



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PAULA DOS PASSOS MENEZES

**TECNOLOGIAS PARA ESTUDO E TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA
CRÔNICA: DESENVOLVIMENTO DE MICROAMBIENTES E ABORDAGENS
NANOTECNOLÓGICAS**

ARACAJU

2019

	<p>PAULA DOS PASSOS MENEZES</p> <p>TECNOLOGIAS PARA ESTUDO E TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA: DESENVOLVIMENTO DE MICROAMBIENTES E ABORDAGENS NANOTECNOLÓGICAS</p> <p>2019</p>
--	---

PAULA DOS PASSOS MENEZES

**TECNOLOGIAS PARA ESTUDO E TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA
CRÔNICA: DESENVOLVIMENTO DE MICROAMBIENTES E ABORDAGENS
NANOTECNOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

Co-orientadora: Prof. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

ARACAJU

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M543t Menezes, Paula dos Passos
Tecnologias para estudo e tratamento da insuficiência venosa crônica: desenvolvimento de microambientes e abordagens nanotecnológicas / Paula dos Passos Menezes ; orientador Adriano Antunes de Souza Araújo ; coorientadora Sílvia Stanisçuaski Guterres. – Aracaju, 2019.
156 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Bioimpressão. 2. Insuficiência venosa. 3. Microambiente celular. 5. Nanotecnologia. 6. Úlcera varicosa. I. Araújo, Adriano Antunes de Souza, orient. II. Guterres, Sílvia Stanisçuaski, coorient. III. Título.

CDU 61

PAULA DOS PASSOS MENEZES

**TECNOLOGIAS PARA ESTUDO E TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA
CRÔNICA: DESENVOLVIMENTO DE MICROAMBIENTES E ABORDAGENS
NANOTECNOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo
Universidade Federal de Sergipe

1º Examinador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans-Júnior
Universidade Federal de Sergipe

2º Examinador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos
Universidade Federal de Sergipe

3º Examinador: Prof. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

4º Examinador: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

A minha família, fonte inesgotável de estímulo
ao meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

"Confia ao Senhor a tua sorte, espera nele, e ele agirá" - *Salmos*, 36.

Obrigada Senhor, por acreditar em mim e guiar os meus sonhos, concedendo-me força e coragem para encarar os desafios desta caminhada. Entrego em tuas mãos esta vitória. Agradeço...

Aos meus pais, José e Joseane, por serem meu porto seguro, fonte de estímulo e por sempre me ensinar a usufruir de dedicação e humildade em tudo que me proponho a fazer. De forma similar, o meu muito obrigada a minha irmã, Patrícia, por sempre me incentivar a ir mais longe em busca dos nossos sonhos, afinal, todas as nossas conquistas são idealizadas de forma conjunta. Amo vocês.

Ao meu noivo, Vinícius, por todo amor, carinho, compreensão e incentivo durante cada etapa deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Adriano Antunes, por acreditar no meu potencial desde o segundo período do curso de Farmácia. Desde então, foram 9 anos de trabalho sob a sua supervisão. Obrigada por toda confiança e incentivo.

A minha co-orientadora Profa. Sílvia Guterres, por me permitir realizar parte dos experimentos desta tese no seu laboratório. Sempre reservando parte do seu tempo para me orientar e de forma tão gentil, contribuir com a execução deste trabalho. Obrigada professora, tenho um carinho enorme por ti.

Aos alunos do laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em especial a Luiza Frank, pela amizade e parceria que construímos durante o doutorado e por compartilhar de tantos momentos de aprendizado e descontração juntas. Agradeço ainda, a Ana Paula Barbosa, por de forma tão carinhosa, me receber na sua casa durante a estadia em Porto Alegre.

A todos que fazem a Divisão de Biomateriais e Biomecânica da Oregon Health and Science University. Aqui meu profundo agradecimento ao Prof. Luiz Bertassoni, por tanto me ensinar e incentivar a ser uma pesquisadora desde a bancada até apresentações para públicos de elevado nível científico. Jamais esquecerei todo o incentivo a superar novos desafios. Obrigada Professor.

A todos que de forma tão carinhosa me ajudaram durante a estadia no exterior, Cristiane Miranda, por ser essa pessoa iluminada e super inteligente. Gaby, Avi, Anthony, Ting, Greeshma, Nelson, Sid, Ashwani, Dr. Sahay, Christina, Jan, Christine e todos os brasileiros que compartilharam dessa fase tão importante da minha vida.

Todos vocês foram minha família em 2017-2018 e os tenho no meu coração para todo o sempre. Obrigada por toda ajuda científica e da vida.

A todos que fazem o LeFT, em especial Gaby, Mairim, Saran, Bruno, Yasmim, Taty, Valléria, Nayara, Ana Maria, Bruna, Igor, Isabella, Milena, Clara, Lislene, Lívia, Caio, Isla, Lana, Lee, Monna. Vocês são meus exemplos de força e determinação. Muito obrigada por todo o tempo que passaram me ajudando, conversando, rindo. Vocês são pessoas maravilhosas e guerreiras. Só nós sabemos o que passamos para alcançar os nossos sonhos. Viver não cabe no lattes. Os levo sempre comigo.

A Cristiane Vilaça e todos os pacientes do ambulatório de cirurgia vascular do Hospital Universitário da UFS. Obrigada por acreditarem no nosso projeto, aceitarem e participarem com tanto carinho e dedicação. Juntos, conseguimos melhorar a qualidade de vida de muitas pessoas, devolvendo sorrisos e esperança de dias melhores e menos dolorosos.

A Sigvaris, pela doação de meias compressivas para realização deste estudo.

A FÁrmacos Farmácia com Manipulação pela doação dos medicamentos utilizados no ensaio clínico piloto.

A todos os parceiros durante esta caminhada.

A banca, pelas valiosas contribuições.

Ao Portal de Periódicos CAPES/MEC por disponibilizar o acesso aos periódicos científicos utilizados durante a execução desta tese .

A turma de doutorado, professores e colaboradores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, muito obrigada pelos conhecimentos compartilhados.

A Universidade Federal de Sergipe, por ser meu lar nos últimos 10 anos e oportunizar-me a cursar o doutorado em terras sergipanas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período de elaboração desta obra e ao Programa PDSE/CAPES (88881.134337/2016-01) pela oportunidade de vivenciar a pesquisa científica no exterior.

As demais agências de fomento FINEP, CNPq (MCTI/CNPQ Nº01/2016), FAPITEC-SE pelos recursos que propiciaram a realização dos experimentos descritos nesta tese.

Sem cada um de vocês, nada disso teria acontecido. Muito obrigada! ❤️

Posso, tudo posso, NAQUELE que me fortalece.”

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

TECNOLOGIAS PARA ESTUDO E TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA: DESENVOLVIMENTO DE MICROAMBIENTES E ABORDAGENS NANOTECNOLÓGICAS, PAULA DOS PASSOS MENEZES. Tese do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe-UFS, ARACAJU, 2019.

A insuficiência venosa é uma doença causada por incompetência valvular e é altamente prevalente em países ocidentais, onerando de forma significativa os sistemas de saúde. A forma mais grave da doença, consiste em úlceras venosas de difícil cicatrização. Diante disto, o principal objetivo desta tese consistiu em desenvolver biomateriais para o tratamento de úlceras venosas, através de abordagens nanotecnológicas e da medicina regenerativa. Para tanto, foram desenvolvidos microambientes tridimensionais (3D), a fim de investigar a resposta de células tronco a diferentes propriedades mecânicas da matriz extracelular, bem como a expressão de proteínas liberadas a partir de nanopartículas contendo RNA mensageiro (mRNA) na perspectiva de propor um modelo de estudo da patologia. Além disso, foram desenvolvidas meias de compressão contendo hesperetina nanoencapsulada para tratamento de úlceras venosas. Diante do exposto, foram impressos 720 hidrogéis de diferentes propriedades mecânicas (9 a 46 kPa), como plataformas biométicas da matriz extracelular. A resposta de células tronco a estas matrizes foi diretamente relacionada a rigidez do microambiente, sem danos a viabilidade celular (86 – 96%). Ademais, matrizes mais rígidas apresentaram uma maior expressão de proteínas, o que contribui para novos estudos envolvendo os fatores bioquímicos presentes no microambiente da doença venosa. As meias compressivas contendo hesperetina nanoencapsulada mostraram-se promissoras para o tratamento de úlceras, mediante liberação controlada de hesperetina a partir dos tecidos, para o microambiente das lesões. Estas nanocápsulas permaneceram adesivas no tecido durante cinco lavagens, o que torna este biomaterial interessante para tratar esta doença, uma vez que associa o efeito da compressão a atividade hipotensora da hesperetina no endotélio vascular. Diante disto, apresentamos o relato de caso de um paciente com úlceras venosas de longa extensão não cicatrizadas durante dois anos, com as terapias prescritas antes do início deste estudo. Após seis meses de tratamento com esta meia, o paciente apresentou melhora significativa na sua qualidade de vida, provavelmente associada ao desaparecimento das dores associadas a lesão e excelente cicatrização. Além disso, foi observada um importante clareamento da área perilesional devido a redução de melanina e eritema. A cicatrização das lesões contribuiu ainda para a redução dos diâmetros venosos de diferentes segmentos da veia safena. Juntos, estes resultados contribuem para os desfechos clínicos desejados no tratamento de úlceras venosas e para estudos posteriores com amostras maiores. A realização dessa pesquisa serve como base para o advento de novas opções terapêuticas para uma doença de tamanha importância no contexto da saúde pública, o que constitui parte essencial das Políticas de Saúde e desenvolvimento econômico.

Descritores: Bioimpressão; insuficiência venosa; hesperetina; microambiente celular; nanotecnologia; úlcera venosa.

ABSTRACT

TECHNOLOGIES FOR STUDY AND TREATMENT OF CHRONIC VENOUS INSUFFICIENCY: DEVELOPMENT OF MICROENVIRONMENTS AND NANOTECHNOLOGICAL APPROACHES, PAULA DOS PASSOS MENEZES. ARACAJU, 2019.

Venous insufficiency is a disease caused by valvular incompetence and is highly prevalent in Western countries, significantly burdening health systems. The most severe form of the disease consists of venous ulcers that are difficult to heal. In view of this, the main objective of this thesis was to develop biomaterials for the study and treatment of venous ulcers, through nanotechnological approaches and regenerative medicine. In order to do so, three-dimensional microenvironments (3D) were developed in order to investigate the response of stem cells to different mechanical properties of the extracellular matrix, as well as the expression of proteins released from nanoparticles containing messenger RNA (mRNA) in order to propose a model of pathology study. In addition, compression stockings containing nanoencapsulated hesperetin has been developed for the treatment of venous ulcers. In view of the above, 720 hydrogels of different mechanical properties (9 to 46 kPa) were printed as biomechanical platforms of the extracellular matrix. The response of stem cells to these matrices was directly related to stiffness of the microenvironment, without damage to cellular viability. In addition, stiffer matrices presented a greater expression of proteins, which contributes to new studies involving the biochemical factors present in the microenvironment of the venous disease. Compressive stockings containing nanoencapsulated hesperetin have been shown to be promising for the treatment of ulcers by controlled release of hesperetin from the textiles into the microenvironment of the lesions. These nanocapsules remained adhesive in the textile during five washes, which makes this biomaterial interesting to treat this disease, since it associates the effect of the compression to the hypotensive activity of the hesperetin in the vascular endothelium. In view of this, we present the case report of a patient with long unhealed venous ulcers for two years, with the therapies prescribed before the beginning of this study. After six months of treatment with these compressive stockings, the patient presented significant improvement in their quality of life, associated with the disappearance of pain associated with injury and excellent healing. In addition, a significant whitening of the perilesional area was observed due to reduction of melanin and erythema. The healing of the lesions also contributed to the reduction of the venous diameters of different segments of the saphenous vein. Together, these results contribute to the desired clinical outcomes in the treatment of venous ulcers and contribute to further studies with larger samples. This research therefore contributes to the emergence of new therapeutic options for a disease of such importance in the context of public health, which is an essential part of Health Policies and economic development.

Descritpors: Bioprinting; venous insufficiency; hesperetin; microenvironment; nanotechnology; venous ulcer

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CAM** – Membrana corioalantóica
- CEAP** – Classificações clínica, etiológica, anatômica e patofisiológica
- ELAM-1** – Molécula de adesão leucocitária endothelial – 1
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- FOXC2** – Proteína C2 da cabeça da bifurcação
- GAG** – Glicosaminoglicano
- GCX** – Glicocálix
- GeIMA** – Gelatina metacrilada
- GFP** – Proteína verde fluorescente
- HFE** – Gene da hemacromatose
- hMSCs** – Células tronco mesenquimais humanas
- ICAM-1** – Molécula de adesão intercelular 1
- IL** – Interleucina
- IVC** – Insuficiência venosa crônica
- LNP** – Nanopartícula lipídica
- LT** – Linfócitos T
- MC** – Mastócitos
- MCP-1** – Proteína quimioatratadora de monócitos
- MEC** – Matriz extracelular
- MLV** – Músculo liso vascular
- MMPs** – Metaloproteinases da matriz
- MP** – Macrófagos
- mRNA** – RNA mensageiro
- NO** – Óxido nítrico
- PCL** – Poli-caprolactona
- PDMS** – Polidimetilsiloxano
- PLA** – Poli (lactídeo)
- PLGA** – Poli (lático co-glicólico)
- PVA** – Poli (álcool vinílico)
- SCAP** – Células tronco da papilla apical dentária
- SLA** – Estereolitografia

TNF- α – Fator de necrose tumoral

TRPV-1 – Receptor transiente de potencial de canal vanilóide

TXA₂S – Tromboxano A2 sintase

UV – Ultravioleta

VCAM-1 – Molécula de adesão vascular – 1

VEGFR-2 – Fator de crescimento endotelial vascular – 2

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – Introdução, Revisão da Literatura e Objetivos	15
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
1.2.1. INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA.....	6
1.2.2. MODELOS DE ESTUDO DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....	11
1.2.3. TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA.....	16
1.2.4. HESPERETINA	20
1.2.5. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS	23
1.2.6. NANOPARTÍCULAS.....	26
1.2.7. BIOMATERIAIS	31
1.3. TEMA E OBJETIVOS	35
1.3.1. TEMA.....	35
1.3.2. OBJETIVOS	36
1.3.2.1. GERAL.....	36
1.3.2.2. ESPECÍFICOS	36
1.4. DELINEAMENTO DO ESTUDO	36
REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO II – Desenvolvimento de um microambiente em 3D para estudar a influência das propriedades mecânicas da matriz extracelular na resposta de células tronco	48
2.1. INTRODUÇÃO	49
2.2. METODOLOGIA.....	51
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
2.4. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	66
CAPÍTULO III – Nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com hesperetina em poliamida: uma nova formulação têxtil para administração tópica de fármacos	69
3.1. INTRODUÇÃO	70
3.2. METODOLOGIA.....	72
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
3.4. CONCLUSÃO.....	93

REFERÊNCIAS.....	93
CAPÍTULO IV – Avaliação do uso de meias compressivas impregnadas com nanocápsulas de hesperetina na cicatrização de úlceras venosas: um relato de caso.....	98
4.1. INTRODUÇÃO	99
4.2. METODOLOGIA.....	101
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
4.4. CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS.....	110
CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	116
APÊNDICE A – Hesperetin-loaded lipid-core nanocapsules in polyamide: a new textile formulation for topical drug delivery.....	119
Depósito de Patente junto ao Instituto Nacional Da Propriedade Industrial (INPI) ..	123
APÊNDICE B – Messenger RNA Delivery for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications.....	124
APÊNDICE C – Advances of nanosystems containing cyclodextrins and their applications in pharmaceuticals.....	127
APÊNDICE D – Parecer Consubstanciado do CEP	130
APÊNDICE E – Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos	134
APÊNDICE F –Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	135
APÊNDICE G – Questionário sociodemográfico – Admissão	136
APÊNDICE H –Parâmetros Clínicos – Admissão.....	137
APÊNDICE K – Parâmetros Clínicos – Acompanhamento	138
ANEXO A–Versão adaptada ao Brasil do <i>Aberdeen Varicose Veins Questionnaire</i> (AVVQ).....	140
ANEXO B–Escala Visual Analógica – EVA	144

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

A doença venosa crônica é a causa mais comum das anomalias morfofuncionais do sistema venoso de membros inferiores. Esta enfermidade apresenta importante impacto socioeconômico devido as suas severas manifestações clínicas (1, 2). A insuficiência venosa crônica (IVC) representa a fase mais grave da doença e é caracterizada pela presença de edema, alterações de pigmentação da pele e úlceras venosas (3). As queixas e os sintomas da doença são, portanto, de caráter crônico, subjetivo e periódico. O sintoma principal nem sempre é a dor, por exemplo, a sensação de peso, prurido, câimbra, dentre outros, podem ser referidos e dificultar o diagnóstico, podendo retardar o tratamento adequado em até 40% dos casos (4).

A IVC possui maior prevalência em países ocidentais industrializados, variando de 1% - 17% nos homens e 1% - 40% em mulheres (3, 5). A doença evolui com o curso da idade e está associada à diminuição da mobilidade, depressão e isolamento social (6). No Brasil, a IVC possui prevalência de 35% e 1,5% dos casos apresentam a forma mais severa da doença (1). Durante muitos anos a IVC foi considerada um problema meramente estético ou psicológico. No entanto, a investigação sobre este transtorno aponta consequências sérias, como a ausência ao trabalho, desconforto, dor e diminuição da qualidade de vida, constituindo assim, um grave problema de saúde pública (4, 7).

A IVC consiste em um desequilíbrio da síntese de proteínas (colágeno tipo I e tipo III) da matriz extracelular (MEC), causado pela degradação enzimática através das metaloproteinases da matriz (MMPs). Esta degradação leva ao remodelamento anormal das veias que acarreta na redução da elasticidade das mesmas. Este fenômeno pode estar associado ou não à obstrução do fluxo venoso (8). As fibras de colágeno tipo I conferem rigidez ao vaso, enquanto aquelas do colágeno tipo III, garantem a extensibilidade do mesmo. Em condições patológicas, as MMPs degradam o colágeno tipo III, o que culmina em uma maior quantidade de colágeno tipo I no vaso, ocasionando maior rigidez vascular. Esta por sua vez, é caracterizada pelo aumento das propriedades mecânicas da MEC. Nesse cenário, os fenômenos de mecanotransdução conduzem as células do lúmen vascular a uma desorganização na sua disposição (8, 9). O que acarreta tortuosidade das veias (varicosidades),

incompetência valvular, espessamento irregular da parede do vaso, infiltração de tecido fibroso em camadas musculares, bem como acúmulo de colágeno e fragmentação das fibras elásticas (10).

Em vista do exposto, o presente trabalho foi delineado com base em duas questões de pesquisa: 1) Como as propriedades mecânicas da matriz extracelular podem afetar a resposta celular? 2) Meias compressivas impregnadas com nanocápsulas de hesperetina podem melhorar a cicatrização de úlceras venosas? A busca por tais respostas conduziu a pesquisa ao desenvolvimento de plataformas para investigar a resposta celular frente a diferentes propriedades mecânicas de um microambiente biomimético. Além disso, foram propostas novas alternativas terapêuticas de base nanotecnológica para veicular hesperetina e investigar sua influência no tratamento da IVC. Espera-se com esse trabalho conceber novas tecnologias para estudo e tratamento da IVC, com vistas a melhorar a qualidade de vida e consequentemente reduzir os danos causados por esse importante problema de saúde pública.

