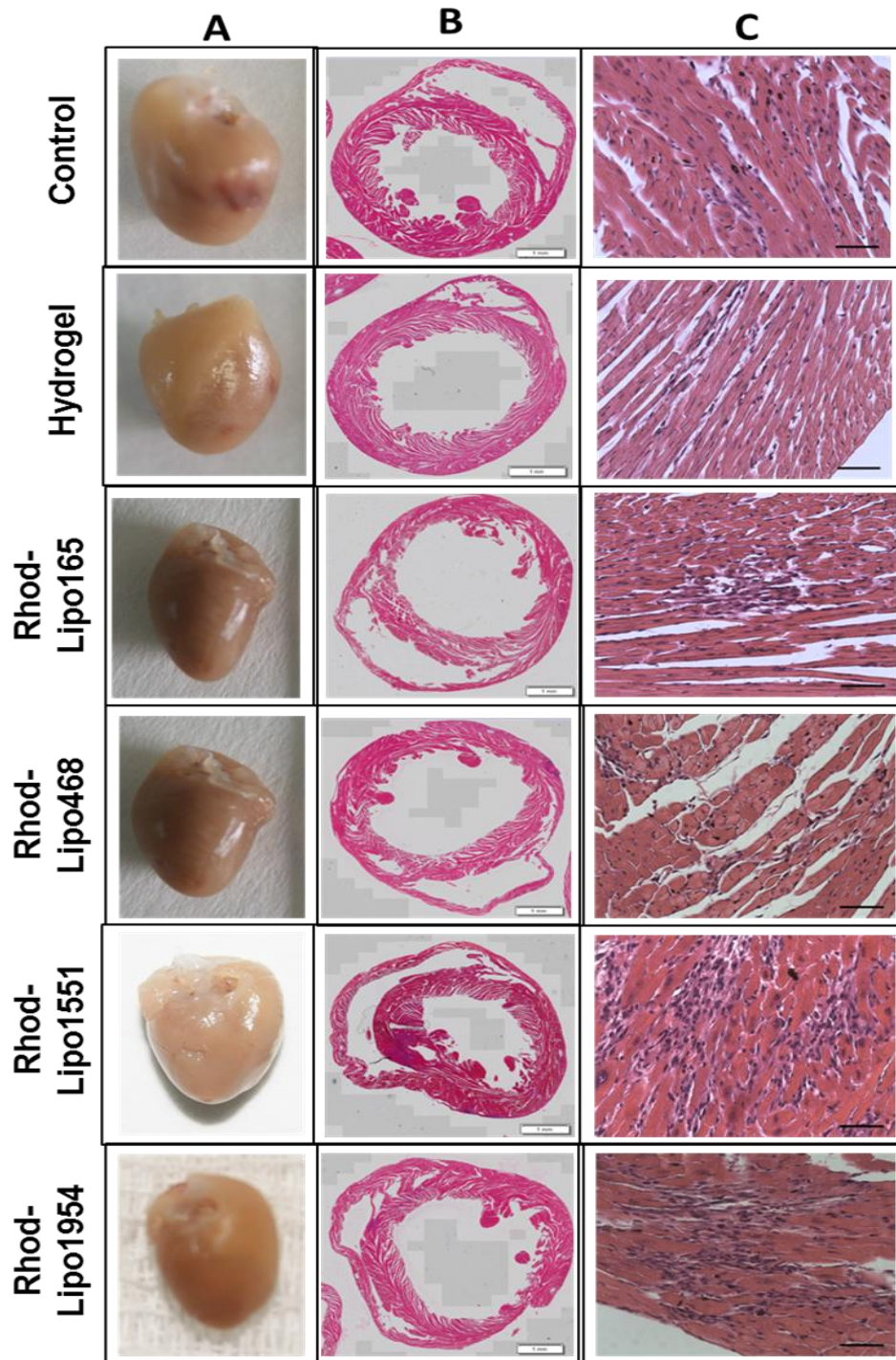


Fig. 5. (A) Macroscopic view of hearts 3 days post-injection of hydrogel and liposomes with different mean size diameter (165, 468, 1551 and 1954 nm) and control. (B, C). Representative photomicrographs of H&E-stained heart sections for tissue structure and inflammation assessment, respectively. White bars: 1 mm; black bars: 50 μ m.

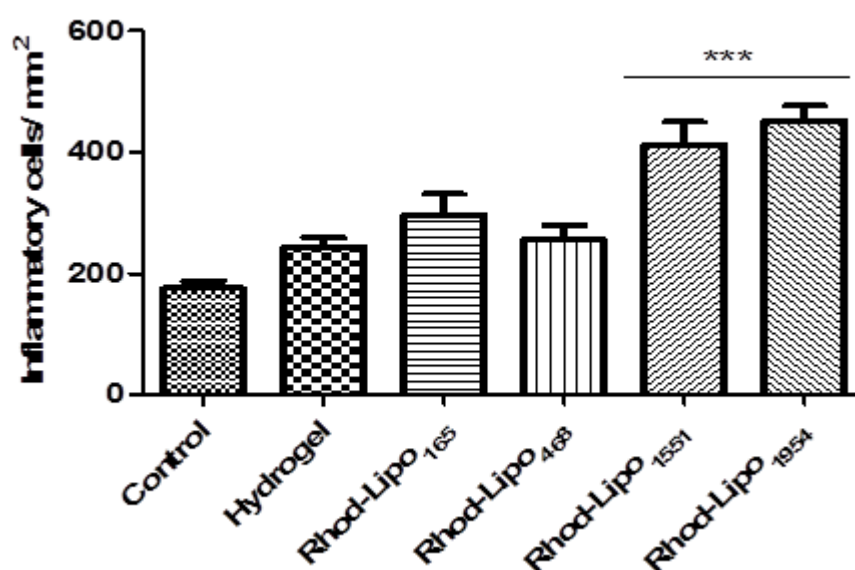


Fig. 6. Analysis of total inflammatory cell infiltration on heart tissue quantified on 10 fields/heart (40× magnification). *** $p < 0.001$ vs. control.

Heart retention of rhodamine-labeled liposomes was confirmed by fluorescence microscopy, indicating their ability to remain in the myocardium for 72 h. More intense fluorescence was observed on heart tissue injected with 468 nm-sized liposomes (Fig. 8). Correlating fluorescence microscopy findings with histological analysis, Rhod-Lipo-468 is a promising candidate for cardiac delivery of biopharmaceuticals. Recently, Allijin and colleagues showed a retention of pegylated liposomes (110 nm, i.v.) at 3 days after MI in mice, but a partial uptake of liposomes by macrophages was detected by fluorescence microscopy [42]. In our study, the smallest liposomes (Rhod-Lipo 165) did not achieve a satisfactory retention in the myocardium, suggesting an uptake by local macrophages.

In an elegant strategy, Dvir and colleagues [40] reported an accumulation of labeled PEGylated and targeted-liposomes to angiotensin II receptor (142 ± 8 nm) after 24 h post i.v. injection in infarcted mice. A few studies have investigated the retention of small liposomes (< 200 nm) in infarcted myocardium by systemic administration [19, 38-42], limiting a more

in-depth discussion with our results obtained with large liposomes administered by intramyocardial route.

A different scenario is presented on the case of nano and micro polymeric delivery systems to heart by intramyocardial route [16, 43]. 5 μm -sized PLGA particles were compatible with an intramyocardial administration in a rat model of cardiac acute ischemia-reperfusion [28]. Recently, PLGA nanoparticles (190 ± 49 nm) were administered by a minimally invasive procedure in the pericardial space in rabbits, reaching prolonged retention (half-life of ~ 2.5 days) in the entire heart [44]. This technique of cardiac drug delivery is advantageous because avoid surgery, amplifying the translational clinical trials. These attributes were also provided by ultrasound-guided transthoracic injection of liposomes in our study, which demonstrated a slightly longer retention time (3 days).

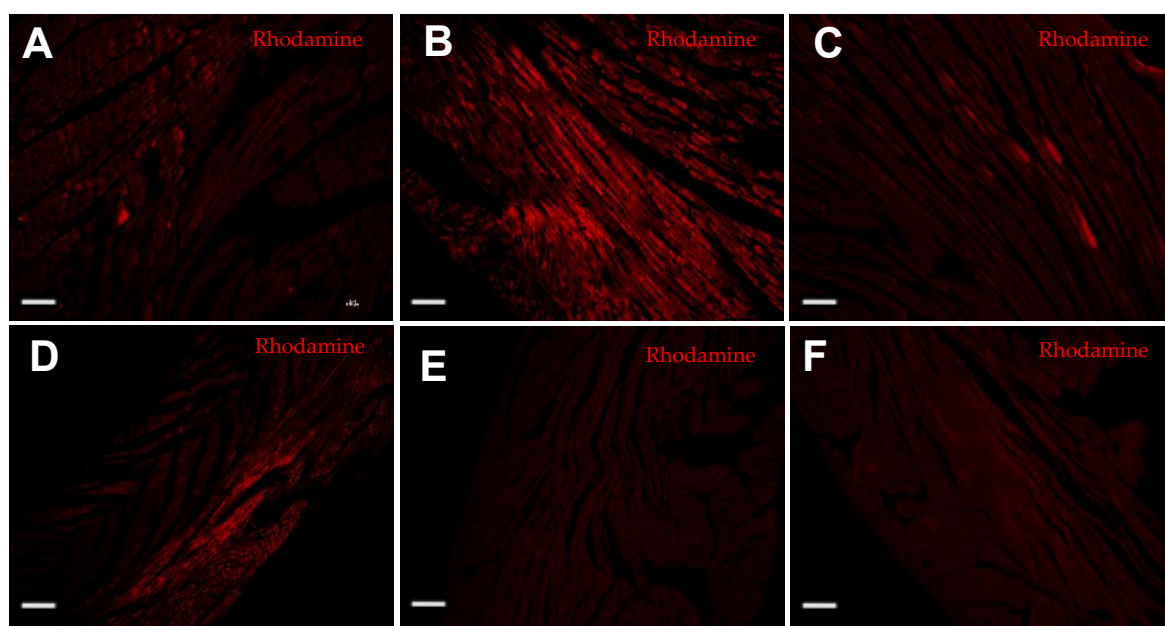


Fig. 7. Myocardium retention of rhodamine-labeled liposomes of various sizes: 165 nm (A); 468 nm (B); 1551 nm (C) and 1954 nm (D,) by fluorescence microscopy; hydrogel (E) and untreated control mice (F). Scale bars=200 μm (20 $\times$ magnification).

Finally, the present work sought to investigate the potential of liposomes as potential platforms for delivery of biopharmaceuticals into the injured myocardium. Using an experimental model of MI induced by isoproterenol in mice, we set up an ultrasound-guided injection of liposomes with different sizes into myocardium, which provided a minimally invasive method to achieve successfully heart tissue.

4. Conclusions

Take into account the limitations of current methods for myocardial delivery, this study demonstrates the feasibility of cardiac delivery of liposomes in a convenient and non-surgical manner using an echocardiography apparatus. Our results demonstrate the *in vitro* compatibility, heart retention and myocardial safety of 468 nm-sized liposomes. These findings remarkably indicate the potential of liposomes as versatile carriers of biopharmaceuticals for intracardiac delivery, supporting the development of further research on lipidic delivery systems for heart disease.

Acknowledgments

The authors are grateful to Brazilian Ministry of Science and Technology MCTI (SisNANO/LARNano-UFPE, CNPq # 402282/2013-2, CNPq # 461865/2014-9), Foundation of Research and Technology Development of the State of Pernambuco- FACEPE (PhD scholarship IBPG # 0165-2, AMD # 0211 - 2.00/15), Foundation for Research Support of the State of Bahia- FAPESB (# JCB0018/2016), Hospital São Rafael and FIOCRUZ.

References

- [1] Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013, *Lancet*. 385 (2015) 117-71.
- [2] C.J. Murray, et al, Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition, *Lancet*. 386 (2015) 2145-91.
- [3] C.D. Mathers, D. Loncar, Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030, *PLoS Med*. 3 (2006) e442.
- [4] C.J. Murray et al., Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet*. 380 (2012) 2197-223.
- [5] S. Zbinden et al., Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for collateral growth promotion in patients with coronary artery disease, *J Am Coll Cardiol*. 46 (2005) 1636-1642.
- [6] J.L. Anderson, D.A Morrow, Acute Myocardial Infarction, *N Engl J Med*. 376 (2017) 2053-2064.
- [7] M.C. Scimia, A.M. Gumpert, W.J. Koch, Cardiovascular gene therapy for myocardial infarction, *Expert Opin Biol Ther*. 14 (2014) 183-95.
- [8] V.F. Segers, R.T. Lee, Stem-cell therapy for cardiac disease, *Nature*. 451 (2008) 937-42.
- [9] J.P. Sluijter et al., Novel therapeutic strategies for cardioprotection, *Pharmacol Ther*. 144 (2014) 60-70.
- [10] H. Hwang, R.A. Kloner, The combined administration of multiple soluble factors in the repair of chronically infarcted rat myocardium, *J Cardiovasc Pharmacol*. 57 (2011) 282-6.
- [11] K.A. Gerbin, C.E. Murry, The winding road to regenerating the human heart, *Cardiovasc Pathol*. 24 (2015) 133-40.
- [12] S.T. Ji et al., Promising Therapeutic Strategies for Mesenchymal Stem Cell-Based Cardiovascular Regeneration: From Cell Priming to Tissue Engineering, *Stem Cells Int*. 2017 (2017) 3945403.
- [13] F.R. Formiga et al., Angiogenic therapy for cardiac repair based on protein delivery systems, *Heart Failure Reviews*. 17 (2012) 449-73.
- [14] S. Pascual-Gil et al., Heart regeneration after myocardial infarction using synthetic biomaterials, *J Control Release*. 203 (2015) 23-38.

- [15] J.C. Garbern et al., Delivery of basic fibroblast growth factor with a pH-responsive, injectable hydrogel to improve angiogenesis in infarcted myocardium, *Biomaterials*. 32 (2011) 2407-16.
- [16] F.R. Formiga et al., Controlled delivery of fibroblast growth factor-1 and neuregulin-1 from biodegradable microparticles promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model through activation of endogenous regeneration, *J Control Release*. 173 (2014) 132-9.
- [17] S. Pascual-Gil et al., Tracking the in vivo release of bioactive NRG from PLGA and PEG-PLGA microparticles in infarcted hearts, *J Control Release*. 22 (2015) 388-396.
- [18] X. Wang et al., PCM and TAT co-modified liposome with improved myocardium delivery: in vitro and in vivo evaluations, *Drug Deliv*. 24 (2017) 339-345.
- [19] S.S. Dasa et al., Development of target-specific liposomes for delivering small molecule drugs after reperfused myocardial infarction, *J Control Release*. (2015).
- [20] Y. Tang et al., Targeted delivery of vascular endothelial growth factor improves stem cell therapy in a rat myocardial infarction model, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*. 10 (2014) 1711-1718.
- [21] T.S. Levchenko, W.C. Hartner, V.P. Torchilin, Liposomes in Diagnosis and Treatment of Cardiovascular Disorders, *Methodist Debaque Cardiovasc J*. 8 (2012) 36-41.
- [22] T.W. Prendiville et al., Ultrasound-guided transthoracic intramyocardial injection in mice, *J Vis Exp*. 90 (2014) e51566.
- [23] D. Mason et al., Cardiac gene therapy: Recent advances and future directions, *J Control Release*. 215 (2015) 101-11. 23
- [24] M. Cheraghi, B. Negahdari, H. Daraee, A. Eatemadi et al., Heart targeted nanoliposomal/nanoparticles drug delivery: An updated review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 86 (2017) 316–323.
- [25] P. C. C. PITA et al., Bacterial cellulose hydrogel is biocompatible, integrating the subcutaneous tissue of rabbits and inducing tissue remodeling, *Acta Cirúrgica Brasileira*, 30 (2015).
- [26] F. C. M. PINTO et al., Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses, *Carbohydrate Polymers*, 137 (2016) 556–560.
- [27] M.C.B. Lira et al., In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation, *J Liposome Res* 19 (2009) 49–58.

- [28] F.R. Formiga et al., Biodegradation and heart retention of polymeric microparticles in a rat model of myocardial ischemia, *Eur J Pharm Biopharm.* 85 (2013) 665-72.
- [29] T.N. Khatua et al., Garlic provides protection to mice heart against isoproterenol-induced oxidative damage: role of nitric oxide, *Nitric Oxide.* 27 (2012) 9-17.
- [30] K. Mnafigui et al., Protective Effect of Hydroxytyrosol Against Cardiac Remodeling After Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rat, *Cardiovasc Toxicol.* 16 (2016) 147-55.
- [31] ISO10993-5, Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 3rd ed (2009).
- [32] A. Hardiansyah et al., Hydrophobic Drug-Loaded PEGylated Magnetic Liposomes for Drug-Controlled Release, *Nanoscale Research.* 12(2017) 12:355. 26
- [33] D. Guzman-Villanueva, M.R. Mendiola, H.X. Nguyen, V. Weissig, Influence of Triphenylphosphonium (TPP) Cation Hydrophobization with Phospholipids on Cellular Toxicity and Mitochondrial Selectivity, *SOJ Pharm Sci.* 2 (2015) 1-9.
- [34] S. Kirdponpattara et al., Structural modification and characterization of bacterial cellulose–alginate composite scaffolds for tissue engineering, *Carbohydrate Polymers.* 132 (2015) 146–155.
- [35] J. Ye et al., A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality, *Mol Cell Biochem.* 176 (1997) 227-33.
- [36] J.C. George, A. Liner, B.D. Hoit, Isoproterenol-induced myocardial injury: a systematic comparison of subcutaneous versus intraperitoneal delivery in a rat model, *Echocardiography.* 27 (2010) 716-21.
- [37] E. Gao et al., A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse, *Circ Res.* 107 (2010) 1445-53.
- [38] M.J. Lipinski et al., Multimodality imaging demonstrates trafficking of liposomes preferentially to ischemic myocardium, *Cardiovasc Revasc Med.* 17 (2016) 106-12.
- [39] R.C. Scott et al., Targeting VEGF-encapsulated immunoliposomes to MI heart improves vascularity and cardiac function, *FASEB J.* 23 (2009) 3361-7
- [40] T. Dvir et al., Nanoparticles targeting the infarcted heart, *Nano Lett.* 11 (2011) 4411-4.
- [41] V.J. Caride, J. Twickler, B.L. Zaret, Liposome kinetics in infarcted canine myocardium, *J Cardiovasc Pharmacol.* 6 (1984) 996-1005.
- [42] I.E. Allijn et al., Liposome encapsulated berberine treatment attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction, *Journal of Controlled Release.* 247 (2017) 127–133.

- [43] F.R. Formiga et al., Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia–reperfusion model, *J Control Release*. 147 (2010) 30–37.
- [44] V. Segura-Ibarra et al., Nanoparticles administered intrapericardially enhance payload myocardial distribution and retention, *J Control Release*. 262 (2017) 18–27.

3.3 PREPARATION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* BIOLOGICAL ACTIVITY OF LIPOSOMES CONTAINING RECOMBINANT HUMAN FGF-2 INTENDED FOR MYOCARDIAL DELIVERY

Laís de Macedo Ferreira Santos¹, Helenita Costa Quadros², Cássio Santana Meira^{2,3}, Rafaela de Siqueira Ferraz-Carvalho¹, Milena Botelho Pereira Soares^{2,3}, William de Castro Borges⁴, Fabio Rocha Formiga^{2,5*}, Nereide Stela Santos-Magalhães^{1,*}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brazil;

² Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador/BA, Brazil;

³ Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador/BA, Brazil;

⁴ Laboratório de Enzimologia e Proteômica, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto/MG, Brazil;

⁵ Laboratório de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife/PE, Brazil.

* Shared senior authorship.

Corresponding Authors:

Profa. Dra. Nereide Stela Santos-Magalhães, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife/PE, Brazil. Tel: + 55 81 21268587; Fax: +55 81 21268485. E-mail: nssm@ufpe.br; Prof. Dr. Fabio Rocha Formiga, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP 40296-710, Salvador/BA, Brazil. Tel. +55 71 3176 2211. E-mails: fabio.formiga@fiocruz.br; fabio.formiga@upe.br.