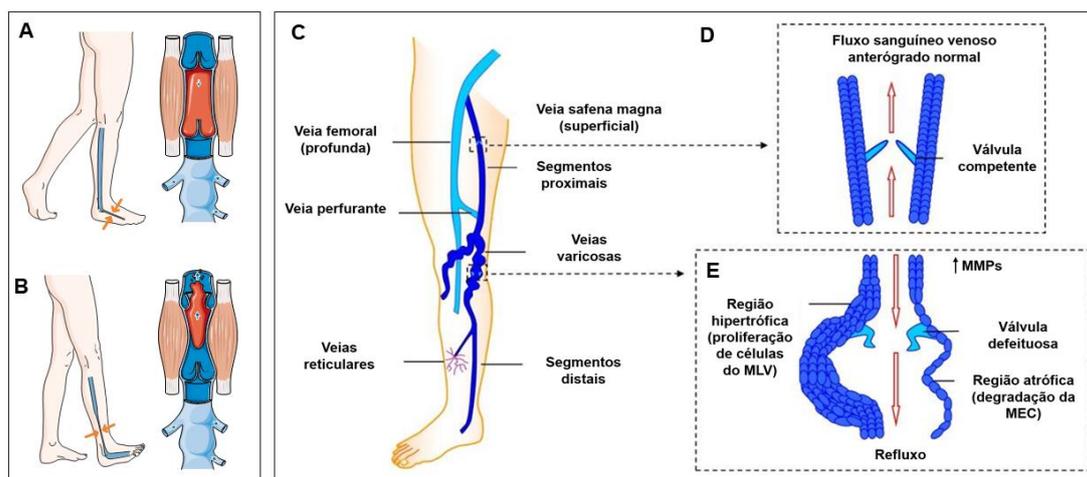
1.2. REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1. INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA

As veias são uma grande rede de vasos que transferem sangue desoxigenado de diferentes tecidos para o coração. Nas extremidades inferiores, um sistema intricado de veias superficiais e profundas é responsável pela transferência de sangue contra a pressão venosa hidrostática. As veias superficiais incluem a veia safena parva, localizada na parte posterior da perna, que vai desde o tornozelo até encontrar a veia poplítea na junção safeno-poplítea e a veia safena magna, localizada no lado medial da perna e é conduzida ao tornozelo até encontrar a veia femoral comum na junção safeno-femoral. As veias profundas incluem as veias femorais tibial, poplítea, femoral, femoral profunda e comum (11). Em todas as partes da extremidade inferior, que não o pé, o sangue flui das veias superficiais, que transportam o sangue da pele e tecido subcutâneo, para as veias profundas, que estão embutidas nos músculos e transportam sangue de todas as outras partes da perna (12). O movimento do sangue das veias superficiais para as veias profundas e coração é guiado por válvulas bicúspides que se projetam da parede interna e asseguram o movimento do sangue em uma direção. As contrações musculares na panturrilha, pé e coxa também ajudam a direcionar o sangue

para o coração e contra a gravidade e a alta pressão venosa hidrostática, que pode atingir 90-100 mmHg no tornozelo na posição em pé (9) (Figura 2A e B).

Figura 2: Sistema venoso das extremidades inferiores e alterações nas veias. A extremidade inferior tem um sistema intrincado de veias superficiais e profundas conectadas por veias perforantes (C) e válvulas venosas que permitem o fluxo sanguíneo na direção anterógrada em direção ao coração (D). A disfunção da veia pode se manifestar como pequenas veias reticulares e pode progredir para veias varicosas dilatadas grandes com válvulas incompetentes (E). As veias varicosas apresentadas evidenciam principalmente regiões atróficas devido ao aumento de MMPs que exacerbam a degradação da MEC. Além disso, podem existir regiões hipertróficas em que o aumento de MMPs e a degradação da MEC promovem a proliferação de células do músculo liso vascular (MLV), levando à tortuosidade, dilatação, válvulas defeituosas e refluxo venoso (E).



Fonte: Adaptada de MacColl and Khalil (2015) com permissão (9) e

www.smart.servier.com (13)

Nesse contexto, a IVC engloba uma cascata de consequências fisiopatológicas decorrentes da hipertensão venosa nas extremidades inferiores, que podem ter etiologias variáveis. De maneira geral, essa hipertensão está associada ao refluxo das veias perforantes devido ao mau funcionamento ou incompetência das válvulas, o que reduz o retorno venoso, levando ao acúmulo de sangue, hipóxia e inflamação (14). Os sinais clínicos decorrentes da doença são variáveis e incluem telangiectasias, varizes, edema, alterações na pele, lipodermatoesclerose (Figura 3 e Tabela 1). Os casos mais graves culminam em ulceração venosa (5). Os sintomas incluem vários graus e formas de desconforto nas pernas, como dor, edema, peso, câimbras e queimação. O espectro

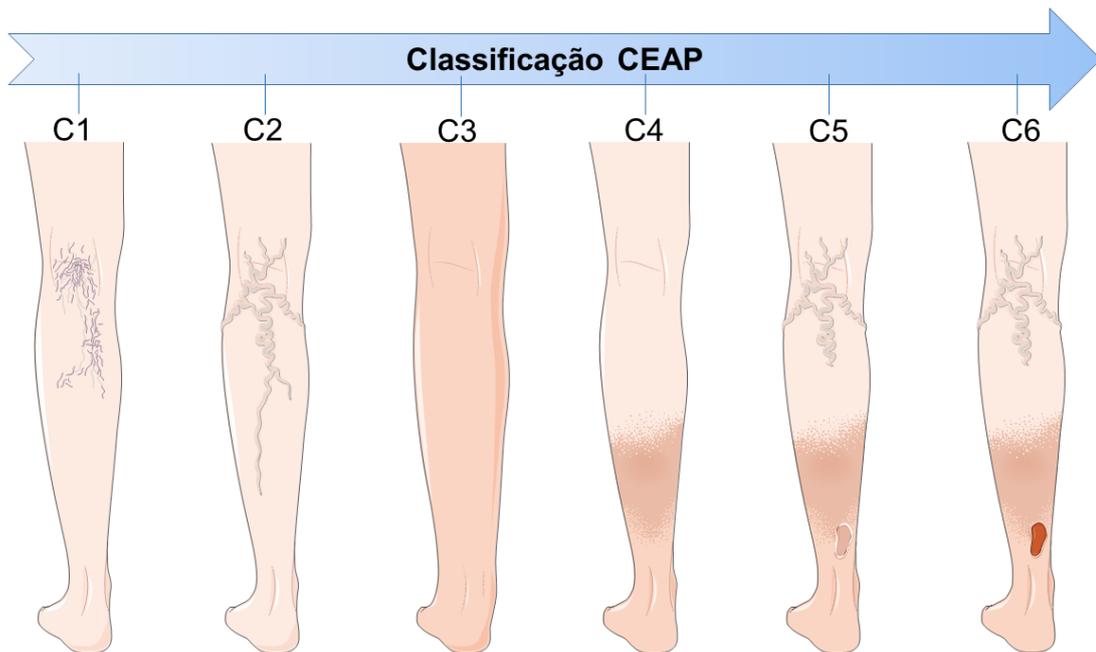
das manifestações clínicas da IVC foi definido de acordo com o sistema de classificação CEAP, cuja descrição varia de C0 a C6 (Tabela 1) (15,16). Nos estágios iniciais (classe C0), o fluxo venoso anormal ou reduzido pode estar presente, mas sem sinais ou sintomas (14,17).

Tabela 1: Classificações clínica, etiológica, anatômica e patofisiológica (CEAP) da doença venosa crônica.

	Classificação clínica	Classificação etiológica	Classificação anatômica	Classificação patofisiológica
C0	Ausência de sinais visíveis ou palpáveis da doença venosa	Congênita	Veias superficiais	Refluxo
C0s	C0 com sintomas menores	Primária	Veias perfurantes	Obstrução
C1	Telangiectasias ou veias reticulares	Secundária (pós-trombótica)	Veias profundas	Refluxo e obstrução
C2	Veias varicosas	Sem causas venosas identificadas	Sem localização identificada	Sem patofisiologia venosa identificada
C3	Edema			
C4a	Pigmentação e/ou eczema			
C4b	Lipodermatoesclerose e/ou atrofia branca			
C5	Úlcera venosa cicatrizada			
C6	Úlcera venosa ativa			
S	Sintomático, incluindo dor, aperto, irritação da pele, peso, cãibras musculares e outras queixas atribuíveis à disfunção venosa			
A	Assintomático			

Fonte: Adaptado de Eklöf et al. 2004 com permissão (15)

Figura 3: Ilustrações da classificação CEAP da doença venosa crônica.



Fonte: Adaptado de www.smart.servier.com (13)

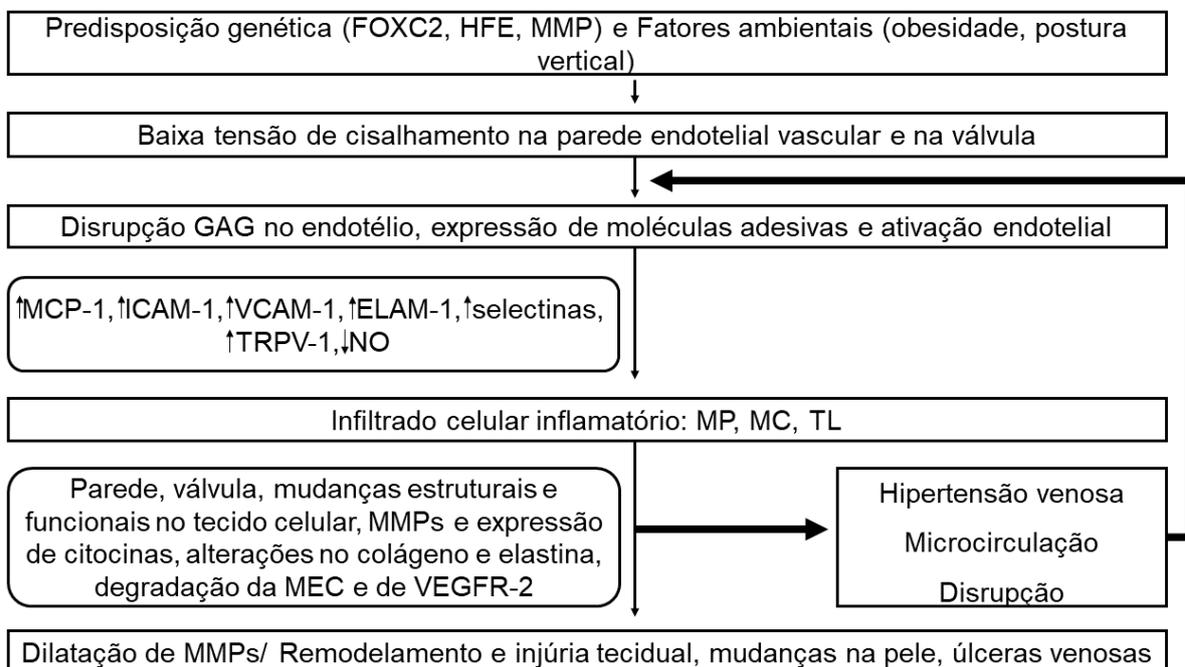
A progressão dos sintomas, severidade e classificação CEAP podem ser um desafio diário para os pacientes e diminuem consideravelmente a qualidade de vida. Além disso, limitam a capacidade do indivíduo em participar de atividades sociais, físicas ou ocupacionais, com consequências financeiras devido à ausência ao trabalho ou incapacidade. Ademais, estas limitações oneram os sistemas previdenciário e de saúde, especialmente nos casos de úlceras venosas, que podem culminar em casos de invalidez laboral (14, 18).

De acordo com Rafetto et al (2018), fatores genéticos e ambientais (imobilidade, inatividade, obesidade) influenciam a predisposição para a doença e desenvolvimento de úlceras. Células inflamatórias são ativadas diante de mudanças na tensão de cisalhamento do endotélio vascular levando a anormalidade do ambiente biomecânico das veias, paredes das veias e válvulas, conduzindo a ruptura das células. Diante desse cenário, as MMPs são ativadas ocasionando alterações nos componentes estruturais da parede da veia, tais como desequilíbrio da quantidade de colágeno e elastina, bem como degradação da MEC, resultando na formação de varizes e alterações na pele podendo levar a formação de úlceras (19).

A base fundamental para a ulceração venosa é a inflamação no endotélio vascular, que está sujeito a um aumento da pressão hidrostática, elevando a pressão venosa ambulatorial, que favorece a resposta inflamatória na parede da veia, culminando no extravasamento de células e moléculas inflamatórias para o interstício. A resposta inflamatória (Figura 4) envolve o recrutamento de leucócitos, em particular

macrófagos, monócitos, linfócitos T e mastócitos, bem como moduladores inflamatórios, quimiocinas, expressão de citocinas, fatores de crescimento, e atividade proteolítica das MMPs. Estas em conjunto com as citocinas são o componente chave da inflamação e desenvolvimento de úlceras, devido aos efeitos significativos que produzem na parede da veia, válvula venosa, endotélio, glicocálix e tecidos adjacentes. Tais efeitos incluem destruição da derme com eventuais alterações na pele e formação de úlcera (2, 14, 19, 20).

Figura 4: Diagrama de fluxo esquemático da fisiopatologia da IVC. Fatores genéticos e ambientais predis põem indivíduos a doenças venosas. Alterações na tensão de cisalhamento e integridade endotelial levam à expressão de moléculas de adesão e ativação de leucócitos endoteliais. Estes fatores, iniciam uma resposta inflamatória com expressão de citocinas, quimiocinas e MMPs. Alterações na estrutura da parede venosa e no funcionamento da válvula levam a dilatação, insuficiência e hipertensão venosa, bem como ruptura na microcirculação. O estado inflamatório persistente com expressão de MMPs e citocinas causa danos e degradação nos tecidos, resultando em alterações na pele e úlcera venosa na perna.



Fonte: Reproduzida de Raffetto et al (2018) com permissão (19)

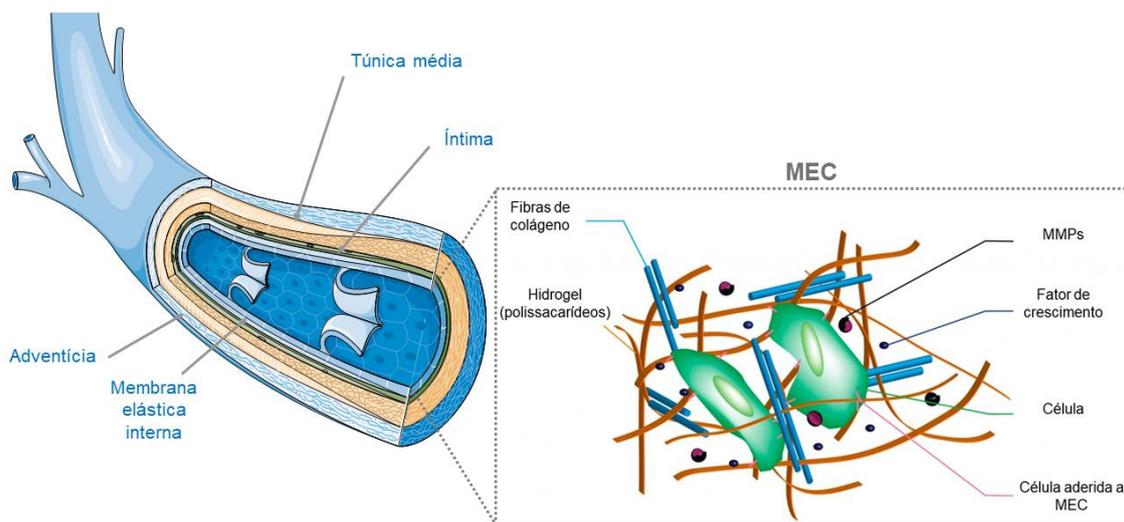
Nota: MEC: matriz extracelular, ELAM-1, molécula de adesão leucocitária endotelial-1; FOXC2, proteína C2 da cabeça da bifurcação; GAG, glicosaminoglicano; HFE, gene da hemocromatose; ICAM-1, molécula de adesão intercelular-1; MC, mastócitos; MCP-1, proteína quimioatratora de monócitos; MP, macrófagos; NO, óxido nítrico; LT, linfócitos T; TRPV-1, receptor transiente de potencial de canal vanilóide; VCAM-1, molécula de adesão celular vascular-1.

Dependendo da MMP específica envolvida, a sua atividade pode não estar associada apenas à quebra de proteínas da MEC, mas também à clivagem de receptores de membrana, como o fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR-2), que é parcialmente responsável por promover a sobrevivência celular e inibir a apoptose. A clivagem deste receptor pode comprometer a viabilidade endotelial (21,22). Diante do exposto, pesquisas adicionais acerca da resposta celular frente a diferentes microambientes biomecânicos, fatores responsáveis por clivar receptores de membrana, bem como alternativas que promovam a distensibilidade das paredes das veias, possibilitarão ter alvos farmacêuticos específicos para restaurar a integridade da microcirculação e tratar o espectro da IVC (20).

1.2.2. MODELOS DE ESTUDO DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

O principal constituinte da parede do vaso é a MEC. Nas veias, a MEC constitui mais da metade da massa da parede e contém principalmente colágeno e elastina. A parede normal dos vasos sanguíneos contém vários tipos funcionalmente distintos de matrizes vasculares, incluindo membrana basal subendotelial, íntima, adventícia e matriz intersticial. Cada um destes segmentos da veia contém diferentes tipos de células e proteínas de matriz (Figura 5).

Figura 5: Estrutura das veias e matriz extracelular. No microambiente natural, as células aderem a matriz de suporte mecânico formada por polissacarídeos e proteínas fibrosas (colágeno e elastina). Proteínas dissolvidas, como fatores de crescimento, permitem a comunicação entre as células e enzimas que degradam a matriz (MMPs), remodelando-a.



Fonte: Adaptado de Shastri & Forget (2014) (23) com permissão e www.smart.servier.com (13)

Evidências científicas experimentais tem demonstrado que os estímulos mecânicos do microambiente celular desempenham um papel fundamental no comportamento das células, tanto em condições fisiológicas quanto em situações patológicas (24,25). Em particular, as células percebem seu microambiente por meio de proteínas transmembranas e, conseqüentemente, regulam diversos processos fisiológicos, como migração, proliferação, diferenciação, morfologia, expressão gênica, bem como a resposta a fármacos (26,27). Fatores de crescimento ligados a MEC, rigidez matricial e topografia influenciam tanto o crescimento celular quanto a regeneração subsequente do tecido (28).

In vivo, as células são incorporadas dentro de um complexo hidrogel tridimensional (3D) – a MEC – que fornece suporte mecânico enquanto conduz a resposta celular (29). Curiosamente, a literatura científica mostra que a MEC também desempenha um papel relevante no aparecimento de um número considerável de doenças. Por exemplo, foi demonstrado que as propriedades

biomecânicas da MEC influenciam diretamente e são influenciadas pela progressão da doença venosa (9), neoplasias (30), além disso, a rigidez da MEC pode afetar a motilidade das células em diferentes processos patológicos (29).

A rigidez da MEC é geralmente representada pelo módulo de elasticidade ou módulo de *Young* e corresponde à rigidez do tecido nativo, orientando sobretudo, a diferenciação de células-tronco nas linhagens de tecidos correspondentes ou processos patológicos como o enrijecimento da parede vascular, na doença venosa. A título de ilustração, substratos que se aproximam dos módulos elásticos de células-tronco cerebrais (0,1 a 1 kPa), pâncreas (1,2 kPa), cartilagem (3 kPa), músculo (8 a 17 kPa) e tecido ósseo (25 a 40 kPa), especialmente células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs), são capazes de promover a diferenciação de neuroblastos, células beta, condrócitos, mioblastos e osteoblastos, respectivamente (31). Existe portanto, um interesse crescente em entender como as células-tronco sentem e respondem à rigidez específica; como a sugestão mecânica é convertida em cascatas de sinalização intracelular; e como a expressão gênica muda, e o destino das células-tronco é determinado (32).

Diante desse contexto, esforços científicos nas áreas de engenharia de tecidos e medicina regenerativa tem sido investidos na perspectiva de desenvolver MECs biomiméticas através da construção de *scaffolds* vascularizados, para estudar a resposta celular frente aos estímulos da matriz. Dessa forma, um *scaffold* de MEC ideal deve manter a estrutura, composição, função biomecânica e propriedades biológicas da MEC nativa. Deve também ser resistente à infecção, biocompatível, facilmente implantado, absorvível, minimamente imunogênico e indutor à migração celular (28,33).

Todavia, a grande maioria dos estudos *in vitro*, não consegue replicar totalmente a situação *in vivo*, uma vez que eles são realizados em duas dimensões (2D), em placas de Petri padrão. Diversas pesquisas confirmaram que os experimentos 2D estão sujeitos a várias limitações, como dissimilaridades na adesão e migração celular ou na organização do citoesqueleto, juntamente com uma análise frágil das complexas interações célula-substrato (34,35).

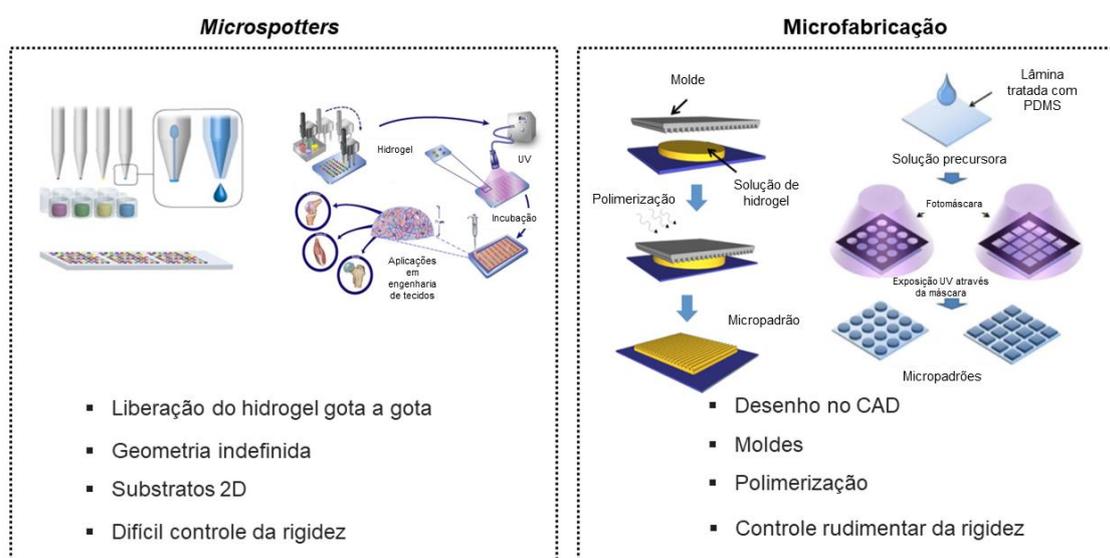
Nessa perspectiva, estudos recentes têm explorado as tecnologias de microarranjos através do uso de robôs – *microspotting* – e métodos de microfabricação (Figura 6) para reconstituir microambientes celulares

biomiméticos. Estes tem sido utilizados para estudar as interações célula-substrato, de modo a entender o desenvolvimento de doenças como a IVC, propor novas alternativas terapêuticas, bem como investigar seu potencial tóxico (36,37,38).

Kuschel et al (2006) desenvolveram um sistema de microambientes, através da técnica de *microspotting*, para investigar comparativamente a adesão celular de forma miniaturizada em grandes painéis de MEC com gasto mínimo de substrato adesivo e células (39). Mais recentemente, Dolatshahi-Pirouz et al (2014) apresentaram uma plataforma 3D de microarranjos de hidrogel carregados com hMSCs. Eles realizaram uma triagem combinatória da diferenciação celular em resposta a múltiplos componentes da MEC e fatores de crescimento (40). Essas técnicas possibilitam a cultura de células que reproduzem a adesão à MEC dos tecidos vivos, mas falham em integrar outros elementos da arquitetura do tecido, como concentrações não-homogêneas de moléculas solúveis, a arquitetura 3D (não plana) do tecido e não controlam adequadamente a rigidez do microambiente (35).

Por outro lado, os métodos de microfabricação também tem sido adotados para a replicação *in vitro* da MEC. Estas técnicas fazem uso de luz ultravioleta (UV), para polimerização dos hidrogéis utilizados, bem como moldes sintéticos (3D) (41,42). Outras abordagens baseadas no uso de polidimetilsiloxano (PDMS) prensados contra MEC líquida, foram reportadas por Nelson et al (2006), que produziram camadas microestruturadas de construções de hidrogel (MEC) micrométricas. Depois de modelar o suporte, as células foram semeadas na superfície da construção de hidrogel estruturada, que foi utilizada como modelo de glândula mamária, constituída por sulcos de diferentes formatos moldados em colágeno do tipo I. Esse modelo foi utilizado para estudar a morfogênese das ramificações dos túbulos epiteliais mamários (35,43).

Figura 6: Métodos clássicos de construções biomiméticas.



Fonte: Adaptado de Dolatshahi-Pirouz et al (2014) (40) e Eng et al (2013) (44) com permissão

Para contornar tais limitações, as técnicas de biopressão 3D tem emergido como ferramentas revolucionárias na construção de MEC biomiméticas. Bioimpressão consiste na deposição espacial camada-a-camada de biomateriais, fatores bioquímicos e células vivas através de um sistema de distribuição controlada por computador para fabricar *scaffolds* de tecido (45-47). Um tecido funcional ou órgão impresso, tem muitas aplicações na triagem de eficácia ou toxicidade de fármacos (49,49), liberação de genes ou biomoléculas (48,50), modelagem de doenças (doença venosa, etc.) e medicina regenerativa (51).

As tecnologias de bioimpressão mais usadas são bioimpressão por extrusão, bioimpressão a jato de tinta, bioimpressão com base em luz e bioimpressão por estereolitografia (45). O mercado global de bioimpressão atingiu US \$ 263,8 milhões em 2015 (52) e prevê-se que atinja US \$ 1,82 bilhões até 2022. O crescimento do mercado será impulsionado por tecnologias de impressão inovadoras, bem como por muitas áreas de aplicação como produtos médicos, personalizados, bioprodutos, produtos alimentícios, dentre outros (47).

Gao et al (2017) desenvolveram e bioimprimiram um vaso usando um bio-híbrido contendo alginato e MEC derivada de tecido vascular. Além deste, o bio-híbrido também continha microesferas de ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA)

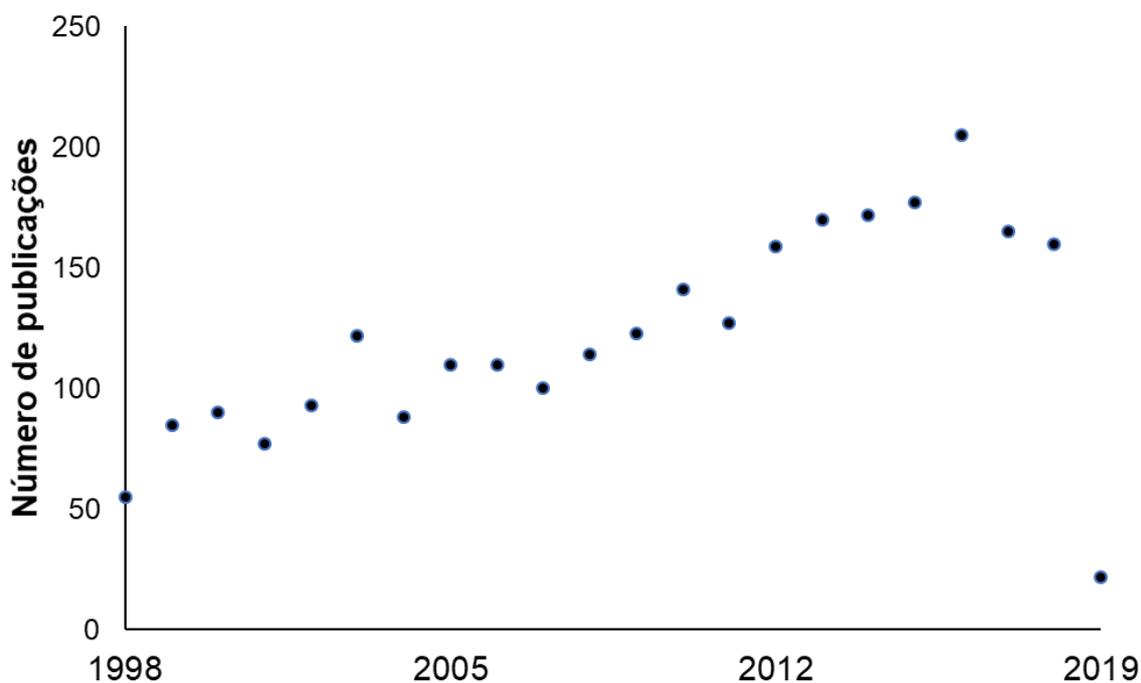
carregadas com células progenitoras endoteliais e atorvastatina. Um método coaxial de biopressão foi utilizado para imprimir o vaso em formato tubular, para possibilitar uma eventual perfusão sanguínea no espaço oco. A combinação do bio-híbrido e atorvastatina liberada aumentou a densidade de neovascularização em um modelo de isquemia de camundongo, validando seu potencial vascular. Este foi o primeiro estudo que demonstrou o potencial do uso de elementos bioquímicos da MEC associados com carreadores de fármacos durante o processo de impressão (53).

Muitos produtos a base de matriz dérmica (*AlloDerm*, *Lifecell Corp.*) e MECs liofilizadas (como os curativos *Cycast®*, *MicroMatrix®*, *CorMatrix®*) atingiram a comercialização. Portanto, hidrogéis de MEC de aplicação injetável podem seguir essa tendência em breve, com um produto chegando aos testes clínicos. Devido à amplitude da pesquisa em várias fontes e alvos de tecidos, os hidrogéis de MEC oferecem uma ampla gama de abordagens para modelos complexos de doenças e lesões, particularmente como terapias injetáveis minimamente invasivas. A base para os esforços de transposição e escalonamento destas tecnologias está em desenvolvimento, já que os hidrogéis de MEC oferecem novas oportunidades e demonstram potencial em aplicações no campo da medicina regenerativa (54).

1.2.3. TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA

Uma recente análise na base de dados *Pubmed*, realizada em 25/02/2019, com a combinação das palavras '*chronic venous insufficiency and treatment*' demonstra que o interesse de pesquisa nessa área vem crescendo de forma significativa (Figura 7). Desde 1998, quando iniciaram as publicações dos primeiros artigos científicos acerca da fisiopatologia da doença, até a data analisada, já se somam um total de 2665 publicações. Ademais, é possível observar que a maior parte dessa produção bibliográfica encontra-se no ano de 2016, o que reforça o crescente interesse pela área. A maior parte desses artigos tem investigado estratégias terapêuticas baseadas no uso de flavonóides, terapia compressiva e estudos mais recentes, demonstram a potencialidade do uso de *microRNAs*, no tratamento da IVC .

Figura 7: Pesquisa realizada na base de dados *Pubmed* no dia 25/02/2019 cruzando as palavras '*chronic venous insufficiency and treatment*'.



Fonte: Menezes, P.P. (2019)

Nota: valores parciais para 2019.

Dentre os trabalhos publicados nesse período, estudos têm demonstrado a potencialidade da administração de flavonóides pela via tópica sem causar danos ao organismo, quando comparada com as vias intravenosa e oral (55-57). De acordo com a Nota Técnica N° 64/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), existem seis medicamentos registrados no Brasil à base de hesperidina e diosmina para tratamento de manifestações da IVC, na forma de comprimidos revestidos. Entretanto, não existe produto tópico contendo esta classe de produtos naturais para tratamento local da doença (58).

Apesar de todos os avanços na identificação da patogênese e consequente tratamento da doença venosa, a terapia compressiva continua sendo a opção terapêutica de primeira escolha (59). Meias compressivas podem ser de pressão variável. Na prática clínica, geralmente recomenda-se aquelas da classe II, que consistem em pressões de compressão externa de 20 a 30 mmHg. Os tratamentos avançados incluem cirurgia. A remoção de veias geralmente envolve a excisão cirúrgica da veia refluxante (frequentemente realizada com pacientes sob anestesia geral). Outra alternativa terapêutica é a

escleroterapia com espuma guiada por ultrassom, que envolve a canulação da veia sob orientação ultrassônica e a injeção de um agente espumante ou esclerosante (por exemplo, tetradecil sulfato de sódio). Este, em contato com a parede do vaso, leva ao desnudamento do endotélio, trombose organizada e oclusão com esclerose. O esclerosante deve entrar em contato com o endotélio venoso para obter sucesso técnico. A radiofrequência e a ablação a laser, são outras técnicas endovasculares que utilizam energia térmica para danificar e contrair a parede venosa, e têm sido utilizadas com sucesso no tratamento do refluxo da veia safena magna (18).

Além destas opções terapêuticas, há relatos da eficácia do cateter de ablação por radiofrequência endovenosa *ClosureFast*™ (*Medtronic, Inc. ; Minneapolis, Minn*). A ultrassonografia duplex detectou taxas de oclusão de 100% em 1 semana, 97% a 99,7% em 3 meses, 95% a 98% em 1 ano e 85% a 93% em 3 anos (60,61). Quando a pesquisa foi acompanhada por cinco anos, os desfechos clínicos revelaram uma mudança geral da classe CEAP C2 para a classe C1 após o uso da ablação, sugerindo eficácia clínica a longo prazo. Os riscos e complicações de todos esses procedimentos incluem perfuração, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, flebite, hematoma, infecção, queimaduras na pele e lesão nervosa (18). Atualmente, existem vários fármacos venoativos, que intervêm em muitos dos mecanismos fisiopatológicos da IVC e tem sido utilizados clinicamente (Tabela 2).

Tabela 2: Efeitos farmacológicos de fármacos venoativos utilizados clinicamente no manejo da IVC.

Fármaco venoativo	Ação farmacológica	Benefício clínico
Daflon®	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Melhora a contratilidade venosa mediada pelo sistema nervoso simpático e a sensibilidade ao cálcio; ▪ Reduz a adesão de leucócitos; inibe a produção de moléculas de adesão leucocitária; ▪ Mitiga a deterioração da válvula venosa e refluxo; ▪ Inibe a produção de fatores pró-inflamatórios; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Melhora o tônus venoso; ▪ Reduz o edema da perna; ▪ Melhora distúrbios tróficos da pele; ▪ Melhora a cicatrização de úlceras;

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumenta as taxas de enzimas antioxidantes; ▪ Reduz a ativação das células endoteliais; reduz as concentrações séricas de ICAM-1, VCAM, VEGF ▪ Aumenta a resistência capilar, reduz o extravazamento capilar. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Melhora os sintomas da IVC e qualidade de vida
Rutosídeos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Potente inibidor da expressão gênica relacionada à inflamação; ▪ Reduz a produção de citocinas inflamatórias (NO, TNF-α, IL-1, IL-6) em macrófagos e neutrófilos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduz o edema da perna; ▪ Melhora os sintomas da IVC.
Dobesilato de cálcio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pode melhorar ou manter a função do endotélio vascular; ▪ Reduz a hiperpermeabilidade capilar; ▪ Inibe a agregação plaquetária; ▪ Reduz a viscosidade do sangue; ▪ Aumenta a atividade da NO-sintase; ▪ Inibe a síntese de prostaglandinas. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduz o edema da perna; ▪ Melhora os sintomas da IVC.
Sulodexida	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Restaura a integridade do GCX; ▪ Reduz a permeabilidade vascular e capilar; ▪ Protege o endotélio vascular; ▪ Anti-inflamatório, anti-apoptótico (IL-1β, IL-8, MCP-1, IL-6, TNF-α); ▪ Reduz a secreção de MMP-9 dos leucócitos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduz a pressão venosa periférica; ▪ Melhora os sintomas da IVC e qualidade de vida; ▪ Melhora a cicatrização de úlceras.

Fonte: Reproduzida de Mansilha e Sousa (2018) com autorização (14)

Nota: IVC: insuficiência venosa crônica; GCX: glicocálix; ICAM: molécula de adesão intercelular; IL: interleucina; MCP: proteína quimioatrativa de monócitos; MMP: metaloproteinase da matriz; NO: óxido nítrico; TNF: fator de necrose tumoral; VCAM: molécula de adesão de células vasculares; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

Uma recente revisão sistemática com metanálise da Colaboração *Cochrane*, reuniu ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos, controlados por placebo, que investigaram a eficácia de várias moléculas venoativas (como rutosídeos, diosmina e dobesilato de cálcio) no tratamento da IVC. Os resultados indicaram que, de forma geral, os medicamentos venoativos têm efeitos

benéficos significativos no edema e podem ter benefícios em alguns outros sinais e sintomas da IVC em comparação ao placebo. No entanto, os resultados foram limitados e mais estudos são necessários para estabelecer a eficácia desses tratamentos para outros desfechos clinicamente importantes (62).

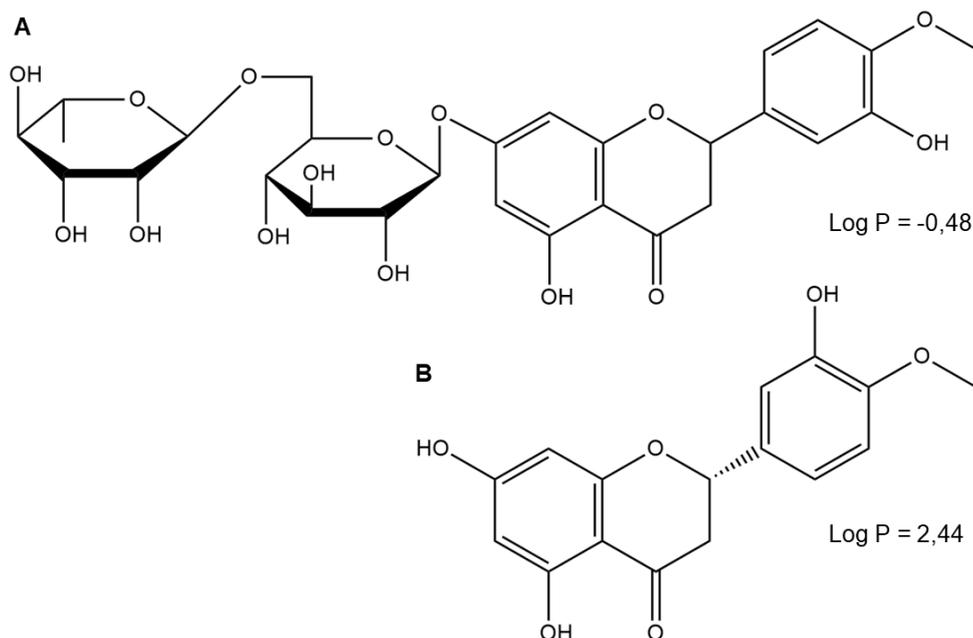
O Daflon[®] é uma fração micronizada de flavonóides purificados que consiste essencialmente em diosmina e hesperidina. Devido aos seus benefícios clínicos já demonstrados (Tabela 2), tem sido atualmente um dos medicamentos mais prescritos e estudados mundialmente, para IVC. Os efeitos do Daflon[®] foram demonstrados em ensaios clínicos, pré-clínicos e revisões sistemáticas com metanálise, com melhorias relatadas no tônus e contratilidade venosa, microcirculação, distúrbios tróficos, cicatrização de úlceras venosas e melhoria da qualidade de vida dos pacientes. Ademais, foram relatadas redução no edema, inflamação, adesão e ativação de leucócitos, bem como na produção de mediadores inflamatórios. Em função disso, este medicamento tem demonstrado excelente perfil de segurança e por isso é recomendado em diretrizes internacionais para o tratamento da IVC e úlceras venosas (63,64). Todavia, uma recente publicação da Colaboração Cochrane alertou que 33 estudos envolvendo um total de 3975 pacientes, sugerem que medicamentos venoativos de uso oral como o Daflon[®], produzem importantes efeitos adversos como desordens gástricas (62).