Abstract

Growth factor-based therapy has emerged as a novel approach for treatment of ischemic heart disease (IHD). Basic fibroblast growth factor (FGF-2) has been identified as a potent angiogenesis inducer besides to induce to differentiation of cardiac progenitor cells in cardiomyocytes. Although administration of FGF-2 has been shown to be beneficial for treating IHD, the clinical potential of FGF-2 is limited by its short half-life, low plasma stability and low retention in the heart tissue. In this study, FGF-2-loaded liposomes were developed as a formulation approach for improving cardiac delivery of FGF-2. For that, the method of hydrating the lipid film was used to prepare liposomes, which were optimized by extrusion. Liposomal formulations were characterized by particle size, zeta potential, morphology and entrapment efficiency. Protein integrity and *in vitro* biological activity of FGF-2 associated to liposomes were also determined. Reproducible batches of empty liposomes with 700 nm were obtained. Next, FGF-2 was successfully encapsulated into optimized liposomes (entrapment efficiency ca. 60%). TEM analysis revealed spherical liposomes with uniform dispersion. Incorporation of FGF-2 into liposomes did not change their particle size and surface charge. SDS-PAGE indicated maintenance of FGF-2 integrity following its encapsulation into liposomes. Corroborating with this finding, FGF-2 released from liposomes was biologically active, as determined by endothelial cell line proliferation assay. Taken together, these data demonstrate the feasibility of formulating FGF-2 in liposomes. This strategy can be considered as a significant step towards the pre-clinical evaluation of FGF-2 delivered by liposomes in an animal model of myocardial injury.

Keywords: FGF-2; liposomes; protein delivery; nanotechnology

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) remain the leading cause of death worldwide (Roth et al. 2015). Among CVD, Ischemic heart disease (IHD) presenting high mortality rates, as well as high economic impact (Thom et al. 2006). The current therapies of myocardial ischemia include interventions that reduce myocardial oxygen demand or increase blood supply to compromised areas (Lerman et al. 2016). To increment the blood perfusion in the myocardium at risk, therapeutic angiogenesis has emerged as a promising approach to the treatment of myocardial injury (Henning 2016). The rationale behind the use of proangiogenic growth factors is the complex process involving endothelial and smooth muscle cell proliferation, migration and formation of new capillaries (Laham and Simons, 1999). Consequently, tissue homeostasis and contractile pattern would be restored, leading to an improvement of cardiac function.

A number of cytokines and growth factors modulate angiogenesis *in vitro* and *in vivo* in a paracrine manner. Among these factors, basic fibroblast growth factor (FGF-2) has been identified as a potent angiogenesis inducer, which has been implicated in cell proliferation, survival, and differentiation (Chu et al. 2013; Presta et al. 2005; Rosenblatt-velin et al. 2005). In the heart, the administration of FGF-2 showed to exert a protective effect on cardiomyocytes. In addition, FGF-2 acts as survival factor on endothelial cells and vascular smooth muscle cells (Murakami and Simons 2008). Besides its angiogenic activity, FGF-2 modulates mobilization and differentiation of resident cardiac precursors (Rosenblatt-velin et al. 2005). Preda and colleagues also reported that FGF-2-stimulated mesenchymal stem cells better engraft within myocardial cells after transplantation (Preda et al. 2015).

The pleiotropic effects of FGF-2 and its multifunctional role on cardiac repair have positioned this biologic as promising factor for heart regeneration. Indeed, FGF-2 has been

reported to confer cardioprotection in a variety of animal models (Laham et al. 2000; Li et al. 2010; Zhang et al. 2011) and has been shown to be beneficial for treating ischemic conditions in clinical trials (Laham et al. 2000; Laham et al. 1999; Ruel et al. 2002). However, the therapeutic value of FGF-2 is limited by its short half-life, low plasma stability and low specificity to myocardium after bolus injection (Aviles, Annex, and Lederman 2003; Xiang et al. 2011). Thus, the clinical use of FGF-2 depends on new formulation technologies able to increase its half-life, maintain its bioactivity, and control its local delivery in the myocardium.

Among the targeting carriers, liposomes have attracted increasing attention as efficient drug delivery systems for a variety of therapeutics (Jose et al. 2018; Moreno et al. 2015; Pattni, Chupin, and Torchilin 2015), with ability to increase efficacy and reduce systemic side effects. As spherical vesicles with a lipid bilayer membrane structure, liposomes can incorporate and protect small molecule drugs, nucleotides, proteins, imaging agents, etc (Cuomo et al. 2013; Moreno et al. 2015; He et al. 2018). Of note, the accumulation of liposomes in the infarcted heart tissue has been demonstrated (Verma et al. 2005; Allijn et al. 2017). These studies established the feasibility of liposomes to overcome the low bioavailability of therapeutics in the injured myocardium.

In this study, we present the data on the preparation, characterization and *in vitro* biological activity of liposomes containing recombinant human FGF-2 intended for myocardial delivery. This strategy can be considered as a significant step towards the pre-clinical evaluation of FGF-2 delivered by liposomes in an animal model of myocardial injury.

2. Material and Methods

2.1 Preparation and optimization of FGF-2 loaded liposomes

Liposomes were prepared by the method of hydrating the lipid film (Narayan et al. 2016) using the lipids soybean phosphatidylcholine (PC) Lipoid S 100® (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany) and cholesterol (CH) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) at 120 μ M and 8:2 ratio PC:CH. These constituents were solubilized in a mixture of chloroform: methanol 3:1_{v/v} under magnetic stirring. For fluorescence-labeled liposomal formulations, rhodamine B isothiocyanate (Sigma-Aldrich, 0.5 mg/mL) was added to the lipid composition. Rhodamine B was added to the vesicles to future performs retention tests *in vivo* for a longer period (between 7 and 30 days) than previously studied by our research group.

The solvents were removed by vacuum evaporation for 30 min at 37 ± 1 °C, resulting in a thin lipid film. Next, the film was hydrated with 2 mL of phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4 resulting in large multilamellar vesicles (MLV).

In order to produce liposomes in the size range 400 – 700 nm for better retention on cardiac tissue (unpublished results), a study of optimization was performed. For that, MLVs were subjected to repetitive extrusion using filter membranes with pore size of 0.6 and/or 1.0 μ m at 50 psi through a LipexTM extruder (Northern Lipids Inc., Burnaby, Canada).

Liposomes containing FGF-2 (FGF-2-Lipo) were prepared by the thin lipid film method as described above using optimized conditions. Prior to encapsulation, human recombinant FGF-2 (17.3 kDa, 155 aa, Creative BioMart, Shirley, EUA) was reconstituted in PBS containing 0.1% BSA. Next, an aliquot with 10 μ g of FGF-2 was used to hydrate the thin lipid film, resulting in FGF-2-loaded vesicles. The same procedure was used to prepare empty liposomes.

2.3 Liposome characterization

2.2.1 Analyses of Size, PDI and zeta potencial

Liposomes were characterized in terms of particle size by dynamic light scattering (DLS) technique. Zeta potential was measured by electrophoretic mobility techniques. Both measurements were performed on a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK) at fixed detection angle of 90° and temperature of 25°C.

2.2.2 Liposome imaging

The morphology of liposomes was analyzed by transmission electron microscopy (TEM) using a JEM 1230 microscope (Jeol LTD, Japan) operating at 80-100 kV. Briefly, samples were prepared by applying an aliquot of liposomes (diluted 1:10) on copper-carbon grids and allowed to dry for two minutes. After removing the excess dispersion in filter paper, samples were stained with 2% uranyl acetate solution and dried overnight.

Liposomes were viewed under light microscope (DMi8 Leica, Mannheim, Germany) connected to a digital capture system.

2.3 FGF-2 encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency was determined by ultrafiltration method according to Xiang et al. (2011) with modifications. Using Vivaspın® tubes (300 K, Sartorius), the liposomal suspension (diluted with PBS 1:10) was centrifuged at 5000 rpm for 20 min at 4 °C (Megafuge 16R, Heraeus). The amount of FGF-2 in ultra-filtered portion representing the free FGF-2 was assayed by ELISA. For quantifying the total amount of FGF-2, PBS diluted liposomes (1:10) were mixed with 900 µl of chloroform (1:4) and centrifuged at 8000 rpm

and 4 °C for 20 min. This procedure allowed breakage of liposomes for FGF-2 extraction, which was determined by ELISA following the manufacture's protocol. A specific ELISA kit for FGF-2 (#DEIA156) with detection range 15.625-1,000 pg/ml was supplied by Creative Diagnostics (Shirley, NY, EUA). The entrapment efficiency (EE%) was calculated using the following equation:

$$EE\% = \frac{[Total\ amount\ of\ FGF2 - amount\ of\ free\ FGF2]}{Total\ amount\ of\ FGF2} \times 100$$

2.4 SDS-PAGE

FGF-2 encapsulated into liposomes were analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining under reducing conditions. For that, protein extraction was performed using the procedure for quantifying the total amount of FGF-2 as described above, with previous separation of free FGF-2 from the liposomal dispersion. Samples were charged into 18% polyacrylamide gels. For protein ladder and FGF-2 standard, gels were stained with Coomassie Blue.

2.5 Bioactivity assay

Assessment of biological activity of FGF-2 released from liposomes was performed by determining the proliferative capacity of a human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). Previously, cells were cultured in RPMI-1640 (LGC Biotecnologia, Cotia-SP, Brazil) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas-SP, Brazil) and 50 µg/ml gentamicin (Novafarma, Anápolis-GO, Brazil) at 37°C and 5% CO₂ atmosphere.

HUVECs were plated into 96-well culture plates at a density of 3×10^3 cells/well and maintained with 10% FBS. After 24 h, FBS was reduced to 5% and the cells were maintained

for additional 24 hours. Then, cells were incubated with the following treatments: liposomal dispersion containing FGF-2; Free FGF-2; standard FGF-2 in buffer solution. All samples containing FGF-2 were normalized for 50 ng/ml (Bai et al., 2018). RPMI-1640 medium was used as control. After incubation at 37°C and 5% CO₂ for 24 h, cell proliferation in each group was measured spectrophotometrically at 570 and 600 nm using the Alamar Blue® Cell Viability Assay. The assay was performed in duplicate.

2.6 Statistical analysis

For cell proliferation in the bioactivity assay, differences between data sets were determined by ANOVA using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Values are given as mean $\pm$ standard deviation. Normal distribution of values was assessed by the Shapiro–Wilk test. Where differences were detected, a Tukey post-test was used to test for significance between groups. For liposome characterization, differences between data sets were determined by *Student's t-test*. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

1.1 Optimization of liposomes and morphology

In this study, liposomes loaded with FGF-2 were developed using the thin lipid film method as a formulation step towards *in vivo* evaluation. Previously, we investigated the biocompatibility and retention of liposomes in a mice model myocardial infarction. From these studies, 468 nm-sized liposomes exhibited lower inflammation and greater tissue

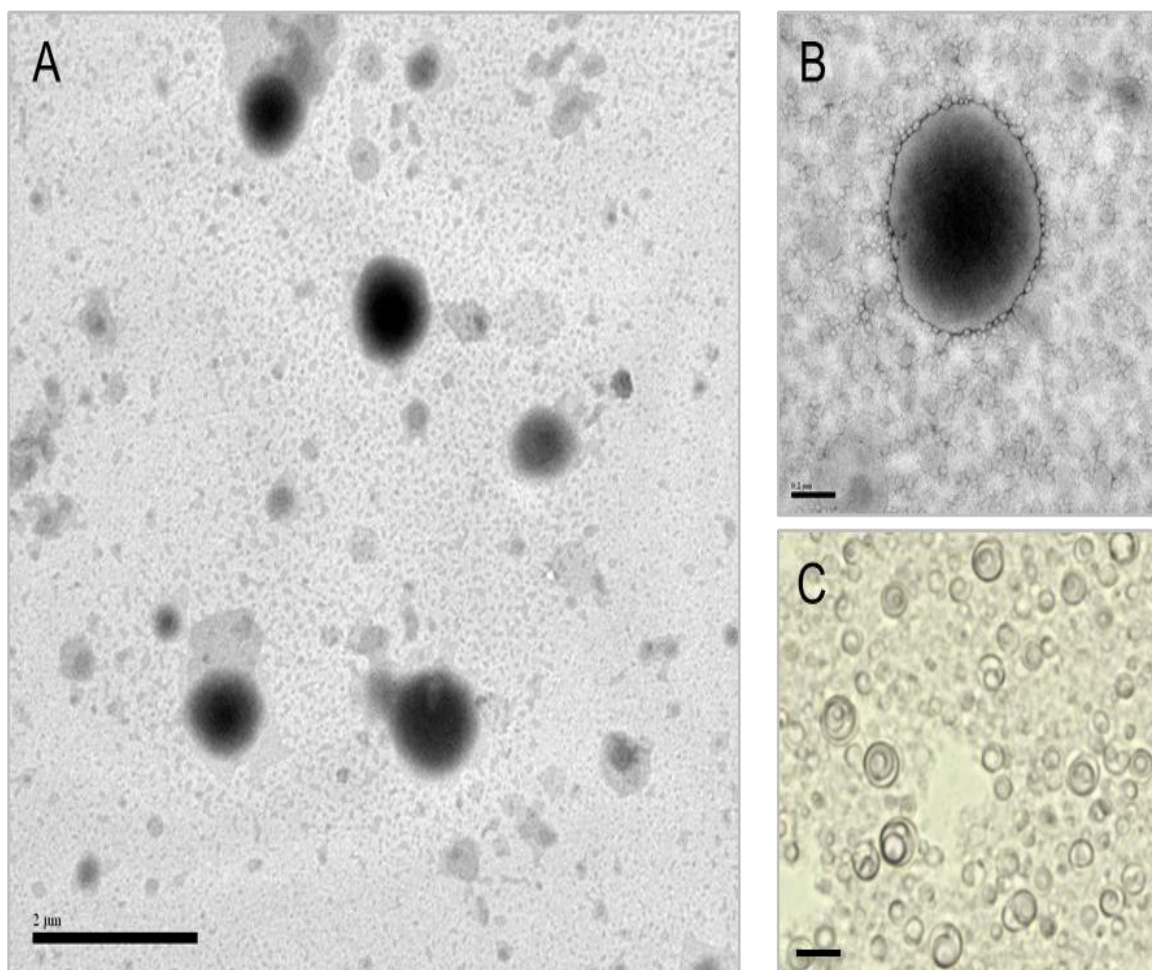
retention 72 h post-injection (unpublished data). Then, liposomes with diameter around 500 nm were considered for FGF-2 encapsulation. In the optimization process, two protocols were evaluated for its ability to produce reproducible batches with suitable particle size and size distribution. The effect of rhodamine incorporation upon these parameters was also examined. As shown in Table 1, liposomes underwent consecutive extrusions with membranes of 0.6 μm for 10 times, resulted in vesicles from 242 and 476 nm. Thus, non-reproducible batches were obtained using the Protocol 1, which presented $\sim 45\%$ particle size variability among the batches. On the other hand, liposomes were extruded with membrane of 1 μm for 5 cycles, resulting in vesicles around 700 nm. Although the liposome size had increased, reproducible batches with much lower variability (ca. 13%) in particle size were produced, even containing rhodamine. Hwang et al. reported preparation of 600 nm-sized liposomes by extrusion, which presented high particle size distribution (622 ± 249 nm) (Hwang et al. 2016).

Table 1. Results of liposome optimization by extrusion

Protocol 1				
Batch	Constitution	Membrane / n° Cycles	Size ± SD (nm)	PDI
1	PC:CH:Rhod	0.6 μm/10x	434.4 ± 102.1	0.208
2	PC:CH:Rhod		241.9 ± 6.5	0.178
Protocol 2				
Batch	Constitution	Membrane / n° Cycles	Size ± SD (nm)	PDI
1	PC:CH	1 μm/5x	716.5 ± 65.8	0.131
2	PC:CH:Rhod		664.4 ± 27.7	0.172
3	PC:CH:Rhod		768.3 ± 15.8	0.257

PC: soybean phosphatidylcholine; CH: cholesterol; Rhod: rhodamine; PDI: polydispersity index. $n=3$

The morphology of optimized liposomes was observed by TEM which revealed spherical with uniform dispersion (Fig. 1A-B). Before extrusion process, MLVs were nonuniform with



several layers that are characteristic of multilamellar vesicles (Fig. 1-C) (Nallamotheu et al. 2006).

Fig. 1. Morphology of liposomes and MLVs. TEM images of optimized liposomes (A, bar = 2 μm; B, bar = 0.2 μm). Light microscope image of MLVs (C, bar = 10 μm, 100× magnification).

3.2 Characterization of FGF-2-loaded liposomes and SDS-PAGE

For the growth factor-loaded liposomes (FGF-2-Lipo), characterization results are shown in Table 2. These data can be compared with empty liposomes (Lipo) or liposomes containing rhodamine (Rhod-Lipo) for further *in vivo* studies. The results revealed that no significant changes on sizes and surface charges were observed following the FGF-2 incorporation into liposomes. While Lipo presented 748 nm, FGF-2-Lipo had about 739 nm ($p>0.05$). Of note, a lower PDI was determined FGF-2-Lipo. All liposomes showed neutral charged, with zeta potential of -4.23 ± 0.38 and -5.62 ± 2.18 for empty and FGF-2 liposomes, respectively ($p>0.05$). These values indicate FGF-2 was not adsorbed to the liposome surface, which can be assumed as probably encapsulated into liposomes. In fact, it was confirmed with an encapsulation efficiency of $59.3 \pm 8.2\%$. This percent entrapment was similar that reported by Xiang et al., who also used the ultrafiltration method to separate free FGF-2 and liposomes (Xiang et al. 2011). This method allows complete separation between the liposomes and free drug in comparison with other procedures such as gel column method and dialysis method, which are limited due to low drug content determination (Xiang et al. 2011; Zhao et al., 2008).

Very few studies encapsulating FGF-2 into liposomes were reported, but they have not been intended for myocardial ischemia. Yang et al. developed FGF-2-loaded liposomes for inducing neuroprotective effects in Parkinson's disease. An entrapment efficiency of 86% was achieved by using the pH gradient method adding octadecylamine to improve stability of liposomes (Yang et al. 2016). In other strategy, liposome with hydrogel core of silk fibroin was developed as a FGF-2 formulation for wound healing. Variable encapsulation efficiencies were achieved by reverse phase evaporation method (Xu et al. 2017). Regarding other

nanocarriers, FGF-2 has been formulated in chitosan nanoparticles, but low encapsulation efficiency $\sim 27\%$ was determined (Cetin et al. 2007).

Table 2.

Characterization data of empty, rhodamine and FGF-2 liposomes

Formulation	Size $\pm$ SD (nm)	PDI	$\zeta \pm$ SD (mV)	Entrapment efficiency (%)	Growth factor loading capacity (μg/ml)
Lipo	748.1 $\pm$ 100.8	0.202	-4.2 ± 0.38	-	-
Rhod-Lipo	716.4 $\pm$ 73.5	0.214	-10.8 ± 0.15	-	-
FGF-2-Lipo	738.7 $\pm$ 164.8	0.146	-5.6 ± 2.18	59.3 $\pm$ 8.2	2.96 $\pm$ 0.4

Lipo: empty liposomes; Lipo Rhod: liposomes containing rhodamine; Lipo FGF-2: liposomes loaded with FGF-2; ζ : zeta potential.

The quality of the protein formulation process in micro- and nanocarriers can be investigated by SDS-PAGE (Formiga et al. 2014; Xu et al. 2017). In this work, FGF-2 after liposome formulation was observed by SDS-PAGE, as shown in Fig. 2. A specific band corresponding to FGF-2 extracted from liposomes appears at ~ 17 kDa (lane 2), indicating maintenance of FGF-2 integrity following its encapsulation into liposomes. Notably, no multiple bands were detected in lane 2, which indicates FGF-2 was successfully protected from degradation or aggregation by liposomes.

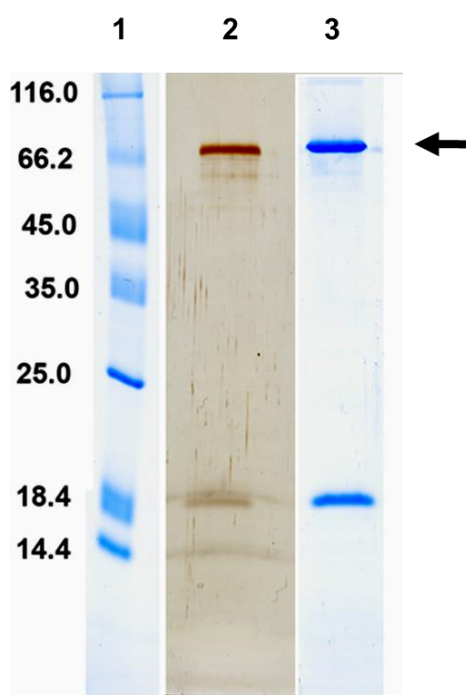


Fig. 2. Protein integrity assessment by SDS-PAGE of FGF-2. Lanes: 1- Protein ladder, 2- FGF- extracted from liposomes, 3- FGF-2 standard. Gel stained with Silver Stain (Lane 2). Arrow indicates BSA added during FGF-2 reconstitution.