1.2.4. HESPERETINA

Londoño-Londoño et al (2010) realizaram um estudo interessante demonstrando que os fenômenos de absorção e metabolismo oral de flavonóides como hesperidina, presente na composição do Daflon[®], envolvem processos complexos que comprometem a biodisponibilidade do princípio ativo (65). A hesperidina (3,5,7-tri-hidroxi-7-flavanona ramnoglicosídeo) é um bioflavonóide farmacologicamente ativo encontrado em frutas cítricas. Quando administrado oralmente, é hidrolisada pela β -glicosidase derivada da microflora intestinal, transformando-se em hesperetina, que é então absorvida pelo sangue, conforme fora demonstrado em ensaios clínicos e pré-clínicos (66,67). A hesperetina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxiflavanona) (Figura 7) é a forma não glicosilada da hesperidina, e é eficientemente absorvida no intestino através de transporte polarizado de bomba de prótons acoplado a canal de sódio voltagem

dependente, enquanto a hesperidina é mal transportada através da via paracelular e seu transporte é altamente dependente da conversão para a sua forma aglicona (hesperetina) (66,68).

Figura 7: Estruturas químicas da hesperidina (A) e sua aglicona hesperetina (B).



Fonte: Menezes, P.P. (2019), construída com o software *ChemDraw Ultra 12.0*

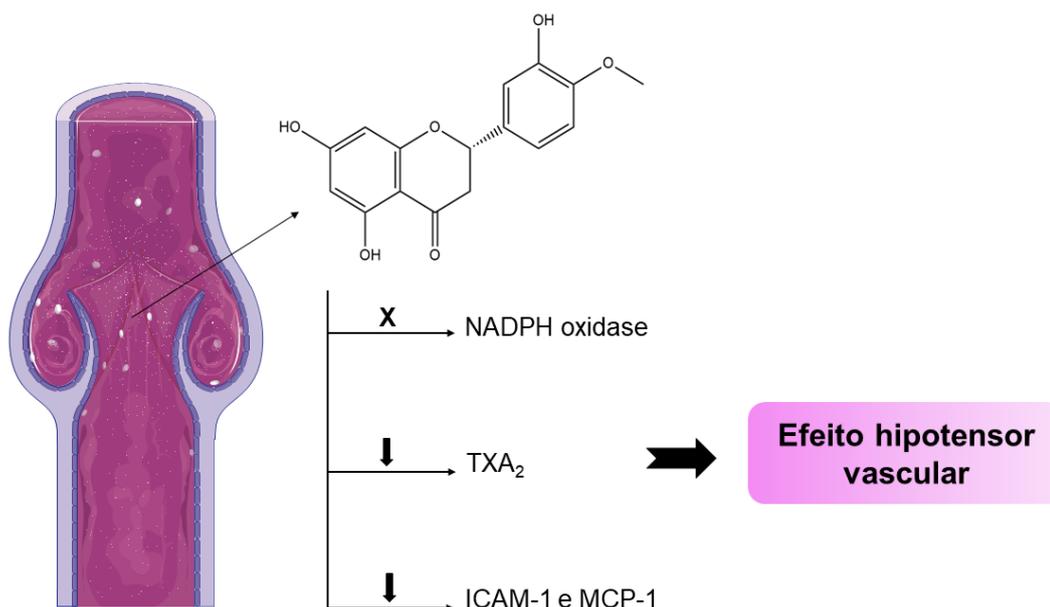
De forma geral, os flavonóides são absorvidos após o transporte, por meio de difusão e ligação à bicamada lipídica das células superficiais do epitélio intestinal (69). Estudos *in vivo*, avaliaram a administração por via oral de flavonóides como rutina, hesperidina, naringina e narirutina, que contêm grupamentos rutinoses ou neoesperidoses. Foi então observado, que estes flavonóides são absorvidos apenas na parte distal do intestino, após hidrólise por enzimas intestinais da microflora do cólon (70). Izumi et al (2000) relataram que, em humanos, isoflavonas na forma de agliconas de soja como genisteína e daidzeína foram absorvidos mais rapidamente e em quantidades cinco vezes maiores que seus glicosídeos (71). Estes achados corroboram com os dados obtidos por Londoño-Londoño et al (2010) em que a hesperetina (aglicona) interagiu com membranas de forma mais eficiente que a hesperidina

(glicosídeo). Neste estudo, a taxa de permeação da hesperetina foi cerca de 400 vezes maior que a taxa obtida para hesperidina em modelo de células Caco-2 (65).

Diante da biodisponibilidade oral da hesperidina e sabendo do potencial farmacológico da sua forma aglicona, hesperetina, outros estudos têm demonstrado o aumento da biodisponibilidade da hesperetina por via tópica sem causar danos aos tecidos, e sem efeitos adversos até então relatados, quando comparada com as vias intravenosa e oral (55,72). Tal estratégia, contribui para uma maior eficácia do fármaco, reduzindo a sua frequência de administração (73). A hesperetina possui atividades hipotensora, vasodilatadora, antioxidante e antiinflamatória, bem relatadas na literatura e fundamentadas em estudos clínicos e pré-clínicos, demonstrando sua segurança (74).

Roohbakhsh et al (2015) em uma revisão sistemática, reuniram evidências científicas acerca dos efeitos benéficos da hesperetina no endotélio vascular. Eles reportaram que os efeitos vasorelaxantes da hesperetina são mediados pela inibição de fosfodiesterases dos tipos 1 e 4. Além disso, também foi explorado o efeito anti-hipertensivo na parede vascular advindo da administração deste flavonóide (74). Yamamoto et al (2013) estudaram o efeito da hesperetina na pressão venosa e função endotelial. Eles detectaram, que este flavonóide atua reduzindo a hipertensão venosa, devido ao aumento da vasodilatação dependente do endotélio e suprime a inflamação nas células endoteliais (75). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa propôs que o possível mecanismo envolvido no efeito hipotensor da hesperetina, é devido a diminuição da expressão gênica do NADPH oxidase (principal gerador de espécies reativas de oxigênio na vasculatura), que resulta na desregulação da expressão gênica do tromboxano A₂ sintase (TXA₂S), seguido pela diminuição do seu produto TXA₂ (fator contrátil derivado do endotélio). Paralelamente, a hesperetina reduz a expressão de ICAM-1 e MCP-1 em células endoteliais (76,77) (Figura 8). Estes são envolvidos na hipertensão do endotélio vascular, uma vez reduzidos, contribuem para um efeito anti-hipertensivo da veia, contribuindo para o restabelecimento do retorno venoso regular, e conseqüente melhora dos sintomas da IVC (14). Sendo assim, a hesperetina é definitivamente um flavonóide promissor na manutenção da fisiologia vascular (67).

Figura 8: Ilustração esquemática dos alvos mediadores do efeito hipotensor vascular da hesperetina.



Fonte: Menezes, P.P. (2019)

Nota: 'X' representa inibição e 'seta descendente' representa diminuição.

1.2.5. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

A escolha da via de administração de fármacos é o maior desafio na etapa do desenvolvimento de medicamentos. Uma vez que precisam ser levados em consideração a dose, frequência de administração, volume da dose e duração do tratamento. Além disso, deve-se atentar para a natureza do medicamento e da doença proposta, bem como o conforto do paciente ao fazer uso do medicamento por tal via. Nesse contexto, diversos materiais poliméricos tem emergido no cenário farmacêutico, devido a versatilidade desses produtos em otimizar os processos de liberação e atuarem na seleção da via de administração do medicamento (78).

Diversos estudos tem demonstrado que embora a via oral, seja largamente empregada para a administração de medicamentos venoativos, ainda existem algumas limitações. A mais comum, consiste no metabolismo de primeira passagem, que reduz a biodisponibilidade das moléculas bioativas, como fora demonstrado para a hesperidina (65,79,80). Outro fator importante,

são as manifestações de efeitos adversos, principalmente gastrintestinais, que podem contribuir com uma resistência do paciente e consequente comprometimento do sucesso no tratamento (62,81).

Nessa perspectiva, a via tópica, tem sido alvo de diversos estudos e recebido destaque para o tratamento de doenças que manifestam-se na pele. Tal preferência se dá devido a redução de efeitos colaterais sistêmicos, em comparação com a administração oral e parenteral, bem como contorna o metabolismo de primeira passagem e mantém a concentração do fármaco no local de ação por períodos mais longos, especialmente para fármacos de meia vida curta, como é o caso da hesperetina (1 – 3h) (82,83).

A pele é dividida em três camadas principais: estrato córneo, epiderme e derme (Figura 9). A porção mais externa, o estrato córneo, é formada por uma camada de corneócitos não viáveis. Estes contêm lipídios neutros (como colesterol), ceramidas e ácidos graxos (ácido linoleico) que desempenham um papel importante na função de barreira da pele. A importante função do estrato córneo é evitar a perda de água das camadas mais profundas, proporcionando uma superfície de pele macia sob diferentes condições atmosféricas, todavia, dificulta a penetração direta de alguns fármacos (84).

A epiderme consiste em um epitélio queratinizado escamoso estratificado que abriga queratinócitos, melanócitos e células de Merkel. Os melanócitos são células dendríticas responsáveis pela produção de melanina, principalmente sob exposição de raios ultravioleta (UV) (85). A derme é o tecido subjacente que suporta a epiderme, caracterizada por ser um tecido elástico-fibroso com presença de colágeno, elastina e fibras reticulares, e hospeda vasos, nervos e receptores sensoriais. O sistema vascular da derme está envolvido na termorregulação em conjunto com glândulas sudoríparas e hipoderme. Em casos de vasoconstrição, a perda de calor do corpo não ocorre. Além disso, este sistema também fornece os nutrientes e oxigênio para a pele (84,85).

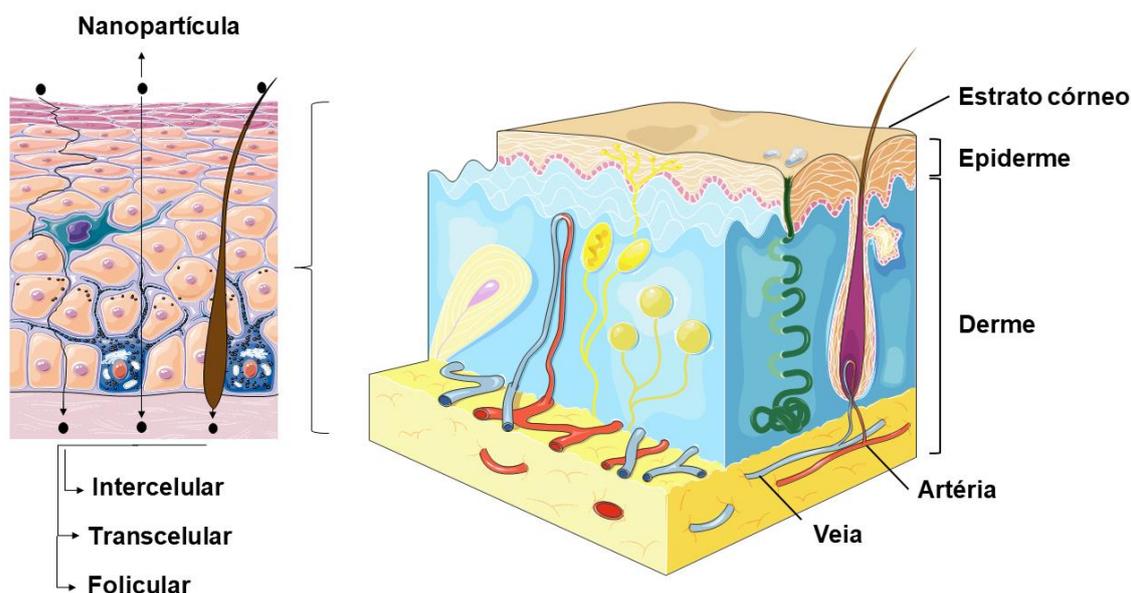
Huang et al (2010) desenvolveram formulações a base de creme e Tsai et al (2010) prepararam microemulsões, para veicular hesperetina e avaliaram seu perfil de permeação cutânea *in vitro*, bem como o potencial de irritação da pele através de estudos *in vivo* em roedores. Os resultados de ambos os estudos demonstraram que as formulações desenvolvidas melhoraram a solubilidade

extrínseca da hesperetina, o que contribuiu para uma maior taxa de permeação do flavonóide na pele, sem sinais de irritação cutânea (85,86,87).

Um limitação importante na administração tópica, consiste na baixa absorção do fármaco devido a função de barreira do estrato córneo. Nos últimos anos, os sistemas nanoparticulados vem recebendo grande atenção como carreadores para uso tópico. As nanopartículas tem várias vantagens sobre cremes e emulsões convencionais em termos de taxa de liberação, proteção do componente ativo, permeabilidade reforçada na pele com níveis mínimos de irritação (82,88). Estas formulações podem atingir as camadas mais profundas da pele através das vias intercelular, transcelular e folicular (Figura 9).

Os fármacos comumente difundem-se na pele através de espaços entre lamelas lipídicas e células adjacentes da membrana (via intercelular) (89). A via transcelular, por sua vez, é caracterizada pelo transporte direto do fármaco através das camadas lipídicas e corneócitos da pele. Este transporte pode ser melhorado pela exposição do estrato córneo a estímulos elétricos (como eletroporação ou iontoforese), mecânicos (sonoporação ou sonoforese), térmicos ou através do uso de promotores de permeação eficazes na formulação (90,91). Os folículos pilosos perfazem 0,1% da área total da pele, e são rotas alternativas para a difusão passiva de fármacos. Isso ocorre devido a densa rede de capilares sanguíneos presente nestes folículos que possibilitam uma penetração eficiente de nanopartículas, agindo como um "reservatório". Estas nanopartículas, acumulam-se nos espaços foliculares e são liberadas de forma controlada (84).

Figura 9: Representação esquemática das camadas da pele e ilustração dos mecanismos de penetração/permeação tópica de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de Mota et al (2017) (83) e www.smart.servier.com (13)

Além das vias oral e tópica, outras rotas de administração tem sido investigadas para a hesperetina, como é o caso da via ocular e intravenosa. Srirangam et al (2012) estudaram a biodisponibilidade ocular de hesperetina, especialmente no que diz respeito à sua distribuição no segmento posterior do olho, após administração sistêmica e tópica em coelhos. A administração ocular de hesperetina por via sistêmica não foi viável, considerando a rápida geração dos metabólitos hidrofílicos. Contudo, a aplicação tópica demonstrou ser mais promissora e precisa (54). Kumar et al (2012), também exploraram o potencial da via ocular para investigar os efeitos vasoprotetores da hesperetina em ratos diabéticos. Neste estudo, eles demonstraram que a hesperetina tem efeitos vasoprotetores potenciais e pode ser útil na prevenção da vasculopatia induzida por diabetes (91). Diante do exposto, as vias tópica e ocular parecem ser as mais adequadas para veicular a hesperetina, um potencial agente vasoprotetor.

1.2.6. NANOPARTÍCULAS

Nos últimos 14 anos, as nanopartículas tem sido o tema mais comum no campo dos sistemas de liberação de fármacos (118). Nanopartículas são

estruturas não-biológicas de tamanho submicrométrico que podem ser sintetizadas de forma personalizada. Estes sistemas foram descritos em muitos materiais, incluindo veículos de fármacos completamente inorgânicos (ouro, prata, sílica e carbono) ou compostos poliméricos, lipídios, lipossomas e dendrímeros, que podem ser concebidos para mimetizar construções biológicas tais como micelas, exossomos ou micropartículas circulantes. Os principais objetivos do uso da nanotecnologia consistem em assegurar biocompatibilidade e toxicidade mínimas, mantendo a eficácia clínica e maximizando as vantagens exclusivas da nanoestrutura (94).

Relatos da literatura demonstraram que nanopartículas de tamanho na faixa de 50 a 300 nm são eficazes na liberação direcionada de fármacos (95). Dependendo dos métodos e materiais usados na preparação, diferentes estruturas supramoleculares podem ser obtidas (96). Na última década, diferentes estudos descreveram vários tipos de nanopartículas com uma ampla variedade de usos (Figura 10), incluindo lipossomas, nanocápsulas poliméricas, nanocápsulas de núcleo lipídico, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanoemulsões, nanocristais, nanopartículas metálicas e dendrímeros (97). Dentre estes, vários tipos tem sido investigados quanto a penetração na pele, com ênfase para nanopartículas poliméricas (98,99), nanopartículas de núcleo lipídico (73, 100) e nanopartículas lipídicas (101,102).

As nanopartículas poliméricas são os sistemas nanométricos mais estudados na área farmacêutica e têm atraído interesse dos pesquisadores nos últimos anos devido às suas propriedades e comportamentos versáteis resultantes do seu tamanho reduzido (103). A maioria das nanopartículas poliméricas usadas como estratégia terapêutica tem um tamanho entre 200 e 300 nm. Vários estudos mostraram que partículas deste tamanho são altamente capazes de interagir com células e transpor barreiras fisiológicas (50,100,103). Fármacos ou biomoléculas podem ser incorporados em nanopartículas por encapsulação ou adsorção na superfície. A depender do método de preparação e composição da fase orgânica, nanoesferas ou nanocápsulas podem ser obtidas (104). As nanocápsulas têm um núcleo líquido (oleoso ou lipídico) no qual o fármaco é dissolvido e envolvido por uma camada de polímero.

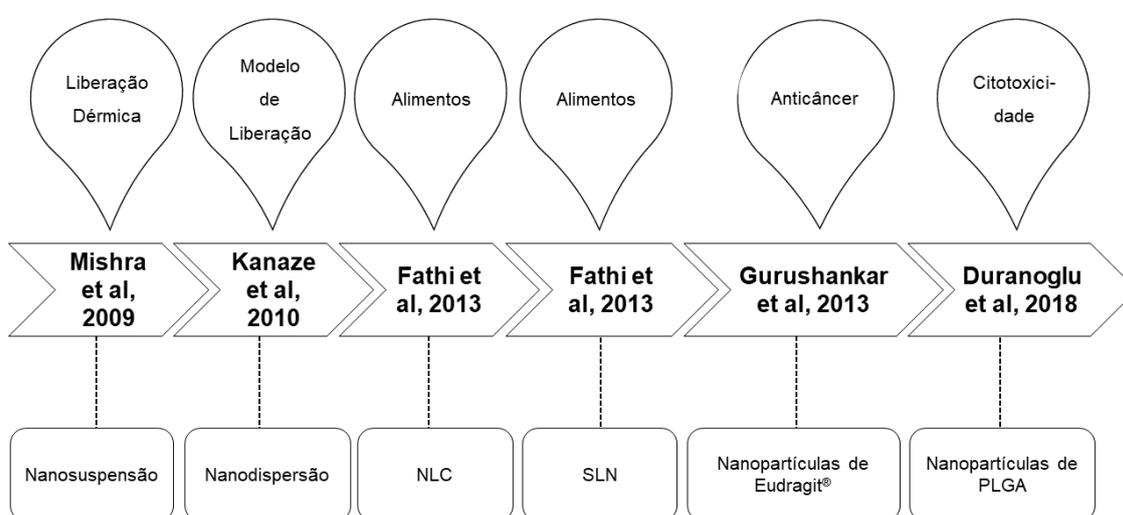
Nanoesferas tem uma matriz polimérica onde o fármaco é uniformemente disperso (105).