1.2 Bioactivity assay

To assess whether FGF-2-loaded liposomes retained their bioactivity *in vitro*, their ability to induce proliferation in HUVECs was determined. This cell line responds to bioactive FGF-2 by proliferating and assembling a tube-like pattern (Arnaoutova and Kleinman 2010). Bioactivity of growth factor associated to a microformulation (microsphere and microparticles) as previously investigating using the HUVEC proliferation assay (Bai et al. 2018; King and Patrick 2000; Simón-Yarza et al. 2013).

In this study, HUVECs responded to FGF-2-based treatments, namely, liposomal suspension containing FGF-2, ultra-filtered portion/free FGF-2 and exogenous standard protein (50

ng/ml). The results are expressed as fold-increase proliferation rate normalized to RPMI medium control (no mitogen added) (Fig. 3). The cells exposed to exogenous FGF-2 or liposomal suspension loaded with FGF-2 showed similar rate of proliferation. Interestingly, free FGF-2 separated from liposomes induced an increase in proliferation of HUVEC > 1.5-fold in comparison with control. The FGF-2 contained in liposomes was as potent as exogenously added FGF-2. Despite this increment in proliferation by free-FGF-2, there were no significant differences between all FGF-2-based treatments ($p>0.05$). But they induced significant stimulation in HUVECs compared with medium alone ($p<0.0001$). It is note, liposomes did not cause reduction on cell viability or toxicity, which demonstrates their *in vitro* biocompatibility. These results demonstrated that the encapsulated FGF-2 was biologically active.

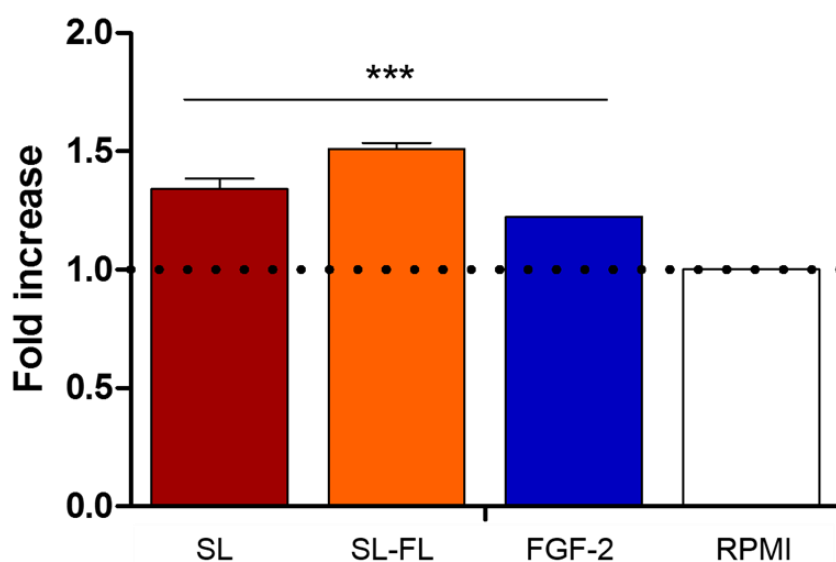


Fig. 3. Bioactivity assay. HUVECs were treated with liposomal suspension containing FGF-2 (FGF-2 Lipo), free FGF-2 and exogenous standard protein (FGF-2). All FGF-2 treatments at 50 ng/ml. RPMI medium served as control. *** $p<0.0001$ vs. RPMI.

4. Conclusions

Liposomes prepared by the method of hydrating the lipid film were optimized to receive FGF-2 as a formulation step for further therapeutic benefits in myocardial ischemia. FGF-2 was successfully encapsulated into liposomes, which were spherical and uniform vesicles with suitable physico-chemical properties. Entrapment efficiency around 60% was achieved. Importantly, FGF-2 associated to liposomes conserved its integrity and biological activity. This latter attribute was demonstrated by the capacity of liposome-derived FGF-2 samples to induce proliferation of endothelial cells *in vitro*. Collectively, these findings represent an important approach for FGF-2 delivery in the pre-clinical setting of IHD.

Acknowledgments

The authors are grateful to Brazilian Ministry of Science and Technology MCTI (SisNANO/LARNano-UFPE, CNPq # 402282/2013-2, CNPq # 461865/2014-9), Foundation of Research and Technology Development of the State of Pernambuco- FACEPE (PhD scholarship IBPG # 0165-2, AMD # 0211 - 2.00/15), Foundation for Research Support of the State of Bahia- FAPESB (# JCB0018/2016) and FIOCRUZ (Call Piap+ IGM 001/2017). +

References

- Allijn, Iris E., Bertrand M.S. Czarny, Xiaoyuan Wang, Suet Yen Chong, Marek Weiler, Acarilia Eduardo da Silva, Josbert M. Metselaar, et al. 2017. "Liposome Encapsulated Berberine Treatment Attenuates Cardiac Dysfunction after Myocardial Infarction." *Journal of Controlled Release* 247. Elsevier B.V.: 127–33.
- Arnaoutova, Irina, and Hynda K. Kleinman. 2010. "In Vitro Angiogenesis: Endothelial Cell Tube

- Formation on Gelled Basement Membrane Extract.” *Nature Protocols* 5 (4). Nature Publishing Group: 628–35.
- Aviles, Ronnier J, Brian H Annex, and Robert J Lederman. 2003. “Testing Clinical Therapeutic Angiogenesis Using Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2),” 637–46.
- Bai, Yan, Lijuan Bai, Jing Zhou, Huali Chen, and Liangke Zhang. 2018. “Sequential Delivery of VEGF, FGF-2 and PDGF from the Polymeric System Enhance HUVECs Angiogenesis in Vitro and CAM Angiogenesis.” *Cellular Immunology* 323: 19–32.
- Cetin, Meltem, Yesim Aktas, Imran Vural, Yilmaz Capan, Lale A. Dogan, Memed Duman, and Turgay Dalkara. 2007. “Preparation and in Vitro Evaluation of bFGF-Loaded Chitosan Nanoparticles.” *Drug Delivery* 14 (8): 525–29.
- Chu, Hunghao, Chien Wen Chen, Johnny Huard, and Yadong Wang. 2013. “The Effect of a Heparin-Based Coacervate of Fibroblast Growth Factor-2 on Scarring in the Infarcted Myocardium.” *Biomaterials* 34 (6). Elsevier Ltd: 1747–56.
- Cuomo, Francesca, Monica Mosca, Sergio Murgia, Pasquale Avino, Andrea Ceglie, and Francesco Lopez. 2013. “Evidence for the Role of Hydrophobic Forces on the Interactions of Nucleotide-Monophosphates with Cationic Liposomes.” *Journal of Colloid and Interface Science* 410. Elsevier Inc.: 146–51.
- Formiga, Fabio R, Beatriz Pelacho, Elisa Garbayo, Izaskun Imbuluzqueta, Paula Díaz-herráez, Gloria Abizanda, Juan J Gavira, et al. 2014. “Controlled Delivery of Fi Broblast Growth Factor-1 and Neuregulin-1 from Biodegradable Microparticles Promotes Cardiac Repair in a Rat Myocardial Infarction Model through Activation of Endogenous Regeneration.” *Journal of Controlled Release* 173. Elsevier B.V.: 132–39.
- He, Haisheng, Yi Lu, Jianping Qi, Weili Zhao, Xiaochun Dong, and Wei Wu. 2018. “Biomimetic Thiamine- and Niacin-Decorated Liposomes for Enhanced Oral Delivery of Insulin.” *Acta Pharmaceutica Sinica B* 8 (1): 97–105.
- Henning, R.J. 2016. “Therapeutic Angiogenesis: Angiogenic Growth Factors for Ischemic Heart Disease.” *Future Cardiology* 12 (5).
- Hwang, Hyosook, Hwan-seok Jeong, Phil-sun Oh, Minjoo Kim, Tai-kyoung Lee, Jeongil Kwon, Hyeon-soo Kim, Seok Tae Lim, Myung-hee Sohn, and Hwan-jeong Jeong. 2016. “PEGylated Nanoliposomes Encapsulating Angiogenic Peptides Improve Perfusion Defects : Radionuclide Imaging-Based Study.” *Nuclear Medicine and Biology* 43 (9). Elsevier Inc.: 552–58.
- Jose, Anup, Kunal Manoj Ninave, Sriravali Karnam, and Venkata Vamsi Krishna Venuganti. 2018. Temperature-Sensitive Liposomes for Codelivery of Tamoxifen and Imatinib for Synergistic Breast Cancer Treatment. *Journal of Liposome Research*. Vol. 0. Taylor & Francis.

- King, Timothy W, and Charles W Patrick. 2000. "Development and in Vitro Characterization of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-loaded Poly (DL-lactic-co-glycolic Acid)/poly (Ethylene Glycol) Microspheres Using a Solid Encapsulation/single Emulsion/solvent Extraction Technique." *Journal of Biomedical Materials Research* 51 (3): 383–90.
- Laham, R J, M Rezaee, M Post, D Novicki, F W Sellke, J D Pearlman, M Simons, and D Hung. 2000. "Intrapericardial Delivery of Fibroblast Growth Factor-2 Induces Neovascularization in a Porcine Model of Chronic Myocardial Ischemia." *J Pharmacol.Exp.Ther* 292 (2): 795–802.
- Laham, Roger J., Nicholas A. Chronos, Marilyn Pike, Mark E. Leimbach, James E. Udelson, Justin D. Pearlman, Roderic I. Pettigrew, M.J Whitehouse, Carl Yoshizawa, and Michael Simons. 2000. "Intracoronary Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2) in Patients with Severe Ischemic Heart Disease: Results of a Phase I Open-Label Dose Escalation Study." *Journal of the American College of Cardiology* 36 (7). Elsevier Masson SAS: 2132–39.
- Laham, Roger J, Frank W Sellke, Elazer R Edelman, Justin D Pearlman, J Anthony Ware, David L Brown, Jeffrey P Gold, and Michael Simons. 1999. "Local Perivascular Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor in Patients Undergoing Coronary Bypass Surgery." *Circulation* 100 (18): 1865 LP-1871.
- Lerman, Daniel Alejandro, Alotti Nasri, Ume Kiddy Levente, and Péault Bruno. 2016. "Cardiac Repair and Regeneration: The Value of Cell Therapies." *Eur Cardiol.* 11 (1): 43–48.
- Laham RJ, Garcia L, Baim DS, Post M, Simons M. 1999. "Therapeutic Angiogenesis Using Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Using Various Delivery Strategies" *Curr Interv Cardiol Rep.* 1(3):228-233.
- Li, Jie, Yuquan Wei, Kang Liu, Chuang Yuan, Yajuan Tang, Qingli Quan, Ping Chen, Wei Wang, Huozhen Hu, and Li Yang. 2010. "Synergistic Effects of FGF-2 and PDGF-BB on Angiogenesis and Muscle Regeneration in Rabbit Hindlimb Ischemia Model." *Microvascular Research* 80 (1). Elsevier B.V.: 10–17.
- Moreno, Lina Clara Gayoso e.Almendra Ibiapina, Isabella Macário Ferro Cavalcanti, Prabodh Satyal, Nereide Stela Santos-Magalhães, Hercília Maria Lins Rolim, and Rivelilson Mendes Freitas. 2015. "Acute Toxicity and Anticonvulsant Activity of Liposomes Containing Nimodipine on Pilocarpine-Induced Seizures in Mice." *Neuroscience Letters* 585. Elsevier Ireland Ltd: 38–42.
- Murakami, M, and M Simons. 2008. "Fibroblast Growth Factor Regulation of Neovascularization." *Curr.Opin.Hematol.* 15 (3): 215–20.
- Nallamothu, Ramakrishna, George C Wood, Christopher B Pattillo, Robert C Scott, Mohammad F Kiani, Bob M Moore, and Laura a Thoma. 2006. "A Tumor Vasculature Targeted Liposome

- Delivery System for Combretastatin A4: Design, Characterization, and in Vitro Evaluation.” *AAPS PharmSciTech* 7 (2): E7–16.
- Narayan, Reema, Mohan Singh, Om Prakash Ranjan, Yogendra Nayak, Sanjay Garg, Gopal V. Shavi, and Usha Y. Nayak. 2016. “Development of Risperidone Liposomes for Brain Targeting through Intranasal Route.” *Life Sciences* 163. Elsevier B.V.: 38–45.
- Pattni, Bhushan S., Vladimir V. Chupin, and Vladimir P. Torchilin. 2015. “New Developments in Liposomal Drug Delivery.” *Chemical Reviews* 115 (19): 10938–66.
- Preda, Mihai Bogdan, Ana Maria Rosca, Raluca Tutuianu, and Alexandrina Burlacu. 2015. “Pre-Stimulation with FGF-2 Increases in Vitro Functional Coupling of Mesenchymal Stem Cells with Cardiac Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464 (2). Elsevier Ltd: 667–73.
- Presta, Marco, Patrizia Dell’Era, Stefania Mitola, Emanuela Moroni, Roberto Ronca, and Marco Rusnati. 2005. “Fibroblast Growth Factor/fibroblast Growth Factor Receptor System in Angiogenesis.” *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16 (2): 159–78.
- Rosenblatt-velin, Nathalie, Mario G Lepore, Cristina Cartoni, and Friedrich Beermann. 2005. “FGF-2 Controls the Differentiation of Resident Cardiac Precursors into Functional Cardiomyocytes” 115 (7).
- Roth, Gregory A., Mark D. Huffman, Andrew E. Moran, Valery Feigin, George A. Mensah, Mohsen Naghavi, and Christopher J.L. Murray. 2015. “Global and Regional Patterns in Cardiovascular Mortality from 1990 to 2013.” *Circulation* 132 (17): 1667–78. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008720.
- Ruel, Marc, Roger J. Laham, J. Anthony Parker, Mark J. Post, J. Anthony Ware, Michael Simons, and Frank W. Sellke. 2002. “Long-Term Effects of Surgical Angiogenic Therapy with Fibroblast Growth Factor 2 Protein.” *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 124 (1): 28–34.
- Shevchenko, Andrej, Henrik Tomas, Jan Havliš, Jesper V. Olsen, and Matthias Mann. 2007. “In-Gel Digestion for Mass Spectrometric Characterization of Proteins and Proteomes.” *Nature Protocols* 1 (6): 2856–60.
- Simón-Yarza, Teresa, Fabio R. Formiga, Esther Tamayo, Beatriz Pelacho, Felipe Prosper, and María J. Blanco-Prieto. 2013. “PEGylated-PLGA Microparticles Containing VEGF for Long Term Drug Delivery.” *International Journal of Pharmaceutics* 440 (1). Elsevier B.V.: 13–18.
- Thom, Thomas, Nancy Haase, Wayne Rosamond, Virginia J Howard, John Rumsfeld, Teri Manolio, Zhi-jie Zheng, et al. 2006. *Heart Disease and Stroke Statistics 2009 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics*

Subcommittee [Online]. Vol. 6083.

- Verma, D. D., T. S. Levchenko, E. A. Bernstein, and V. P. Torchilin. 2005. "ATP-Loaded Liposomes Effectively Protect Mechanical Functions of the Myocardium from Global Ischemia in an Isolated Rat Heart Model." *Journal of Controlled Release* 108 (2–3): 460–71.
- Xiang, Qi, Jian Xiao, Hongbo Zhang, Xie Zhang, Meifei Lu, Hui Zhang, Zhijian Su, et al. 2011. "Preparation and Characterisation of bFGF-Encapsulated Liposomes and Evaluation of Wound-Healing Activities in the Rat" 37: 886–95.
- Xu, He Lin, Pian Pian Chen, De Li ZhuGe, Qun Yan Zhu, Bing Hui Jin, Bi Xin Shen, Jian Xiao, and Ying Zheng Zhao. 2017. "Liposomes with Silk Fibroin Hydrogel Core to Stabilize bFGF and Promote the Wound Healing of Mice with Deep Second-Degree Scald." *Advanced Healthcare Materials* 6 (19): 1–13.
- Yang, Peng-hui, Jian-xiu Zhu, Ya-dong Huang, Xian-ying Zhang, Peng Lei, Ashley I. Bush, Qi Xiang, Zhi-jian Su, and Qi-hao Zhang. 2016. "Human Basic Fibroblast Growth Factor Inhibits Tau Phosphorylation via the PI3K/Akt-GSK3 β Signaling Pathway in a 6-Hydroxydopamine-Induced Model of Parkinson's Disease." *Neurodegenerative Diseases* 16 (5–6): 357–69.
- Zhang, Yu-Hai, Guang-Wei Zhang, Tian-Xiang Gu, Jesse Li-Ling, Ti Wen, Ye Zhao, Chun Wang, Qin Fang, Lei Yu, and Bo Liu. 2011. "Exogenous Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Cardiac Stem Cell-Mediated Myocardial Regeneration after Miniswine Acute Myocardial Infarction." *Coronary Artery Disease* 22 (4): 279–85.
- Zhao X, Wu J, Muthusamy N, Byrd JC, Lee RJ. Liposomal coencapsulated fludarabine and mitoxantrone for lymphoproliferative disorder treatment. *J Pharm Sci* 2008;97(4):1508–18.

4 CONCLUSÃO

O progresso na pesquisa e no desenvolvimento de biofármacos, como fatores de crescimento, vem impulsionando os estudos voltados para terapias capazes de reparar e regenerar o miocárdio infartado. Ainda assim, algumas barreiras precisam ser contornadas para aumentar o potencial translacional dessas biomoléculas, de forma que possibilite sua entrega eficiente ao coração e, conseqüentemente, sua atividade terapêutica. Para tanto, pesquisas pré-clínicas com lipossomas no carreamento e direcionamento cardíaco de biofármacos demonstram resultados promissores. Entretanto, o potencial desses sistemas lipídicos para esta finalidade não foi amplamente investigado.

No presente trabalho, foram desenvolvidos e caracterizados lipossomas convencionais destinados ao delivery cardíaco de fatores de crescimento. Este é o primeiro relato da administração transtorácica de lipossomas guiada por ultrassom em um modelo animal de infarto do miocárdio. A influência do tamanho das vesículas na retenção cardíaca e resposta tecidual após administração transtorácica foram apresentados neste trabalho. Os resultados demonstraram a compatibilidade *in vitro*, retenção cardíaca e biocompatibilidade de lipossomas de tamanho aproximado de 500 nm.

O preparo dos lipossomas foi otimizado por extrusão e lipossomas contendo FGF-2 foram produzidos com uma eficiência de encapsulação de $\approx 60\%$, dentro do esperado para fármacos hidrofílicos encapsulados por carreamento passivo e preparados pelo método de hidratação do filme lipídico. Os lipossomas mantiveram a integridade do FGF-2 bem como sua atividade biológica, o que posiciona a formulação em um nível de desenvolvimento avançado para estudos *in vivo*.

Desta forma, o conjunto de resultados gerados nesta tese representa um passo importante para futura avaliação da eficácia terapêutica do FGF-2 lipossomal em camundongos submetidos a infarto do miocárdio.

REFERÊNCIAS

ABTO, A. B. DE T. Dados numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: janeiro / junho - 2016. n. 2, 2016. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2016/1sem-RBT2016%20leitura.pdf>. Acesso em: 05 set. 2106.

LILA, A. S. A.; ISHIDA, T. Liposomal Delivery Systems: design optimization and current applications. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 1-10, 2017. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b16-00624>.

ANNEX, B. H. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischaemia. **Nature Reviews Cardiology**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 387-396, 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2013.70>.

ARIAS, J. L. Liposomes in drug delivery: a patent review (2007 : present). **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, [S.L.], v. 23, n. 11, p. 1399-1414, 2013. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.2013.828035>.

AVILES, R. J.; ANNEX, B. H; LEDERMAN, R. J. Testing clinical therapeutic angiogenesis using basic fibroblast growth factor (FGF-2). **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 140, n. 4, p. 637-646, 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705493>.

AWADA, H. K.; HWANG, M. P.; WANG, Y. Towards comprehensive cardiac repair and regeneration after myocardial infarction: aspects to consider and proteins to deliver. **Biomaterials**, [S.L.], v. 82, p. 94-112, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.12.025>.