Nanopartículas lipídicas são compostas de combinações de um lipídio catiônico, um lipídio estrutural, colesterol e polietilenoglicol (PEG) ligado ao lipídio, misturados em proporções precisas. A presença de lipídios "ajudantes" tais como lipídios estruturais, PEG-lipídios e colesterol, conferem estabilidade e proteção contra opsonização e captação inespecífica pelo sistema mononuclear fagocitário (MPS), resultando em melhoria da meia-vida e eficácia na circulação (106,107). A nível celular, as nanopartículas lipídicas são transportadas via endo-lisossomal com escape endossomal ocorrendo através da desestabilização da membrana iniciada por interações eletrostáticas entre lipídios catiônicos das nanopartículas e lipídios aniônicos da membrana endossomal. Estas formulações com lipídios ionizáveis apresentaram mais sucesso, dentre os sistemas de liberação de genes, mostrando resultados positivos em ensaios clínicos para terapêutica de RNA (108). *Patisiran*, uma nanopartícula lipídica contendo siRNA contra transtirretina, ultrapassou com sucesso os ensaios clínicos de fase 3, tornando-se o primeiro produto a chegar a esta fase. Várias formulações de nanopartículas lipídicas estão atualmente sendo testadas quanto à liberação de RNA mensageiro (mRNA) em vários estudos pré-clínicos e clínicos, incluindo vacinas contra doenças infecciosas, câncer e imunoterapia (50, 109,110).

Até a presente data, poucos estudos de abordagem nanotecnológica foram realizados com a hesperetina (Figura 10). Mishra et al (2009) realizaram o trabalho pioneiro deste flavonóide em um nanossistema. Eles desenvolveram nanosuspensões de hesperetina, com diferentes agentes estabilizantes (Poloxamer 188[®], Inutec SP1[®], Tween 80[®] e *Plantacare* 2000[®]) com potencial para uso na via dérmica (110). Kanaze et al (2010) estudaram o perfil de dissolução, mecanismo de liberação (difusão) e estabilidade de nanodispersões contendo hesperetina (111). Fathi et al (2013) realizaram dois trabalhos envolvendo carreadores lipídicos nanoestruturados e nanopartículas lipídicas sólidas contendo hesperetina e avaliaram seu potencial para uso como fortificantes de alimentos (112,113,114). No mesmo ano, Gurushankar et al desenvolveram nanopartículas de Eudragit[®], para investigar o potencial anticâncer deste fármaco frente a carcinoma oral (114). Mais recentemente,

Duranoglu et al (2018) prepararam nanopartículas de PLGA biocompatíveis em doses que exibem atividade antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (115,116). Todavia, nenhum desses estudos, desenvolveu nanoformulações contendo hesperetina para uso tópico na cicatrização de úlceras venosas.

Figura 10: Linha do tempo apresentando os trabalhos desenvolvidos utilizando hesperetina encapsulada em diferentes nanossistemas, para diversas aplicações.



Fonte: Menezes, P.P. (2019)

Nota: NLC: carreadores lipídicos nanoestruturados; SLN: nanopartículas lipídicas sólidas.

Dentro desse contexto, destacam-se as nanocápsulas de núcleo lipídico, que apresentam na sua composição, o fármaco de interesse, polímero, óleo ou organogel, surfactante e água. Os principais polímeros utilizados como invólucros deste tipo de nanopartículas incluem poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(lactídeo) (PLA), e PLGA. O polímero que forma a parede das nanocápsulas, exerce uma importante influência no controle da liberação do fármaco e é frequentemente um material biodegradável. A PCL, por exemplo, é um dos polímeros mais utilizados nestas formulações, devido a sua capacidade de proteger o fármaco nanoencapsulado, da degradação advinda de fatores ambientais, tais como luz e temperatura. Além disso, vários estudos demonstraram a sua capacidade de conferir estabilidade a formulação. Ademais,

a ausência de carga na sua superfície, contribui para a permeação de fármacos através da pele (103).

Características como tamanho e forma afetam o comportamento das nanopartículas na circulação, devido a fatores hemodinâmicos e tensões de cisalhamento. Nanopartículas maiores podem ser mais propensas a se acumularem em pequenos vasos devido ao aprisionamento mecânico (117). Ademais, o tamanho e forma afetam a absorção das nanopartículas nas células. Partículas esféricas são mais eficientemente internalizadas por células endoteliais que as tubulares ou em forma de disco (99,118). As células endoteliais possuem vários mecanismos de captação celular, incluindo endocitose mediada por receptor, captação via cavéola e fagocitose. A natureza da absorção e do tráfico intracelular afeta o tempo de liberação do fármaco no seu alvo terapêutico dentro da célula (119).

O transporte de nanopartículas para o local da ação desejada pode ser passivo ou ativo. No primeiro, as nanopartículas acumulam as forças mecânicas, como pressão hidrostática e transudação. Nanopartículas menores acumulam-se passivamente em locais de inflamação, devido ao aumento de permeabilidade nessas regiões (120). O transporte ativo, por sua vez, direciona as nanopartículas para o sítio de ação desejado, onde a nanopartícula liga-se covalentemente a uma molécula na superfície do receptor. Estas moléculas podem ser fragmentos de anticorpos, ligantes celulares, ou pequenos peptídeos com uma afinidade pelo alvo no local de ação pretendido onde o fármaco deve ser liberado. Alvos ideais de nanopartículas devem ser seguros e específicos para a maior extensão do efeito possível. No que se refere a segurança, a ligação das nanopartículas as moléculas alvo, podem afetar as vias de sinalização mediadas por estes ligantes (99,121).

Terapias com nanopartículas têm se mostrado promissoras no tratamento de várias doenças, e são aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o manejo de certos tipos de câncer. Cada vez mais, esta tecnologia tem saído das bancadas, movendo-se para o leito dos pacientes. Porém, mais pesquisas são necessárias para esclarecer exatamente como essas terapias funcionam e qual a melhor combinação de alvos, materiais e formas terapêuticas para os pacientes (99).

1.2.7. BIOMATERIAIS

Nesta sessão serão sumarizadas as evidências científicas para as abordagens clínicas de modalidades de cicatrização de úlceras venosas baseadas em polímeros, bem como as mais recentes e inovadoras estratégias terapêuticas para o tratamento das mesmas.

A escolha do curativo ou biomaterial apropriado para o tratamento de feridas crônicas, como úlceras venosas, pode efetivamente promover a cicatrização das mesmas. Ademais, um curativo adaptado à lesão do paciente, reduz potencialmente a morbidade e os custos financeiros (122). Nessa perspectiva, uma série de técnicas e curativos inovadores tem sido aplicados com o objetivo de melhorar a cicatrização de feridas crônicas, incluindo os sistemas de liberação de fatores de crescimento (123), terapias com células tronco (124), estimulação mecânica baseada em compressão (125,126), além de formulações a base de filmes e hidrogéis. Tais estratégias visam contornar as limitações das técnicas convencionais, que são ineficazes para alguns indivíduos (127).

Hidrogéis são considerados ferramentas-chave na concepção de biomateriais, como curativos, sistemas para liberação controlada de fármacos, bem como *scaffolds* para células. Os hidrogéis consistem em redes poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, capazes de absorver grandes quantidades de água ou exsudatos. A sua afinidade em absorver a água deve-se a presença de grupos funcionais hidrofílicos, como álcoois, carboxilas e ácidos sulfônicos, na superfície do polímero (128). A versatilidade de curativos a base de hidrogéis está associada com a sua capacidade de polimerizar-se covalente ou não covalentemente para sustentar suas estruturas conformacionais. Além disso, estes curativos são eficazes no tratamento de feridas, devido a facilidade de aplicação, flexibilidade e permeabilidade ao transporte de oxigênio e metabólitos para o microambiente da lesão (127).

Nesse contexto, polímeros naturais como gelatina e quitosana tem sido largamente estudados como veículos de fármacos com potencial para cicatrização de feridas (129-131). A quitosana interage com moléculas negativamente carregadas (132) como polissacarídeos aniônicos, proteínas e ácidos nucléicos presentes na pele. Dessa forma, apresentam forte adesão aos tecidos da ferida, promovendo a coagulação e subsequente cicatrização (133).

Sandoval et al (2011) testaram a ação de hidrogel de quitosana, sem fármaco, como adjuvante no processo de cicatrização de úlceras venosas, em 16 pacientes, que faziam uso de bandagem tripla de compressão. No final do tratamento, eles observaram uma redução de 89% da área da úlcera quando comparada com a área inicial do estudo. Estes resultados foram bem melhores, do que havia sido reportado para o tratamento apenas com compressão (133). Morgado et al (2017) avaliaram o efeito cicatrizante de hidrogéis de quitosana, como veículos para ibuprofeno complexado em ciclodextrinas. Os ensaios *in vivo* revelaram que a presença dos hidrogéis contendo ibuprofeno evitou um processo inflamatório excessivo, contribuindo para uma cicatrização mais precoce da lesão (134,135). A gelatina, é um derivado do colágeno e também tem várias aplicações na cicatrização de diferentes lesões cutâneas, devido as suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade (127). Morimoto et al (2015) desenvolveram hidrogéis de gelatina e avaliaram a segurança do uso desta formulação no tratamento de úlceras venosas (135).

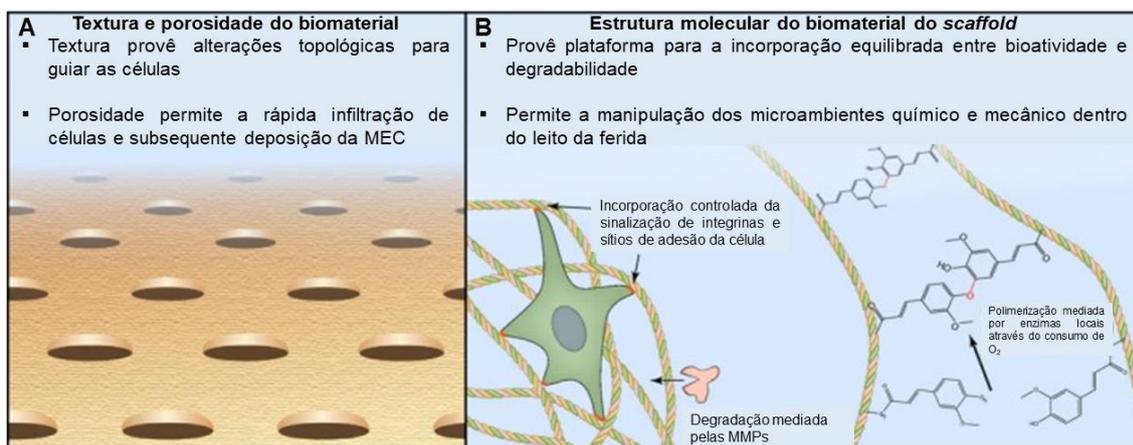
Conforme já fora mencionado, a terapia compressiva ainda tem sido a melhor estratégia no manejo de úlceras venosas. Uma revisão sistemática publicada em 2016 relatou que a terapia compressiva aumenta as taxas de cicatrização da úlcera, quando comparado com nenhuma compressão (136,137), principalmente após seis meses de tratamento (138). Apesar do advento dos estudos envolvendo tecidos inteligentes, poucos pesquisadores trabalharam no sentido da utilização dos mesmos para aprimorar o efeito na cicatrização de úlceras.

Tecidos de aplicação médica ou tecidos inteligentes, são utilizados na superfície do corpo, na forma de pijamas, camisetas e calças com propriedades antialérgicas; artigos de vestuário de malha como meias, cotoveleiras, joelheiras com propriedades antipsoriásicas; ou até mesmo, roupas íntimas com ação antimicótica, antibacteriana e anti-infecciosa. Os tecidos listados acima são multifuncionais quando aplicados na pele, dado o fato de que além do seu principal papel de proteger e isolar o corpo do meio ambiente, eles também tem uma ação terapêutica direta, principalmente em terapias tópicas. Nessas situações, o fármaco é liberado do tecido para a pele através de estímulo cutâneo, como sudorese, fricção e enzimas da pele (139).

A otimização de meias inteligentes ainda é inexplorada no sentido de fornecer benefícios extras à compressão dinâmica. Dessa forma, existe uma necessidade de desenvolver uma estrutura inteligente que possa sustentar a pressão, fornecer compressão estática e dinâmica controlável através do uso de fibras inteligentes. Isso revolucionaria definitivamente o método de tratamento compressivo de pacientes para o manejo de úlceras venosas através da compressão associada a uma molécula farmacologicamente ativa (140). Muitas vezes a resistência ao tratamento, limita o sucesso da cicatrização. O que pode se originar de mudanças biológicas subjacentes que afetam a capacidade das células da pele de realizar adequadamente o processo de reparo tecidual, através do depósito inadequado de MEC ou até por alteração de síntese protéica via RNA (141,142).

A habilidade de corrigir essas anormalidades biológicas dentro do microambiente da ferida, tem sido ativamente explorada no campo da engenharia de tecidos e biomateriais através do uso de abordagens nanotecnológicas, como uma estratégia fundamental para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (143-145). Nesse contexto, tem-se dado ênfase ao desenvolvimento de estruturas poliméricas biodegradáveis que mimetizam múltiplas características da MEC nativa e permitem a modulação da matriz dentro do leito da ferida (146,147). Tais estruturas, naturais ou sintéticas, têm microestruturas porosas marcadas com sítios de ligação celular para apoiar a infiltração e adesão de células, permitir a difusão de nutrientes e metabólitos, ter mecanismos de degradação controláveis e atuar como reservatórios para reter agentes bioativos que estimulem mecanismos inatos de reparo tecidual (145,146) (Figura 11). Desta forma, eles agem como um suporte ao microambiente nativo da úlcera para regular o comportamento celular, como a proliferação, migração e diferenciação de células dentro da ferida, fornecendo elementos que são cruciais para o fechamento eficiente da lesão (142).

Figura 11: (A) A textura, topologia e porosidade dos biomateriais podem ser utilizados para facilitar a rápida infiltração celular e subsequente deposição de matriz. (B) Manipular a estrutura molecular dos biomateriais permite a incorporação controlável de sítios de adesão celular, mecanismos de degradação, propriedades mecânicas e mecanismos regulatórios para a manipulação do microambiente local.



Fonte: Reproduzido de Pop e Almquist com permissão (142).

Diante do exposto, as terapias com células tronco tem recebido grande atenção no desenvolvimento de alternativas para a regeneração tecidual do microambiente de feridas crônicas. As células-tronco têm a capacidade única de se diferenciar em vários tecidos do corpo e podem ser obtidas de diversas fontes, como medula óssea, sangue periférico, cordão umbilical e papila apical dentária (148-150). Shohara et al (2012) mostraram que feridas crônicas induzidas em roedores foram eficientemente tratadas com células perivasculares do cordão umbilical. Esta terapia atingiu cicatrização significativamente mais rápida do que as lesões tratadas com fibroblastos da pele humana (151).

Mais recentemente, um hidrogel de poli (álcool vinílico) (PVA) contendo MSCs foi testado por Ribeiro et al (2014), para promover a cicatrização em dois cães com grandes lesões de pele que não responderam aos tratamentos convencionais. Ambos os animais apresentaram regeneração significativa da pele após o tratamento com MSC-PVA. O biomaterial desenvolvido melhorou a cicatrização das feridas através de mecanismos parácrinos multifacetados, reduziram a inflamação e formaram um tecido de granulação delgado, quando

comparado a cicatrização mínima observada nas feridas do grupo controle (151,152).

A indústria farmacêutica americana *Moderna Therapeutics*, tem sido pioneira no desenvolvimento de medicamentos biológicos a base de mRNA. Eles utilizam essa modalidade de gene para direcionar a expressão local de uma ou mais proteínas no tecido alvo. As células reconhecem o gene como se tivesse sido produzido no próprio corpo. A aplicação inicial dessa modalidade envolve a injeção local no tecido de mRNA do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A), que potencialmente conduz à formação de mais vasos sanguíneos e melhora o suprimento local de sangue (50,152). O uso de mRNA para iniciar um surto forte, local e transitório da expressão do VEGF-A pode ajudar a superar os desafios associados a abordagens anteriores para regular o VEGF-A nos tecidos. A expectativa é que no futuro, essa abordagem possa fornecer uma opção de tratamento regenerativo único para a cicatrização de feridas e doenças vasculares (153).

Zangi et al (2013) demonstraram a regeneração de cardiomiócitos através do aumento da permeabilidade vascular induzida por VEGF-A-mRNA (152). Uma recente revisão sistemática realizada pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrou que o uso das terapias com mRNA apresenta excelente eficácia. Todavia ainda não existem estudos envolvendo a expressão deste gene em hidrogéis para avaliar a captação de mRNA em um microambiente celular (50).

1.3. TEMA E OBJETIVOS

1.3.1. TEMA

O tema de pesquisa desta tese contempla as áreas da medicina regenerativa e nanotecnologia farmacêutica. Dentro da área da medicina regenerativa, a presente tese concentra-se no estudo da resposta de células tronco e expressão de mRNA nanoencapsulado, frente a diferentes propriedades mecânicas da matriz extracelular, envolvidas no mecanismo patogênico de úlceras venosas. Na área da nanotecnologia, esta pesquisa concentra-se no estudo de uma formulação de nanocápsulas contendo hesperetina em diferentes veículos. A proposta desses biomateriais inovadores tem como objetivo a cicatrização de úlceras venosas.

1.3.2. OBJETIVOS

1.3.2.1. GERAL

Desenvolver tecnologias para estudo e tratamento de úlceras venosas, através do desenvolvimento de microambientes biomiméticos e biomateriais nanotecnológicos.

1.3.2.2. ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver via impressão 3D, microambientes biomiméticos para estudo das propriedades mecânicas da matriz extracelular;
- b) Investigar a resposta celular frente as diferentes propriedades mecânicas da matriz;
- c) Avaliar a expressão de mRNA nanoencapsulado nos microambientes bioimpressos;
- d) Desenvolver suspensões de nanocápsulas contendo hesperetina;
- e) Impregnar a suspensão de nanocápsulas contendo hesperetina em meias compressivas;
- f) Validar um método analítico para determinação quantitativa da hesperetina na suspensão de nanocápsulas, bem como nos biomateriais propostos;
- g) Avaliar o perfil de impregnação das nanocápsulas em fibras têxteis;
- h) Avaliar a viabilidade celular e potencial irritante de nanocápsulas contendo hesperetina;
- i) Avaliar clinicamente a capacidade das meias compressivas desenvolvidas quanto a redução da hipertensão venosa, melhora na qualidade de vida e cicatrização de úlceras venosas;

1.4. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Para alcançar os objetivos, a condução deste trabalho ocorrerá em três etapas, que são apresentadas em formato de capítulos. Cada um desses capítulos apresenta um objetivo específico necessário para alcançar o objetivo geral da tese. Para cada etapa e para cada objetivo a ser alcançado, utilizar-se-á um conjunto de metodologias experimentais específico. A estrutura do

trabalho, com os capítulos, seus objetivos e métodos, é apresentada na Figura 12.

Figura 12: Estrutura das etapas da pesquisa desenvolvida. Status: (*) artigos já publicados no momento da defesa desta tese; (**) artigos submetidos no momento da apresentação deste trabalho; (***) artigo a ser submetido.

Estudos	Objetivos	Questões de Pesquisa	Objeto de estudo	Métodos
Capítulo 2 (***)	Estudar a resposta celular frente a diferentes propriedades mecânicas da MEC	Como as células respondem a diferentes microambientes? De que forma se dá a captação de mRNA?	1. Impressão 3D de microambientes 2. Determinação das propriedades mecânicas da MEC 3. Estudo da resposta celular	1. Estereolitografia 2. Reologia 3. Viabilidade celular, espalhamento, expressão da proteína GFP
Capítulo 3 (*)	Propor uma nova formulação têxtil de base nanotecnológica contendo hesperetina	Nanocápsulas são capazes de liberar e permear hesperetina através da pele? A impregnação de nanocápsulas em tecido é viável?	1. Desenvolvimento de nanocápsulas 2. Estudos de liberação e permeação 3. Estudo de impregnação das nanocápsulas no tecido	1. Método de nanoprecipitação 2. Liberação e permeação 3. Lavagem do tecido
Capítulo 4 (**)	Investigar a cicatrização de úlceras venosas utilizando meias compressivas impregnadas com hesperetina nanoencapsulada	A formulação é capaz de reduzir a hipertensão venosa, melhorar qualidade de vida e a cicatrização de úlceras venosas?	1. Determinar os diâmetros venosos da veia safena magna 2. Avaliar a qualidade de vida do paciente 3. Investigar a cicatrização das úlceras	1. Duplex scan venoso 2. Questionário Aberdeen 3. Avaliação da retração da úlcera
Produção Complementar				
Apêndice A (*)	Revisar as abordagens atuais da engenharia de tecidos que utilizam hidrogel com material genético	Quais as aplicações do mRNA em medicina regenerativa?	1. Entrega de mRNA 2. Hidrogéis em medicina regenerativa e entrega de mRNA 3. Aplicações de mRNA	Pesquisa teórica qualitativa: 1. Análise crítica da literatura visando contribuir com a concepção de novos estudos
Apêndice B (*)	Revisar os avanços e aplicações de nanossistemas contendo ciclodextrinas	Quais são as formulações, que contém nanopartículas e ciclodextrinas, mais úteis para diagnóstico e tratamento de doenças?	1. Nanossistemas contendo ciclodextrinas 2. Liberação de fármacos 3. Aplicações	Revisão sistemática: 1. Análise dos novos tipos de nanopartículas contendo ciclodextrinas como adjuvantes da formulação

Fonte: Menezes, P.P. (2019)

REFERÊNCIAS

1. Rossi FH, Volpato MG, Metzger PB, Beteli CB, Almeida BLd, Rossi CBO, et al. Relationships between severity of signs and symptoms and quality of life in patients with chronic venous disease. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2015;14:22-8.
2. Eberhardt RT, Raffetto JD. Chronic venous insufficiency. *Circulation*. 2014;130(4):333-46.
3. Crisóstomo RSdS, Costa DSA, Martins CdLB, Fernandes TIR, Armada-da-Silva PA. Influence of Manual Lymphatic Drainage on Health-Related Quality of Life and Symptoms of Chronic Venous Insufficiency: A Randomized Controlled Trial. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2015;96(2):283-91.
4. Rabe E, Pannier F. Societal costs of chronic venous disease in CEAP C4, C5, C6 disease. *Phlebology*. 2010;25 Suppl 1:64-7.
5. Dean SM. Cutaneous Manifestations of Chronic Vascular Disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2018;60(6):567-79.
6. Bhatt AB, Landzberg MJ, Gerhard-Herman M, Rodriguez-Huertas E, Graham D, Valente AM. Pathophysiology of chronic venous insufficiency in adults with a Fontan circulation (a pre-defined substudy of the CALF investigation). *International Journal of Cardiology*. 2013;165(1):41-5.
7. Chwala M, Szczeklik W, Szczeklik M, Aleksiejew-Kleszczynski T, Jagielska-Chwala M. Varicose veins of lower extremities, hemodynamics and treatment methods. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*. 2015;24(1):5-14.
8. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jullien ND, Lembrez N, Mestries-Dubois P, Fabiani JN, et al. Decreased production of collagen Type III in cultured smooth muscle cells from varicose vein patients is due to a degradation by MMPs: possible implication of MMP-3. *Journal of vascular research*. 2005;42(5):388-98.
9. MacColl E, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2015;355(3):410-28.
10. Sansilvestri-Morel P, Fioretti F, Rupin A, Senni K, Fabiani JN, Godeau G, et al. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? *Clinical science (London, England : 1979)*. 2007;112(4):229-39.
11. Recek C. Conception of the venous hemodynamics in the lower extremity. *Angiology*. 2006;57(5):556-63.
12. Lim CS, Davies AH. Pathogenesis of primary varicose veins. *The British journal of surgery*. 2009;96(11):1231-42.
13. Art SM. [Available from: <https://smart.servier.com/>].
14. Mansilha A, Sousa J. Pathophysiological Mechanisms of Chronic Venous Disease and Implications for Venoactive Drug Therapy. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(6).
15. Eklof B, Rutherford RB, Bergan JJ, Carpentier PH, Gloviczki P, Kistner RL, et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *Journal of vascular surgery*. 2004;40(6):1248-52.
16. Rutherford RB, Padberg FT, Jr., Comerota AJ, Kistner RL, Meissner MH, Moneta GL. Venous severity scoring: An adjunct to venous outcome assessment. *Journal of vascular surgery*. 2000;31(6):1307-12.
17. Sociedade Brasileira de Cirurgia Vascular. Projeto Diretrizes. Insuficiência Venosa Crônica: Diagnóstico e Tratamento. 2015.

18. McArdle M, Hernandez-Vila EA. Management of Chronic Venous Disease. *Texas Heart Institute Journal*. 2017;44(5):347-9.
19. Raffetto JD. Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers. *The Surgical clinics of North America*. 2018;98(2):337-47.
20. Chi YW, Raffetto JD. Venous leg ulceration pathophysiology and evidence based treatment. *Vascular medicine (London, England)*. 2015;20(2):168-81.
21. Pocock ES, Alsaigh T, Mazor R, Schmid-Schönbein GW. Cellular and molecular basis of Venous insufficiency. *Vascular Cell*. 2014;6:24.
22. Alsaigh T, Pocock ES, Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW. Acute venous occlusion enhances matrix metalloprotease activity: Implications on endothelial dysfunction. *Microvascular research*. 2011;81(1):108-16.
23. Shastri VP, Forget A. Development of the next generation of synthetic extracellular matrices for 3D cell culture. *Labor&more*. 2014;2.
24. Huang G, Wang L, Wang S, Han Y, Wu J, Zhang Q, et al. Engineering three-dimensional cell mechanical microenvironment with hydrogels. *Biofabrication*. 2012;4(4):042001.
25. Ulrich TA, Jain A, Tanner K, MacKay JL, Kumar S. Probing cellular mechanobiology in three-dimensional culture with collagen-agarose matrices. *Biomaterials*. 2010;31(7):1875-84.
26. Moscato S, Ronca F, Campani D, Danti S. Poly(vinyl alcohol)/gelatin Hydrogels Cultured with HepG2 Cells as a 3D Model of Hepatocellular Carcinoma: A Morphological Study. *Journal of functional biomaterials*. 2015;6(1):16-32.
27. Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *Journal of biomechanics*. 2010;43(1):55-62.
28. Sarrafian TL, Bodine SC, Murphy B, Grayson JK, Stover SM. Extracellular matrix scaffolds for treatment of large volume muscle injuries: A review. *Veterinary surgery : VS*. 2018;47(4):524-35.
29. Cavo M, Fato M, Peñuela L, Beltrame F, Raiteri R, Scaglione S. Microenvironment complexity and matrix stiffness regulate breast cancer cell activity in a 3D in vitro model. *Scientific Reports*. 2016;6:35367.
30. Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia*. 2007;55(12):3989-4014.
31. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-89.
32. Lv H, Li L, Sun M, Zhang Y, Chen L, Rong Y, et al. Mechanism of regulation of stem cell differentiation by matrix stiffness. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6(1):103.
33. Smith BD, Grande DA. The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nature reviews Rheumatology*. 2015;11(4):213-22.
34. Infanger DW, Lynch ME, Fischbach C. Engineered Culture Models for Studies of Tumor-Microenvironment Interactions. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2013;15(1):29-53.
35. Perez-Castillejos R. Replication of the 3D architecture of tissues. *Materials Today*. 2010;13(1):32-41.
36. Cha C, Piraino F, Khademhosseini A. Chapter 9 - Microfabrication Technology in Tissue Engineering. In: Blitterswijk CAV, De Boer J, editors. *Tissue Engineering (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 283-310.

37. Gauvin R, Chen Y-C, Lee JW, Soman P, Zorlutuna P, Nichol JW, et al. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials*. 2012;33(15):3824-34.
38. Ranga A, Gobaa S, Okawa Y, Mosiewicz K, Negro A, Lutolf MP. 3D niche microarrays for systems-level analyses of cell fate. *Nature Communications*. 2014;5:4324.
39. Kuschel C, Steuer H, Maurer AN, Kanzok B, Stoop R, Angres B. Cell adhesion profiling using extracellular matrix protein microarrays. *BioTechniques*. 2006;40(4):523-31.
40. Dolatshahi-Pirouz A, Nikkhah M, Gaharwar AK, Hashmi B, Guermani E, Aliabadi H, et al. A combinatorial cell-laden gel microarray for inducing osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*. 2014;4:3896.
41. Cheung YK, Gillette BM, Zhong M, Ramcharan S, Sia SK. Direct patterning of composite biocompatible microstructures using microfluidics. *Lab on a Chip*. 2007;7(5):574-9.
42. Panda P, Ali S, Lo E, Chung BG, Hatton TA, Khademhosseini A, et al. Stop-flow lithography to generate cell-laden microgel particles. *Lab Chip*. 2008;8(7):1056-61.
43. Nelson CM, VanDuijn MM, Inman JL, Fletcher DA, Bissell MJ. Tissue Geometry Determines Sites of Mammary Branching Morphogenesis in Organotypic Cultures. *Science*. 2006;314(5797):298-300.
44. Eng G, Lee BW, Parsa H, Chin CD, Schneider J, Linkov G, et al. Assembly of complex cell microenvironments using geometrically docked hydrogel shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(12):4551-6.
45. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology*. 2014;32(8):773-85.
46. Ozbolat IT, Yu Y. Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. *IEEE transactions on bio-medical engineering*. 2013;60(3):691-9.
47. Choudhury D, Tun HW, Wang T, Naing MW. Organ-Derived Decellularized Extracellular Matrix: A Game Changer for Bioink Manufacturing? *Trends in biotechnology*. 2018;36(8):787-805.
48. Peng W, Unutmaz D, Ozbolat IT. Bioprinting towards Physiologically Relevant Tissue Models for Pharmaceuticals. *Trends in biotechnology*. 2016;34(9):722-32.
49. Nguyen DG, Pentoney SL, Jr. Bioprinted three dimensional human tissues for toxicology and disease modeling. *Drug discovery today Technologies*. 2017;23:37-44.
50. Patel S, Athirasala A, Menezes PP, Ashwanikumar N, Zou T, Sahay G, et al. Messenger RNA Delivery for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Tissue engineering Part A*. 2018.
51. Ozbolat IT. Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation. *Trends in biotechnology*. 2015;33(7):395-400.
52. Bergin J. Bioprinting: Technologies and Global Markets: BCC Research; 2016 [Available from: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/bioprinting-markets-technologies-report-bio148a.html>].
53. Gao G, Lee JH, Jang J, Lee DH, Kong J-S, Kim BS, et al. Tissue Engineering: Tissue Engineered Bio-Blood-Vessels Constructed Using a Tissue-Specific Bioink and 3D Coaxial Cell Printing Technique: A Novel Therapy for

Ischemic Disease (Adv. Funct. Mater. 33/2017). Advanced Functional Materials. 2017;27(33).

54. Spang MT, Christman KL. Extracellular matrix hydrogel therapies: In vivo applications and development. Acta biomaterialia. 2018;68:1-14.

55. Srirangam R, Hippalgaonkar K, Avula B, Khan IA, Majumdar S. Evaluation of the intravenous and topical routes for ocular delivery of hesperidin and hesperetin. Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics. 2012;28(6):618-27

56. Hou M, Man M, Man W, Zhu W, Hupe M, Park K, et al. Topical hesperidin improves epidermal permeability barrier function and epidermal differentiation in normal murine skin. Experimental dermatology. 2012;21(5):337-40.

57. Adelli GR, Hingorani T, Punyamurthula N, Balguri SP, Majumdar S. Evaluation of topical hesperetin matrix film for back-of-the-eye delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2015;92(0):74-82.

58. ANVISA. Nota Técnica N° 64 /2012 Brasil2012. p. 1-6.

59. Attaran RR. Latest Innovations in the Treatment of Venous Disease. Journal of clinical medicine. 2018;7(4).

60. Braithwaite SA, Braithwaite BD. Clinical utility of the Covidien Closure Fast Endovenous Radiofrequency Ablation Catheter. Medical devices (Auckland, NZ). 2014;7:179-85.

61. Goodyear SJ, Nyamekye IK. Radiofrequency ablation of varicose veins: Best practice techniques and evidence. Phlebology. 2015;30(2 Suppl):9-17.

62. Martinez-Zapata MJ, Vernooij RW, Uriona Tuma SM, Stein AT, Moreno RM, Vargas E, et al. Phlebtonics for venous insufficiency. The Cochrane database of systematic reviews. 2016;4:Cd003229.

63. Bush R, Comerota A, Meissner M, Raffetto JD, Hahn SR, Freeman K. Recommendations for the medical management of chronic venous disease: The role of Micronized Purified Flavanoid Fraction (MPFF). Phlebology. 2017;32(1_suppl):3-19.

64. Kakkos SK, Nicolaidis AN. Efficacy of micronized purified flavonoid fraction (Daflon(R)) on improving individual symptoms, signs and quality of life in patients with chronic venous disease: a systematic review and meta-analysis of randomized double-blind placebo-controlled trials. International angiology : a journal of the International Union of Angiology. 2018;37(2):143-54.

65. Londono-Londono J, Lima VR, Jaramillo C, Creczynski-Pasa T. Hesperidin and hesperetin membrane interaction: understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids. Archives of biochemistry and biophysics. 2010;499(1-2):6-16.

66. Pari L, Karthikeyan A, Karthika P, Rathinam A. Protective effects of hesperidin on oxidative stress, dyslipidaemia and histological changes in iron-induced hepatic and renal toxicity in rats. Toxicology reports. 2015;2:46-55.

67. Takumi H, Nakamura H, Simizu T, Harada R, Kometani T, Nadamoto T, et al. Bioavailability of orally administered water-dispersible hesperetin and its effect on peripheral vasodilatation in human subjects: implication of endothelial functions of plasma conjugated metabolites. Food & function. 2012;3(4):389-98.

68. Kobayashi S, Tanabe S, Sugiyama M, Konishi Y. Transepithelial transport of hesperetin and hesperidin in intestinal Caco-2 cell monolayers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2008;1778(1):33-41.

69. Murota K, Shimizu S, Miyamoto S, Izumi T, Obata A, Kikuchi M, et al. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *The Journal of nutrition*. 2002;132(7):1956-61.
70. Nielsen IL, Chee WS, Poulsen L, Offord-Cavin E, Rasmussen SE, Frederiksen H, et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *The Journal of nutrition*. 2006;136(2):404-8.
71. Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, et al. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *The Journal of nutrition*. 2000;130(7):1695-9.
72. Menezes PD, Frank LA, Lima BD, de Carvalho YM, Serafini MR, Quintans-Junior LJ, et al. Hesperetin-loaded lipid-core nanocapsules in polyamide: a new textile formulation for topical drug delivery. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:2069-79.
73. Agrawal YO, Sharma PK, Shrivastava B, Ojha S, Upadhyia HM, Arya DS, et al. Hesperidin produces cardioprotective activity via PPAR-gamma pathway in ischemic heart disease model in diabetic rats. *PloS one*. 2014;9(11):e111212.
74. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life sciences*. 2015;124:64-75.
75. Yamamoto M, Jokura H, Hashizume K, Ominami H, Shibuya Y, Suzuki A, et al. Hesperidin metabolite hesperetin-7-O-glucuronide, but not hesperetin-3'-O-glucuronide, exerts hypotensive, vasodilatory, and anti-inflammatory activities. *Food & function*. 2013;4(9):1346-51.
76. Yamamoto M, Jokura H, Suzuki A, Hase T, Shimotoyodome A. Effects of continuous ingestion of hesperidin and glucosyl hesperidin on vascular gene expression in spontaneously hypertensive rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2013;59(5):470-3.
77. Pang X, Yang X, Zhai G. Polymer-drug conjugates: recent progress on administration routes. *Expert opinion on drug delivery*. 2014;11(7):1075-86.
78. Varshosaz J, Jalali M, Sharifabad AH. Solid Dispersion of Hesperetin Co-crystals Synergistically Attenuates Hepatic Toxicity of Carbon Tetrachloride Oxidative Stress in Rats. *Current drug delivery*. 2018.
79. Testai L, Calderone V. Nutraceutical Value of Citrus Flavanones and Their Implications in Cardiovascular Disease. *Nutrients*. 2017;9(5).
80. Chudek J, Kocelak P, Ziaja D, Owczarek A, Ziaja K. Compliance in pharmacotherapy in patients with chronic venous disorders. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*. 2012;31(4):393-401.
81. Khosa A, Reddi S, Saha RN. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;103:598-613.
82. Yanez JA, Remsberg CM, Miranda ND, Vega-Villa KR, Andrews PK, Davies NM. Pharmacokinetics of selected chiral flavonoids: hesperetin, naringenin and eriodictyol in rats and their content in fruit juices. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2008;29(2):63-82.
83. Mota AH, Rijo P, Molpeceres J, Reis CP. Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2017;532(2):710-28.