BAMRUNGSAP, S. et al. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, [S.L.], v. 7, n. 8, p. 1253-1271, 2012. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.12.87>.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322007000200003>.

BERGMANN, O. et al. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. **Science**, [S.L.], v. 324, n. 5923, p. 98-102, 2009. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1164680>.

BERLO, J. H V.; MOLKENTIN, J. D. An emerging consensus on cardiac regeneration. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 20, n. 12, p. 1386-1393, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3764>.

BOLLINI, S.; S., Nicola; R., Paul R.. Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration. **Journal Of Molecular And Cellular Cardiology**, [S.L.], v. 50, n. 2, p. 296-303, 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.07.006>.

BOWEY, K.; TANGUAY, J.-F.; TABRIZIAN, M. Liposome technology for cardiovascular disease treatment and diagnosis. **Expert Opinion On Drug Delivery**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 249-265, 2012. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2012.647908>.

CAIXETA, A.; BECK, L. C. Primary Prevention of Coronary Restenosis with Drug-Eluting Stents: Change of a paradigm in Interventionist Cardiology. **Revista da SOCERJ**, v. 18, p. 244-253, 2004.
http://sociedades.cardiol.br/socerj/revista/2005_03/a2005_v18_n03_art09.pdf.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, [S.L.], v. 473, n. 7347, p. 298-307, 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10144>.

CHERAGHI, M.; NAMDARI, M.; NEGAHDARI, B.; EATEMADI, A. RETRACTED: recent advances in cardiac regeneration. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 87, p. 37-45, 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.071>.

CHU, H.; CHEN, C-W.; HUARD, J.; WANG, Y. The effect of a heparin-based coacervate of fibroblast growth factor-2 on scarring in the infarcted myocardium. **Biomaterials**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 1747-1756, 2013. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.019>.

COUVREUR, P. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 21-23, 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.04.010>.

CROSS, M. J; CLAEISSON-WELSH, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 201-207, 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01676-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01676-x).

DAVIS, M. E. et al. Local myocardial insulin-like growth factor 1 (IGF-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 103, n. 21, p. 8155-8160, 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602877103>.

DATASUS 2016. **Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) e IBGE**. Disponível em:
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10PE.def>. Acesso em: 15/10/2018.

DEVEZA, L.; CHOI, J.; YANG, F. Therapeutic Angiogenesis for Treating Cardiovascular Diseases. **Theranostics**, [S.L.], v. 2, n. 8, p. 801-814, 2012. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/thno.4419>.

DETILLIEUX, K.; SHEIKH, F.; KARDAMI, E.; CATTINI, P. A.. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. **Cardiovascular Research**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 8-19, 2003. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00708-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00708-3).

DOBACZEWSKI, M.; GONZALEZ-QUESADA, C.; FRANGOIANNIS, N. G.. The

extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. **Journal Of Molecular And Cellular Cardiology**, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 504-511, 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.07.015>.

DOPPLER, S. A.; DEUTSCH, M-A; LANGE, R.; KRANE, M. Cardiac regeneration: current therapies—future concepts. **Journal Thoracic Disease**, [S.L.], v. 5, n. 9, 2013. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.71

DUA, J.; RANA, A. C.; BHANDARI, A. K. Liposomes methods of preparation and applications. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, [S.L.], v. 3, n.2, p. 14-20, 2012. https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Liposomes+methods+of+preparation+and+applications&btnG=

EDWARDS, K; BAEUMNER, A. J. Analysis of liposomes. **Talanta**, [S.L.], v. 68, n. 5, p. 1432-1441, 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.031>.

ELLISON, G. M. et al. Endogenous Cardiac Stem Cell Activation by Insulin-Like Growth Factor-1/Hepatocyte Growth Factor Intracoronary Injection Fosters Survival and Regeneration of the Infarcted Pig Heart. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [S.L.], v. 58, n. 9, p. 977-986, 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2011.05.013>.

FINAN, Amanda; RICHARD, Sylvain. Stimulating endogenous cardiac repair. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, [S.L.], v. 3, 29 set. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2015.00057>.

FORMIGA, F. R. et al. Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia–reperfusion model. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 147, n. 1, p. 30-37, 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.097>.

FORMIGA, F. R. et al. Controlled delivery of fibroblast growth factor-1 and neuregulin-1 from biodegradable microparticles promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model through activation of endogenous regeneration. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 173, p. 132-139, 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.034>.

FORMIGA, F. et al. Angiogenic therapy for cardiac repair based on protein delivery systems. **Heart Failure Reviews**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 449-473, 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10741-011-9285-8>.

FORSSSEN, E.; WILLIS, M.. Ligand-targeted liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 249-271, 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(97\)00083-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(97)00083-5).

FRANGOIANNIS, Nikolaos G.. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. **Nature Reviews Cardiology**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 255-265, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2014.28>.

GARBERN, J. C.; LEE, R. T. Cardiac Stem Cell Therapy and the Promise of Heart Regeneration. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 689-698, 2013. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.008>.

GARG, T.; GOYAL, A. K. Liposomes : Targeted and Controlled Delivery System. **Drug Delivery Letters**, n. 4, p. 62–71, 2014. https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Liposomes%E2%80%AF%3A+Targeted+and+Controlled+Delivery+System&btnG=

GERBIN, K. A.; MURRY, C. E.. The winding road to regenerating the human heart. **Cardiovascular Pathology**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 133-140, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carpath.2015.02.004>.

LEE, Jinhyun Hannah; YEO, Yoon. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, [S.L.], v. 125, p. 75-84, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>.

HAO, H. et al. FGF23 promotes myocardial fibrosis in mice through activation of β -catenin. **Oncotarget**, [S.L.], v. 7, n. 40, p. 64649-64664, 25 ago. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.11623>.

HASTINGS, C. L. et al. Drug and cell delivery for cardiac regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 84, p. 85-106, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.006>.

HAREL-ADAR, T.; MORDECHAI, T. B.; AMSALEM, Y.; FEINBERG, M. S.; LEOR, J.; COHEN, S. Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 5, p. 1827-1832, 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1015623108>.

HONARY, S; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal Of Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 12, n. 2, 2013. African Journals Online (AJOL). <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>.

HUANG, Z. et al. Molecular Imaging of Angiogenesis in Cardiovascular Diseases. **Journal of Molecular Biology and Molecular Imaging**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2015. https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Molecular+Imaging+of+Angiogenesis+in+Cardiovascular+Diseases.&btnG=

HWANG, H. et al. PEGylated nanoliposomes encapsulating angiogenic peptides improve perfusion defects: radionuclide imaging-based study. **Nuclear Medicine And Biology**, [S.L.], v. 43, n. 9, p. 552-558, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2016.05.010>.

IWAKURA, A. et al. Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model. **Heart Vessels**, [S.L.], v. 8, p. 93–99, 2003. <https://doi.org/10.1007/s10380-002-0686-5>.

JACOBS, J. Combating cardiovascular disease with angiogenic therapy. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 12, n. 23-24, p. 1040-1045, 2007. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2007.08.018>.

JOGGERST, S. J.; HATZOPOULOS, A. K.. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. **Expert Reviews In Molecular Medicine**, [S.L.], v. 11, p. 1-22, 2009. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1462399409001124>.

JOSEPH, P. et al. Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1. **Circulation Research**, [S.L.], v. 121, n. 6, p. 677-694, 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.117.308903>.

JUDD, J.; XUAN, W.; HUANG, G. N. Cellular and molecular basis of cardiac regeneration. **Turkish Journal Of Biology**, [S.L.], v. 40, p. 265-275, 2016. The Scientific and Technological Research Council of Turkey. <http://dx.doi.org/10.3906/biy-1504-43>.

KHAW, B-A; DASILVA, J.; HARTNER, W. C. Cytoskeletal-antigen specific immunoliposome-targeted in vivo preservation of myocardial viability. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 120, n. 1-2, p. 35-40, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.04.013>.

KHAW, B. A.; NARULA, J.; VURAL, I.; TORCHILIN, V. P. Cytoskeleton-specific immunoliposomes: sealing of hypoxic cells and intracellular delivery of dna. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 162, n. 1-2, p. 71-76, 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(97\)00414-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(97)00414-6).

KULKARNI, P. R.; YADAV, J. D.; VAIDYA, K. A. Liposomes : A novel drug delivery system. **Int J Curr Pharm Res**, v. 3, n. 2, p. 10–18, 2011. https://www.researchgate.net/publication/303339916_Liposomes_A_Novel_Drug_Delivery_System

KURRELMEYER, K. et al. Cardiac remodeling as a consequence and cause of progressive heart failure. **Clinical Cardiology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 14-19, 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/clc.4960211304>.

LAHAM, R. J; et al. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase i open-label dose escalation study. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [S.L.], v. 36, n. 7, p. 2132-2139, 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0735-1097\(00\)00988-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0735-1097(00)00988-8).

LAHAM, R. J. et al. Intrapericardial delivery of fibroblast growth factor-2 induces neovascularization in a porcine model of chronic myocardial ischemia. **J Pharmacol.Exp.Ther**, v. 292, n. 2, p. 795–802, 2000. https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Intrapericardial+delivery+of+fibr

LAHAM, R. J. et al. Local Perivascular Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor in Patients Undergoing Coronary Bypass Surgery. **Circulation**, [S.L.], v. 100, n. 18, p. 1865-1871, 1999. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.100.18.1865>.

LASIC, D. Novel applications of liposomes. **Trends In Biotechnology**, [S.L.], v. 16, n. 7, p.

307-321, 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01220-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01220-7).

LEE, J. Hannah; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, [S.L.], v. 125, p. 75-84, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>.

LERMAN, D. A.; ALOTTI, N.; UME, K. L.; PÉAULT, B. Cardiac Repair and Regeneration: the value of cell therapies. **European Cardiology Review**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 43-48, 2016. Radcliffe Group Ltd. <http://dx.doi.org/10.15420/ecr.2016:8:1>.

LEVCHENKO, T. et al. Liposomes in Diagnosis and Treatment of Cardiovascular Disorders. **Methodist Debaquey Cardiovasc Journal**, [S.L.], v. 8, n. 1, 2012. doi:10.14797/mdcj-8-1-36.

LILA, A. S. A.; ISHIDA, T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 1-10, 2017. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00624>.