84. Arda O, Goksugur N, Tuzun Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology*. 2014;32(1):3-13.
85. Huang YB, Lee KF, Huang CT, Tsai YH, Wu PC. The effect of component of cream for topical delivery of hesperetin. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2010;58(5):611-4.
86. Tsai YH, Lee KF, Huang YB, Huang CT, Wu PC. In vitro permeation and in vivo whitening effect of topical hesperetin microemulsion delivery system. *International journal of pharmaceutics*. 2010;388(1-2):257-62.
87. Al Shaal L, Muller RH, Keck CM. Preserving hesperetin nanosuspensions for dermal application. *Die Pharmazie*. 2010;65(2):86-92.
88. Lauterbach A, Muller-Goymann CC. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2015;97(Pt A):152-63.
89. Katikaneni S. Transdermal delivery of biopharmaceuticals: dream or reality? *Therapeutic delivery*. 2015;6(9):1109-16.
90. Gelfuso GM, Barros MA, Delgado-Charro MB, Guy RH, Lopez RF. Iontophoresis of minoxidil sulphate loaded microparticles, a strategy for follicular drug targeting? *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2015;134:408-12.
91. Kumar B, Gupta SK, Srinivasan BP, Nag TC, Srivastava S, Saxena R. Hesperetin ameliorates hyperglycemia induced retinal vasculopathy via anti-angiogenic effects in experimental diabetic rats. *Vascular pharmacology*. 2012;57(5-6):201-7.
92. Park K. Controlled drug delivery systems: past forward and future back. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014;190:3-8.
93. Jacobs B, Vemuri C. The Future of Nanoparticle-Directed Venous Therapy. *Seminars in interventional radiology*. 2017;34(1):73-80.
94. Chow SF, Wan KY, Cheng KK, Wong KW, Sun CC, Baum L, et al. Development of highly stabilized curcumin nanoparticles by flash nanoprecipitation and lyophilization. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2015;94:436-49.
95. Contri RV, Katzer T, Ourique AF, da Silva AL, Beck RC, Pohlmann AR, et al. Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2014;10(5):820-30.
96. Islan GA, Duran M, Cacicedo ML, Nakazato G, Kobayashi RKT, Martinez DST, et al. Nanopharmaceuticals as a solution to neglected diseases: Is it possible? *Acta tropica*. 2017;170:16-42.
97. Melo NFS, Campos EVR, Franz-Montan M, Paula E, Silva C, Maruyama CR, et al. Characterization of Articaine-Loaded Poly(epsilon-caprolactone) Nanocapsules and Solid Lipid Nanoparticles in Hydrogels for Topical Formulations. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2018;18(6):4428-38.
98. Mao KL, Fan ZL, Yuan JD, Chen PP, Yang JJ, Xu J, et al. Skin-penetrating polymeric nanoparticles incorporated in silk fibroin hydrogel for topical delivery of curcumin to improve its therapeutic effect on psoriasis mouse model. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2017;160:704-14.

99. Chaves PDS, Frank LA, Frank AG, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Mucoadhesive Properties of Eudragit(R)RS100, Eudragit(R)S100, and Poly(epsilon-caprolactone) Nanocapsules: Influence of the Vehicle and the Mucosal Surface. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(4):1637-46.
100. Dey S, Datta S, Dasgupta S, Mazumder B, Pathak YV. Chapter 13 - Lipid nanoparticles for topical application of drugs for skin diseases. In: Grumezescu AM, editor. *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*: William Andrew Publishing; 2016. p. 327-61.
101. Morales JO, Valdes K, Morales J, Oyarzun-Ampuero F. Lipid nanoparticles for the topical delivery of retinoids and derivatives. *Nanomedicine (London, England)*. 2015;10(2):253-69.
102. Frank LA, Contri RV, Beck RC, Pohlmann AR, Guterres SS. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2015;7(5):623-39.
103. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;385(1-2):113-42.
104. Pagels RF, Prud'homme RK. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics. *Journal of Controlled Release*. 2015;219:519-35.
105. Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, Anderson D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature materials*. 2013;12(11):967-77.
106. Li B, Luo X, Deng B, Wang J, McComb DW, Shi Y, et al. An Orthogonal Array Optimization of Lipid-like Nanoparticles for mRNA Delivery in Vivo. *Nano Letters*. 2015;15(12):8099-107.
107. Suhr OB, Coelho T, Buades J, Pouget J, Conceicao I, Berk J, et al. Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study. *Orphanet journal of rare diseases*. 2015;10:109.
108. Ramaswamy S, Tonnu N, Tachikawa K, Limphong P, Vega JB, Karmali PP, et al. Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(10):E1941-e50.
109. Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, Bulychev A, Brito LA, Hassett KJ, et al. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2017;25(6):1316-27.
110. Mishra PR, Al Shaal L, Muller RH, Keck CM. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2009;371(1-2):182-9.
111. Kanaze FI, Kokkalou E, Niopas I, Barmplexis P, Georgarakis E, Bikiaris D. Dissolution rate and stability study of flavanone aglycones, naringenin and hesperetin, by drug delivery systems based on polyvinylpyrrolidone (PVP) nanodispersions. *Drug development and industrial pharmacy*. 2010;36(3):292-301.
112. Fathi M, Varshosaz J. Novel hesperetin loaded nanocarriers for food fortification: Production and characterization. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(3):1382-91.
113. Fathi M, Varshosaz J, Mohebbi M, Shahidi F. Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification:

Preparation, Characterization, and Modeling. *Food and Bioprocess Technology*. 2013;6(6):1464-75.

114. Gurushankar K, Gohulkumar M, Prasad NR, Krishnakumar N. Synthesis, characterization and in vitro anti-cancer evaluation of hesperetin-loaded nanoparticles in human oral carcinoma (KB) cells. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2014;5(1):015006.

115. Duranoglu D, Uzunoglu D, Mansuroglu B, Arasoglu T, Derman S. Synthesis of hesperetin-loaded PLGA nanoparticles by two different experimental design methods and biological evaluation of optimized nanoparticles. *Nanotechnology*. 2018;29(39):395603.

116. Garnacho C, Albelda SM, Muzykantov VR, Muro S. Differential intra-endothelial delivery of polymer nanocarriers targeted to distinct PECAM-1 epitopes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2008;130(3):226-33.

117. Muro S, Garnacho C, Champion JA, Leferovich J, Gajewski C, Schuchman EH, et al. Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2008;16(8):1450-8.

118. Papademetriou I, Tsinas Z, Hsu J, Muro S. Combination-targeting to multiple endothelial cell adhesion molecules modulates binding, endocytosis, and in vivo biodistribution of drug nanocarriers and their therapeutic cargoes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014;188:87-98.

119. Muro S. Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;164(2):125-37.

120. Pan H, Myerson JW, Hu L, Marsh JN, Hou K, Scott MJ, et al. Programmable nanoparticle functionalization for in vivo targeting. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(1):255-64.

121. Saco M, Howe N, Nathoo R, Cherpelis B. Comparing the efficacies of alginate, foam, hydrocolloid, hydrofiber, and hydrogel dressings in the management of diabetic foot ulcers and venous leg ulcers: a systematic review and meta-analysis examining how to dress for success. *Dermatology online journal*. 2016;22(8).

122. Buchberger B, Follmann M, Freyer D, Huppertz H, Ehm A, Wasem J. The evidence for the use of growth factors and active skin substitutes for the treatment of non-infected diabetic foot ulcers (DFU): a health technology assessment (HTA). *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2011;119(8):472-9.

123. Branski LK, Gauglitz GG, Herndon DN, Jeschke MG. A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2009;35(2):171-80.

124. Greer N, Foman NA, MacDonald R, Dorrian J, Fitzgerald P, Rutks I, et al. Advanced wound care therapies for nonhealing diabetic, venous, and arterial ulcers: a systematic review. *Annals of internal medicine*. 2013;159(8):532-42.

125. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Advanced drug delivery reviews*. 2018.
126. Shao M, Hussain Z, Thu HE, Khan S, de Matas M, Silkstone V, et al. Emerging Trends in Therapeutic Algorithm of Chronic Wound Healers: Recent Advances in Drug Delivery Systems, Concepts-to-Clinical Application and Future Prospects. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 2017;34(5):387-452.
127. Kamata H, Li X, Chung UI, Sakai T. Design of Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced healthcare materials*. 2015;4(16):2360-74.
128. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert review of anti-infective therapy*. 2011;9(7):857-79.
129. Saranya N, Moorthi A, Saravanan S, Devi MP, Selvamurugan N. Chitosan and its derivatives for gene delivery. *International journal of biological macromolecules*. 2011;48(2):234-8.
130. Nunes PS, Rabelo AS, Souza JC, Santana BV, da Silva TM, Serafini MR, et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. *International journal of pharmaceutics*. 2016;513(1-2):473-82.
131. Censi R, Di Martino P, Vermonden T, Hennink WE. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;161(2):680-92.
132. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(1):83-99.
133. Sandoval M, Albornoz C, Munoz S, Fica M, Garcia-Huidobro I, Mertens R, et al. Addition of chitosan may improve the treatment efficacy of triple bandage and compression in the treatment of venous leg ulcers. *Journal of drugs in dermatology : JDD*. 2011;10(1):75-9.
134. Morgado PI, Miguel SP, Correia IJ, Aguiar-Ricardo A. Ibuprofen loaded PVA/chitosan membranes: A highly efficient strategy towards an improved skin wound healing. *Carbohydrate polymers*. 2017;159:136-45.
135. Morimoto N, Kakudo N, Matsui M, Ogura T, Hara T, Suzuki K, et al. Exploratory clinical trial of combination wound therapy with a gelatin sheet and platelet-rich plasma in patients with chronic skin ulcers: study protocol. *BMJ Open*. 2015;5(5):e007733.
136. Broussard KC, Powers JG. Wound dressings: selecting the most appropriate type. *American journal of clinical dermatology*. 2013;14(6):449-59.
137. de Carvalho MR, de Andrade IS, de Abreu AM, Leite Ribeiro AP, Peixoto BU, de Oliveira BG. All about compression: A literature review. *Journal of vascular nursing : official publication of the Society for Peripheral Vascular Nursing*. 2016;34(2):47-53.
138. O'Meara S, Cullum N, Nelson EA, Dumville JC. Compression for venous leg ulcers. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;11:Cd000265.
139. Narayana H, Hu J, Kumar B, Shang S, Ying M, Young RJ. Designing of advanced smart medical stocking using stress-memory polymeric filaments for pressure control and massaging. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2018;91:263-73.

140. Martin JR, Nelson CE, Gupta MK, Yu F, Sarett SM, Hocking KM, et al. Local Delivery of PHD2 siRNA from ROS-Degradable Scaffolds to Promote Diabetic Wound Healing. *Advanced healthcare materials*. 2016;5(21):2751-7.
141. Pop MA, Almquist BD. Biomaterials: A potential pathway to healing chronic wounds? *Experimental Dermatology*. 2017;26(9):760-3.
142. Gainza G, Villullas S, Pedraz JL, Hernandez RM, Igartua M. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2015;11(6):1551-73.
143. Pashuck ET, Stevens MM. Designing regenerative biomaterial therapies for the clinic. *Science translational medicine*. 2012;4(160):160sr4.
144. Rice JJ, Martino MM, De Laporte L, Tortelli F, Briquez PS, Hubbell JA. Engineering the regenerative microenvironment with biomaterials. *Advanced healthcare materials*. 2013;2(1):57-71.
145. Dickinson LE, Gerecht S. Engineered Biopolymeric Scaffolds for Chronic Wound Healing. *Frontiers in physiology*. 2016;7:341.
146. Turner NJ, Badylak SF. The Use of Biologic Scaffolds in the Treatment of Chronic Nonhealing Wounds. *Advances in wound care*. 2015;4(8):490-500.
147. Laverdet B, Micallef L, Lebreton C, Mollard J, Lataillade JJ, Coulomb B, et al. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. *Pathol Biol (Paris)*. 2014;62(2):108-17.
148. Wu Y, Huang S, Enhe J, Ma K, Yang S, Sun T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *International wound journal*. 2014;11(6):701-10.
149. Ruparel NB, de Almeida JFA, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a Stem Cell of Apical Papilla Cell Line: Effect of Passage on Cellular Phenotype. *Journal of Endodontics*. 2013;39(3):357-63.
150. Shohara R, Yamamoto A, Takikawa S, Iwase A, Hibi H, Kikkawa F, et al. Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms. *Cytotherapy*. 2012;14(10):1171-81.
151. Ribeiro J, Pereira T, Amorim I, Caseiro AR, Lopes MA, Lima J, et al. Cell therapy with human MSCs isolated from the umbilical cord Wharton jelly associated to a PVA membrane in the treatment of chronic skin wounds. *International journal of medical sciences*. 2014;11(10):979-87.
152. Zangi L, Lui KO, von Gise A, Ma Q, Ebina W, Ptaszek LM, et al. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nature biotechnology*. 2013;31(10):898-907.
153. Therapeutics M. Pipeline 2018

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE UM MICROAMBIENTE EM 3D PARA ESTUDAR A INFLUÊNCIA DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DA MATRIZ EXTRACELULAR NA RESPOSTA DE CÉLULAS TRONCO

Os experimentos apresentados neste capítulo foram realizados na Divisão de Biomateriais e Biomecânica da Oregon Health and Science University – Portland, Oregon – Estados Unidos, sob supervisão do Prof. Dr. Luiz Eduardo Bertassoni através de bolsa concedida pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES: 88881.134337/2016-01).

O artigo oriundo deste capítulo está em fase de correção pelos coautores e será em breve submetido ao Periódico Advanced Functional Materials (FI: 13.32).

Apresentação

O microambiente 3D, onde as células-tronco residem, desempenha um papel importante em sua diferenciação e resposta em geral. No entanto, os estudos de interações célula-matriz tem sido limitados pelo baixo rendimento no encapsulamento de células. Nosso estudo descreve um novo método de biopressão usando estereolitografia para desenvolver microambientes a base de hidrogel de alto rendimento carregados de células com aumento da rigidez para estudar o comportamento celular. Esta técnica aumenta proporcionalmente os tempos de fotopolimerização, mantendo uma alta viabilidade celular (> 85%) e permitindo um ajuste fino das propriedades físicas do microambientes, e micro geometrias com alto rendimento. Aqui mostramos a bioimpressão de microarranjos de hidrogel (5×10^6 células/mL) contendo mais de 700 pontos de hidrogel com aumento da rigidez em 6 minutos. As células foram cultivadas sob protocolos padronizados. Nossos resultados demonstram que esta nova ferramenta é altamente eficaz, de baixo custo, fácil e mais rápida que as metodologias tradicionais de microambientes via impressão por contato, com grande potencial para analisar com precisão os efeitos do microambiente 3D na função celular, bem como expressão de material genético como mRNA. Este estudo contribui para a compreensão do microambiente e resposta celular diante de variações da rigidez da matriz extracelular, que é a principal teoria do desencadeamento de doenças venosas.

2.1. INTRODUÇÃO

Hidrogéis são estruturas hidrofílicas tridimensionais (3D) com alto teor de água, capazes de encapsular células e formar microambientes biocompatíveis, biodegradáveis e biomiméticos promissores nas áreas de engenharia de tecidos e medicina regenerativa (1). A capacidade desses hidrogéis de mimetizar a matriz extracelular (MEC), responsável por fornecer suporte biomecânico ao microambiente celular, tem sido extensivamente explorada na identificação da patogênese de doenças como a insuficiência venosa e na perspectiva de desenvolver tratamentos mais eficazes. Principalmente porque o estímulo mecânico do microambiente celular direciona o destino das células como diferenciação, expressão gênica e resposta à fármacos (2). Além dos sinais bioquímicos, a diferenciação de células-tronco é regulada por aspectos biofísicos como rigidez e formato celular (3). Estas células, quando cultivadas em matrizes de colágeno ou hidrogéis de poliacrilamida, por exemplo, com rigidez semelhante à do cérebro (0,1-1 kPa) induzem neurogênese, enquanto substratos mais rígidos na faixa de 8-17 kPa e 25-40 kPa direcionam a miogênese ou osteogênese, respectivamente, conforme relatado anteriormente (4-5).

No entanto, a grande maioria dos estudos *in vitro* não conseguem replicar totalmente a situação *in vivo*, uma vez que são realizados em duas dimensões (2D) usando abordagens de baixo rendimento, onde as amostras precisam ser preparadas uma a uma. Estudos emergentes tem explorado tecnologias de microarranjos utilizando robôs, também conhecidos como “*microspotters*”, que funcionam como se fossem pipetadores robotizados. Outras alternativas são os métodos de microfabricação, largamente utilizados para construir microambientes, a fim de estudar as interações célula-substrato, bem como a descoberta de novos fármacos e pesquisas toxicológicas, de amplo uso na indústria farmacêutica (2).

Os primeiros, trabalham liberando gotas individualizadas do material e são limitados a 2D, onde não é capaz de controlar facilmente a geometria do biomaterial formado. Ademais, apenas alguns hidrogéis podem ser fabricados e a técnica não permite controlar adequadamente a rigidez do microambiente, limitando o estudo de sinais bioquímicos e mecânicos emitidos pelas células como resposta as propriedades mecânicas do microambiente (6). Por outro lado,

os métodos de microfabricação como micromoldagem e litografia são capazes de controlar a geometria do biomaterial formado, mas as propriedades mecânicas não podem ser controladas no mesmo molde, tornando o processo lento e caro (7).

Uma plataforma 3D de microambiente celular baseada em hidrogel foi desenvolvida por Dolatshahi-Pirouz et al (2013). O biomaterial foi construído para investigar a triagem combinatória da diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) em resposta a vários componentes da MEC, incluindo fatores de crescimento (8). Contudo, essa tecnologia ainda permanece limitada devido a restrição da técnica em imprimir poucas matrizes, o que caracteriza o método como de baixa produtividade. Todavia, esse trabalho contribuiu de forma significativa para a compreensão da necessidade de se desenvolver uma plataforma de alto rendimento, que permita estudar não apenas os fatores biomecânicos e topográficos da MEC, mas também outros componentes do microambiente celular.

Nesse contexto, inserem-se os ácidos nucleicos que têm despertado grande interesse do desenvolvimento biofarmacêutico, devido ao seu potencial na terapia gênica e medicina regenerativa. Os ácidos nucleicos são candidatos promissores no manejo de doenças relacionadas, sobretudo, a desregulação na síntese de proteínas, como é o caso da doença venosa. Opções terapêuticas à base de ácidos nucleicos foram introduzidos pela primeira vez, devido ao potencial do plasmídeo de DNA em expressar proteínas nas células alvo (9,10). No entanto, estudos posteriores mostraram as limitações desta terapia, relacionadas a baixa captação celular e escape endossomal, bem como translocação ineficiente para o núcleo (9). Para contornar essas barreiras, o RNA mensageiro sintético (mRNA) tem sido utilizado como material genético promissor para a expressão protéica sem os problemas apresentados pelo mRNA de ocorrência natural, como meia-vida curta e imunogenicidade desfavorável, mantendo sua eficiência de translação (9, 11).

Com o avanço do conhecimento nesse campo, as nanopartículas lipídicas (LNPs) têm sido descritas como uma estratégia promissora para a liberação não viral de ácidos nucleicos (12). Em geral, as novas formulações de LNP são compostas por lipídios catiônicos/ionizáveis para encapsular eficientemente o mRNA carregado negativamente, a fim de melhorar a captação celular e o

escape endossomal do mRNA para o citoplasma. Portanto, vários estudos foram realizados com o objetivo de descrever os mecanismos envolvidos no escape endossômico de mRNA entregue por nanopartículas, em vacinas, para indução controlada de uma resposta imune de células T, CD86 e também a liberação de mRNA para linfócitos B7 (11-14).

No entanto, poucos trabalhos tem demonstrado o potencial do mRNA na engenharia de tecidos, que são candidatos promissores no controle da expressão de moléculas-chave da sinalização celular ou fatores de transcrição. Neste campo, o mRNA também pode ser usado para direcionar o destino das células-tronco, mimetizando as condições fisiológicas. É provável que o mRNA possa ser liberado de forma controlada a partir de LNPs e conduzir a regeneração tecidual através da síntese de proteínas deficientes no processo patológico (15). Nessa perspectiva, a proposta desse trabalho consiste em bioimprimir hidrogéis contendo células tronco e LNPs carregadas com mRNA, como uma estratégia inovadora de alto rendimento, para estudar como as propriedades físicas e mecânicas da matriz extracelular controlam a capacidade das células-tronco de captar o mRNA carregado em LNPs e expressar proteínas da matriz.