LIU, M. et al. The use of antibody modified liposomes loaded with AMO-1 to deliver oligonucleotides to ischemic myocardium for arrhythmia therapy. **Biomaterials**, [S.L.], v. 35, n. 11, p. 3697–3707, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.099>.

LIN, Z.; PU, W. T. Strategies for Cardiac Regeneration and Repair. **Science Translational Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 239, 2014. doi:10.1126/scitranslmed.3006681.

LOSORDO, D. W.; DIMMELER, S. Review : Clinical Cardiology : New Frontiers Therapeutic Angiogenesis and Vasculogenesis for Ischemic Disease Part II : Cell-Based Therapies. **Circulation**, [S.L.], v. 109, p. 2692–2697, 2004. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000128596.49339.05>.

MALLIARAS, K. et al. Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. **EMBO Molecular Medicine**, [S.L.], v. 5, p. 191–209, 2013. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201737>.

MANGINI, S. et al. Heart transplantation: review. **Einstein (São Paulo)**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 310–318, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RW3154>.

MASTROBATTISTA, E.; KONING, G. A.; STORM, G. Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 40, n. 1–2, p. 103–127, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00043-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00043-5).

MENSAH G. A.; MORAN A. E.; ROTH G. A.; NARULA J. The global burden of cardiovascular diseases, 1990-2010. **Global Heart**, [S.L.], v. 9, p. 183–184, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gheart.2014.01.008>.

MOURKIOTI, F.; ROSENTHAL, N. IGF-1 , inflammation and stem cells : interactions during muscle regeneration. **Trends in Immunology**, [S.L.], v. 26, n. 10, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.08.002>.

MOZAFFARIAN, D. et al. Heart disease and stroke statistics — 2016 update: a report from

the American Heart Association. **Circulation**, [S.L.], v. 133, n. 4, p.38-360, 2016.
<https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000366>

NARESH N. K. et al. Monocyte and/or Macrophage Infiltration of Heart after Myocardial Infarction: MR Imaging by Using T1-shortening Liposomes. **Radiology**, [S.L.], v. 264, n. 2, 2012. <https://doi.org/10.1148/radiol.12111863>.

OKUDA, K. et al. Targeted Therapy for Acute Autoimmune Myocarditis with Nano-Sized Liposomal FK506 in Rats. **Plos One**, [S.L.], p. 1–14, 2016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160944>.

PASCUAL-GIL, S. et al. Heart regeneration after myocardial infarction using synthetic biomaterials. **Journal of Controlled Release**, [S.L.], v. 203, p. 23–38, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.009>.

PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, [S.L.], v. 177, p. 8–18, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 115, n. 19, p. 10938–10966, 2015.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046>.

PÊGO-FERNANDES, P. M.; GAIOTTO, F. A.; GUIMARÃES-FERNADES, F. Estado atual da cirurgia de revascularização do miocárdio. **Revista de Medicina**, [S.L.], v. 87, n. 2, p. 92–98, 2008. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v87i2p92-98>.

PAYNE, T. R. et al. A Relationship Between Vascular Endothelial Growth Factor Angiogenesis, and Cardiac Repair After Muscle Stem Cell Transplantation Into Ischemic Hearts. **Preclinical Studies**, [S.L.], v. 50, n. 17, 2007. doi:10.1016/j.jacc.2007.04.100.

PIEGAS, L. S.; HADDAD, N. Intervenção coronariana percutânea no Brasil: resultados do Sistema Único de Saúde. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.L.], v. 96, n. 4, p. 317–324, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2011005000035>.

POLIZZOTTI, B. D. et al. Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window. **Science Translational Medicine**, [S.L.], v. 7, n. 281, 2015. doi:10.1126/scitranslmed.aaa5171.

PORRELLO, E. R. et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 110, n. 1, p. 187–192, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208863110>.

POST, M. J. et al. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. **Cardiovascular Research**, [S.L.], v. 49, n. 3, p. 522–531, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00216-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00216-9)

PRESTA, M. et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 159–178, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.004>.

PTASZEK, L. M. et al. Towards regenerative therapy for cardiac disease. **The Lancet**, [S.L.], v. 379, n. 9819, p. 933–942, 2012. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60075-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60075-0).

RADHAKRISHNAN, J.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Hydrogel based injectable scaffolds for cardiac tissue regeneration. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 449–461, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.010>.

REBOUÇAS, J. D. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; FORMIGA, F. R. Cardiac Regeneration using Growth Factors: Advances and Challenges. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.L.], p. 271–275, 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20160097>.

ROSENBLATT-VELIN, N. et al. FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 115, n. 7, 2005. doi:10.1172/JCI23418

RUEL, M. et al. Long-term effects of surgical angiogenic therapy with fibroblast growth factor 2 protein. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, [S.L.], v. 124, n. 1, p. 28–34, 2002. <https://doi.org/10.1067/mtc.2002.121974>.

RUSNATI, M. et al. A Distinct Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2)/FGF Receptor Interaction Distinguishes Urokinase-type Plasminogen Activator Induction from Mitogenicity in Endothelial Cells. **Molecular Biology of the Cell**, [S.L.], v. 7, p. 369–381, 1996. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.3.369>

RUVINOV, E.; LEOR, J.; COHEN, S. The promotion of myocardial repair by the sequential delivery of IGF-1 and HGF from an injectable alginate biomaterial in a model of acute myocardial infarction. **Biomaterials**, [S.L.], v. 32, p. 565–78, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.097>.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 85–99, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.12.009>.

SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. **The AAPS journal**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 303–15, 2012. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9330-0>.

SCHMIDT, A. et al. Basic Fibroblast Growth Factor Controls Migration in Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, [S.L.], v. 24, n. 7, p. 1750–1758, 2006. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0191>.

SCOTT, R. C. et al. Targeting VEGF-encapsulated immunoliposomes to MI heart improves vascularity and cardiac function. **The FASEB Journal**, [S.L.], v. 23, n. 10, p. 3361–3367, 2009. <https://doi.org/10.1096/fj.08-127373>.

SEGRS, V. F. M.; LEE, R. T. Stem-cell therapy for cardiac disease, [S.L.], v. 451, p. 937–942, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature06800>.

SHAIK, M. R.; KORSAPATI, M.; PANATI, D. PLGA/mesoporous silica hybrid structure for

controlled drug release. **International Journal of Pharma Sciences**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 112–116, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.04.023>.

SIMONS, M. Pharmacological Treatment of Coronary Artery Disease With Recombinant Fibroblast Growth Factor-2: Double-Blind, Randomized, Controlled Clinical Trial. **Circulation**, [S.L.], v. 105, n. 7, p. 788–793, 2002. <https://doi.org/10.1161/hc0802.104407>.

SUTTON, M.G. ST.; SHARPE, N. Clinical Cardiology : New Frontiers Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction Pathophysiology and Therapy. **Circulation**, [S.L.], p. 2981–2988, 2000. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.25.2981>.

STAICULESCU, M. et al. The Role of Reactive Oxygen Species in Microvascular Remodeling. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 15, n. 12, p. 23792–23835, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms151223792>.

SUN, X.; ALTALHI, W.; NUNES, S. S. Vascularization strategies of engineered tissues and their application in cardiac regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 96, p. 183–194, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.06.001>.

TANG, Y. et al. Targeted delivery of vascular endothelial growth factor improves stem cell therapy in a rat myocardial infarction model. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1711–1718, 2014.

THOM, T. et al. Heart Disease and Stroke Statistics 2009 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. 2006. THYGESEN, K. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. **Clinical Biochemistry**, [S.L.], v. 46, n. 1–2, p. 1–4, 2013.

UYGUR, A.; LEE, R. T. Mechanisms of Cardiac Regeneration. **Developmental Cell**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 362–374, 2016.

VENUGOPAL, J. R. et al. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. **Journal of The Royal Society Interface**, [S.L.], v. 9, n. 66, p. 1–19, 2012.

WANJARE, M.; KUSUMA, S.; GERECHT, S. Perivascular cells in blood vessel regeneration. **Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 434–447, 2013. <https://doi.org/10.1002/biot.201200199>.

WHO (2008). **The global burden of disease: 2004 update**. Disponível em: http://www.who.int/entity/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf. Acesso em junho 2015.

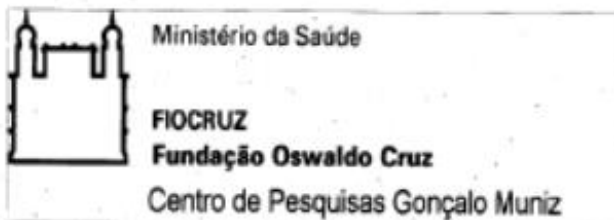
WILCZEWSKA, A. Z. et al. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, [S.L.], v. 64, n. 5, p. 1020–1037, 2012. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5).

XIN, M.; OLSON, E. N.; BASSEL-DUBY, R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 529–541, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrm3619>.

YAMADA, Y. et al., Postinfarct active cardiac-targeted delivery of erythropoietin by liposomes with sialyl Lewis X repairs infarcted myocardium in rabbits. **Integrative Cardiovascular Physiology and Pathophysiology**, [S.L.], v. 304, n. 8, p. 1124-33, 2013. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00707.2012>.

YUN, Y-R. et al. Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. **Journal of Tissue Engineering**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-18, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/218142>.

ZHANG, H. et al. Intermedin is upregulated and has protective roles in a mouse ischemia/reperfusion model. **Hypertension Research**, [S.L.], v. 32, n. 10, p. 861–868, 2009. <https://doi.org/10.1038/hr.2009.120>.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**Comissão de Ética no Uso de Animais - FIOCRUZ**

Salvador, 13 de setembro de 2017

CI. nº 006/2017

Para: Dr. Fábio Rocha Formiga
Pesquisador Responsável pelo protocolo 010/2015

Assunto: Resposta ao pedido de extensão do protocolo 010/2015

Prezada Dr. Fábio,

Em resposta ao seu pedido de extensão de prazo do protocolo 010/2015 intitulado **"NANOFORMULAÇÕES DE FATORES DE CRESCIMENTO PARA REGENERAÇÃO CARDIOVASCULAR"**, informamos que a CEUA analisou o referido pedido e o **aprovou**.
Desta forma, a validade do referido protocolo será até **13/09/2019**.

Atenciosamente,

DANIEL PEREIRA BEZERRA
Coordenador da CEUA
IGM/FIOCRUZ

Dr. Daniel P. Bezerra
Pesquisador - FIOCRUZ-BA
Mat. SIAPE - 1639392