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. Obtenção das LNPs-mRNA

Nanopartículas à base de lipídios (eGFP-LNPs) foram preparadas combinando uma fase aquosa (mRNA diluído em tampão citrato 50 mM, pH 4 e suplementado com 5 μ M MK-571) e uma fase orgânica (lipídio ionizável: lipídio estrutural: colesterol: PEG-lipídio dissolvido em etanol em proporções molares de 50: 10: 38,5: 1,5, respectivamente). As fases foram homogeneizadas sob razão de 3:1 em um homogeneizador microfluídico (*Precision Nanosystems*). As fases aquosa e orgânica foram injetadas no dispositivo microfluídico a um volume de 12 mL/min. As formulações foram filtradas, lavadas com tampão fosfato (pH 7,2), concentradas à 373 ng/ μ L (usando filtros de centrifugação Amicon Ultra (*EMD Millipore*) e armazenadas a 4 °C até o uso. A concentração de nanopartículas utilizada nos experimentos foi de 16,95 μ g/ μ L. As etapas de

desenvolvimento e caracterização desta formulação estão descritas na publicação de Patel et al (2017) (11).

2.2.2. Obtenção da gelatina metacrilada (GelMA)

A reação de metacrilção foi dividida em duas etapas. No dia 0, foram pesados 10g de gelatina (obtida da pele suína – *Sigma-Aldrich*) e solubilizada em um erlenmeyer contendo 100 mL de tampão fosfato (pH 7,2) estéril a 50°C (240 rpm) durante 1h, período no qual o erlenmeyer foi coberto com papel alumínio, para manter a temperatura dentro da vidraria. Quando toda a gelatina foi dissolvida, 8 mL de anidrido metacrílico, foram adicionados à solução, gota a gota, e a emulsão foi mantida em rotação a 50°C por 2h. Paralelamente, 100 mL de tampão fosfato (pH 7,2) estéril foi pré-aquecido (50°C) e após 2h da reação de metacrilção, o tampão fosfato (pH 7,2) foi adicionado à emulsão, a fim de diluir a GelMA, e a solução mantida nas mesmas condições de agitação durante 10 min.

Em seguida, membranas de diálise (*Spectro/Por molecular porous membrane tubing, MWCO 12-14,000, Fisher Scientific*) foram cortadas em tamanhos apropriados (30 cm) e hidratadas em água. Um lado da membrana foi amarrado, e então a solução de GelMA foi transferida com auxílio de um funil para a membrana, em seguida, um segundo nó foi feito para fechamento do sistema. O procedimento foi repetido até transferir os 200 mL da solução. Os sacos de diálise foram transferidos para um béquer contendo 5L de água ultrapura, onde a diálise aconteceu a 40°C (500 rpm) durante 5 dias. O béquer foi coberto com papel alumínio para manter a temperatura do sistema e a água trocada (40°C) duas vezes ao dia. No processo de troca de água, os sacos de diálise foram manualmente homogeneizados em direções opostas 6 vezes (cada orientação) e recolocados na água na orientação inversa. Esta etapa foi realizada para remover o anidrido metacrílico tóxico que não reagiu com a gelatina.

No dia 5, foram adicionados 200 mL de água ultrapura (40°C) em um erlenmeyer e adicionada a GelMA contida nos sacos de diálise, a solução foi mantida sob agitação durante 15 minutos e em seguida filtrada a vácuo (*sterile vacuum express plus 0.22 µm – Millipore filtration cup*). O polímero estéril (25 a 30 mL) foi transferido para tubos falcon e armazenados a -80°C na posição

horizontal durante 2 dias. Em seguida a GelMA foi liofilizada durante 5 dias, sob pressão de 130×10^{-3} mbar e -50°C . A amostra obtida foi então armazenada a temperatura ambiente.

2.2.3. Preparação do hidrogel

Gelatina metacrilada liofilizada (GelMA – 7%) foi dissolvida em uma solução do fotoiniciador, lítio fenil (2, 4, 6-trimetil benzoil) fosfinato (LAP – 0,15%), com etapas intermediárias de agitação em vórtex e exposição a temperatura em estufa até completa dissolução da GelMA. Esta concentração de hidrogel/fotoiniciador foi previamente otimizada, utilizando diferentes concentrações dos mesmos, a fim de obter condições ótimas de impressão, tais como menor tempo de impressão, associadas à faixa de interesse das propriedades mecânicas.

2.2.4. Cultura de células

Células tronco obtidas da papila apical dentária (SCAPs) foram cultivadas em meio essencial mínimo alfa (α -MEM) suplementado com soro bovino fetal (FBS) 10%, L-glutamina 1X e penicilina/estreptomicina 1% (16). Todas as células foram mantidas em incubadora estéril a 37°C , 5% de CO_2 e 95% de umidade. O meio de cultura foi substituído a cada dois dias. SCAPs foram tripsinizadas com 80% de confluência, encapsuladas em hidrogéis de GelMA, contendo ou não eGFP-LNPs-mRNA ($16,95 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), a uma densidade de 5×10^6 células/mL que foram imediatamente impressos de acordo com protocolo descrito a seguir. Os experimentos com LNPs-mRNA foram realizados exclusivamente para investigação da expressão da proteína verde fluorescente (eGFP), não sendo portanto, as nanopartículas incorporadas nos experimentos iniciais de viabilidade e espreado celular.

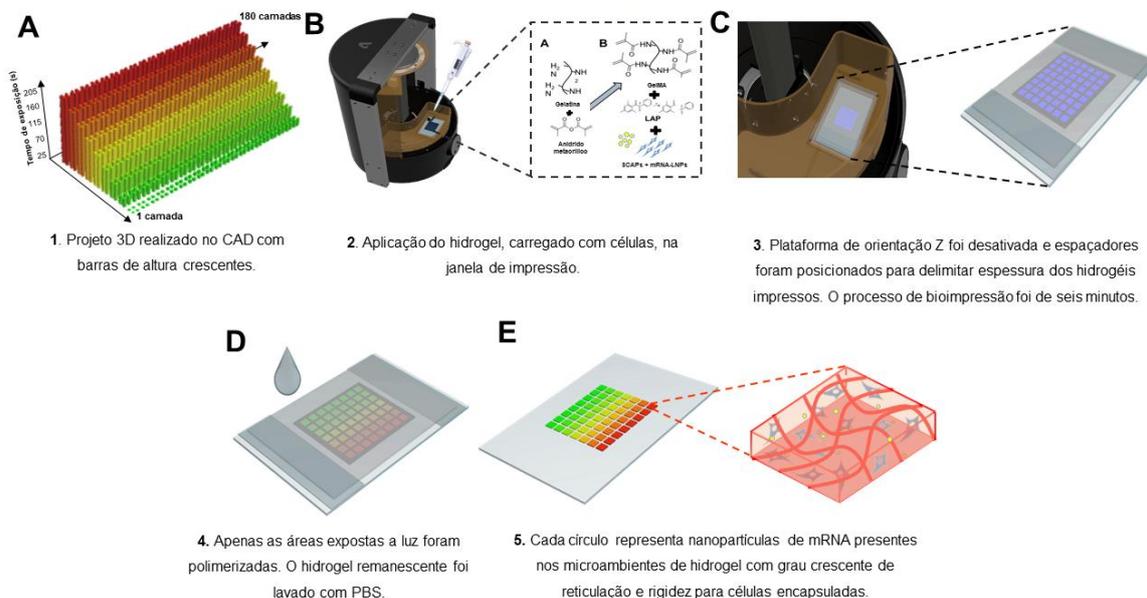
2.2.5. Bioimpressão

Para construir uma matriz extracelular biomimética de alto rendimento com rigidez crescente, adaptamos o método de impressão 3D por estereolitografia (SLA). Em condições normais, uma impressora de estereolitografia trabalha imprimindo camadas sucessivas do material nas direções XYZ. A impressora (*Autodesk Ember*) é equipada com uma fonte de luz

digital de comprimento de onda (405 nm) e intensidade especificados. Basicamente, uma matriz de micro-espelhos, localizada abaixo da mesa de impressão, controla a exposição de luz de forma individualizada para cada pixel. Esses *pixels* formam *voxels* de material polimerizado que configuram a estrutura impressa (17). Esse método, foi portanto adaptado para a execução desse trabalho, através da remoção do aparato da direção Z e do controle do tempo de exposição em cada local do hidrogel.

Primeiramente, foi realizado o projeto 3D, em desenho assistido por computador (CAD), utilizando o *software* de domínio público, *Autodesk Fusion 360*. Diferentes formas geométricas verticais de altura crescente foram projetadas para mimetizar as camadas aditivas da impressão por SLA. Em seguida, o arquivo .stl foi carregado na impressora e, posteriormente, o hidrogel contendo células (7% GelMA/0,15% LAP - 5×10^6 SCAPs/mL) foi aplicado na janela de polidimetilsiloxano (PDMS) da impressora. Com a remoção do aparato da direção Z da impressora, foram utilizados espaçadores para controlar a espessura (100 μm) dos microambientes bioimpressos. O sistema SLA foi usado para imprimir o hidrogel através da exposição incremental à luz azul (405 nm - 25s para imprimir a primeira camada em seguida, pelo incremento de 1s, as demais camadas foram impressas até atingir 205s, correspondendo a 180 camadas, em quadruplicata, totalizando 720 microambientes; Potência da impressora: 17,63 mW/cm²) para construir microambientes miniaturizados de alto rendimento carregados com células tronco (Figura 1). A duração da impressão foi de seis minutos. As áreas que não foram expostas à luz foram lavadas com tampão fosfato (pH 7,2) e as áreas expostas à luz, solidificaram e foram submetidas aos procedimentos de cultivo celular descritas a seguir.

Figura 1: Método de biofabricação dos microambientes de alto rendimento.



Fonte: Menezes, P.P. (2019)

2.2.6. Porosidade do hidrogel

Neste experimento, a lâmina contendo os microambientes bioimpressos foi imersa em uma solução de rodamina-b (100 µg/mL) e em seguida lavada sucessivas vezes com tampão fosfato (pH 7,2), para remoção do excesso de corante.

2.2.7. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos diferentes microambientes acellularizados foram analisadas em um foto-reômetro (DHR-1 reômetro/TA Instruments) com guia de luz acoplado no equipamento com a mesma potência da impressora (17,63 mW/cm²). A luz foi ligada após 25 s para reproduzir o protocolo de impressão. Em seguida, o intervalo de aferição entre cada ponto foi definido em 1s. As análises foram realizadas em sextuplicata e à temperatura ambiente. O módulo de elasticidade foi calculado a partir do módulo de armazenamento usando a equação 1

$$K = 2G \frac{(1+\nu)}{3(1-2\nu)}$$

Equação 1

onde, K, G e ν são módulo de elasticidade, módulo de armazenamento e coeficiente de *Poisson* (assumido como sendo 0,44), respectivamente (18).

2.2.8. Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado cinco dias após a impressão, para investigar o efeito da exposição à luz na viabilidade de SCAPs nos microambientes de hidrogéis. Para tal, foi utilizado um kit de ensaio *Live/Dead*, baseado no princípio de permeabilidade à membrana (*Molecular Probes*). As imagens foram realizadas em um microscópio de fluorescência (*EVOS FL Auto, Life Technologies*). As células vivas e mortas foram contadas usando o *software* de domínio público, *ImageJ*. A quantificação das imagens foi realizada baseada na média das quadruplicatas para cada propriedade mecânica do hidrogel. A porcentagem de células viáveis foi então calculada de acordo com a equação 2

$$Viabilidade (\%) = \frac{L}{L+D} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde, L: células vivas e D: células mortas (18, 19).

2.2.9. Espreadimento celular

Os microambientes contendo células foram cultivados durante três dias em meio α -MEM, conforme descrito no item 2.2.4, suplementado com ácido L-ascórbico 50 $\mu\text{g/mL}$, β -glicerofosfato 10 mM e dexametasona 10^{-8} M. As células foram então fixadas com formaldeído 4% em tampão fosfato (pH 7,2), permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% em tampão fosfato (pH 7,2) a temperatura ambiente durante 10 min e enxaguadas três vezes com tampão fosfato (pH 7,2). As células fixadas foram incubadas com o reagente *actin green 488* (*Molecular Probes*) durante 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram coradas com o reagente *nucblue* (*Molecular Probes*) por 10 min e lavadas três vezes com tampão fosfato (pH 7,2). Em seguida, a amostra foi montada em lâminas de microscópio com uma solução de montagem e fotografada sob um microscópio confocal baseado em laser de alto conteúdo (*IN Cell Analyzer 6000 - GE Healthcare Life Sciences*). As imagens foram

processadas digitalmente e as áreas de espalhamento celular foram quantificadas em áreas selecionadas aleatoriamente com base no número de núcleos usando o *software ImageJ*.

2.2.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o *software GraphPad Prism* versão 5.0. Os valores representam média \pm desvio-padrão. As diferenças entre os diferentes tempos de exposição foram analisadas através do teste ANOVA de uma via, seguido por teste de *Tukey*.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

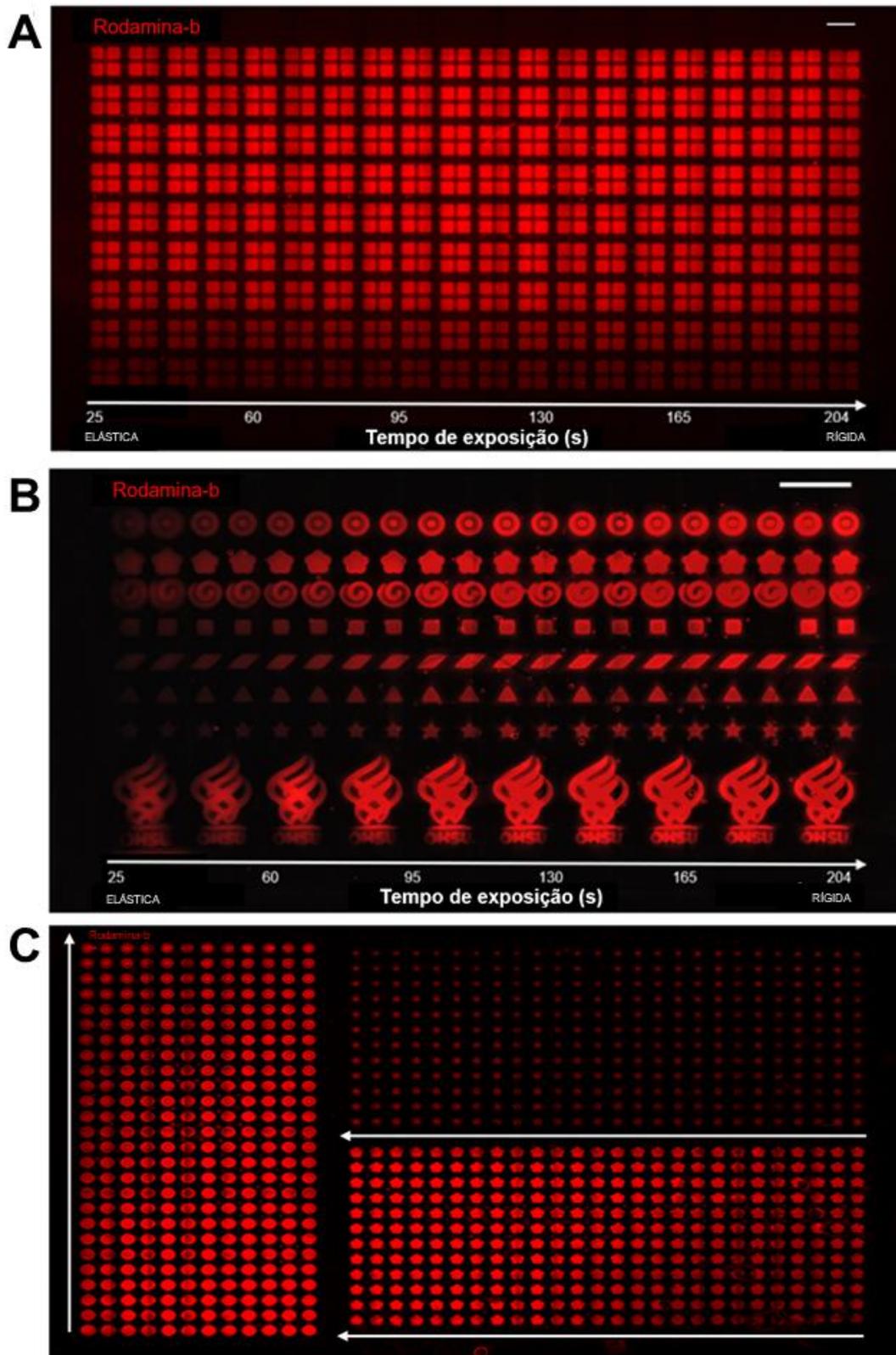
O projeto dos diferentes microambientes foi realizado em CAD, e representado como barras de alturas crescentes (Figura 1A - 1). A fonte de luz azul da impressora, polimerizou as barras com base no tempo de exposição programado para cada uma (Figura 1A - 3), permitindo o controle de rigidez (Figura 1A - 4). Portanto, esta tecnologia é capaz de imprimir 720 hidrogéis em 3D carregados com células (Figura 1A - 5) em apenas seis minutos. Em conjunto, esta plataforma tem ampla aplicabilidade na investigação de diversos tipos de hidrogéis e células, com microambiente 3D circundante de diferentes propriedades mecânicas e geometrias.

A exequibilidade da tecnologia, é demonstrada na Figura 2, onde é possível observar um aumento gradativo da fluorescência do corante rodamina-b. Dessa forma, foi observado que os hidrogéis expostos à luz por um período reduzido de tempo, apresentaram uma coloração ínfima do pigmento, sugerindo a presença de poros largos. Por outro lado, nas matrizes expostas a luz por um tempo prolongado, foi detectada uma coloração vermelho intensa, de onde foi possível inferir a presença de poros menores, os quais retém o pigmento, mesmo após várias lavagens. Monteiro et al (2018) recentemente demonstraram que hidrogéis preparados a base de GelMA e polimerizados com fonte de luz de 405 nm também utilizando LAP, possuem a característica de alterar o tamanho do poro, de acordo com o grau de polimerização. Matrizes pouco expostas a fonte polimerizadora, como luz, apresentam poros maiores em relação aquelas

densamente polimerizadas (18). Este dado indica que a tecnologia desenvolvida possui porosidade em função da rigidez da amostra.

Além de imprimir quadrados, a ferramenta também é robusta para a fabricação de diferentes estruturas geométricas de maior complexidade durante o mesmo processo. Kilian et al (2010) estudando a geometria do microambiente de células-tronco, observaram que diferentes formas geométricas da matriz, podem desempenhar um papel significativo na resposta celular (20). Para melhor caracterizar o efeito da capacidade de impressão das geometrias e seu papel na resposta das células ao microambiente, utilizamos a nossa ferramenta para imprimir diferentes geometrias em um modelo de alto rendimento e incorporando o efeito de controle da elasticidade. Portanto, foi observado que a ferramenta de impressão de microambientes desenvolvida nesse trabalho, é eficiente para imprimir diferentes geometrias com excelente resolução e reprodutibilidade (Figura 2B e 2C). Além disso, a plataforma permite a bioimpressão de até 2160 formas distintas (Figura 2C) em um único experimento, com o número de replicatas que for necessário, também através do controle da elasticidade da matriz. Este dado é de grande aplicação nos estudos de triagem de eficácia e toxicidade de medicamentos na indústria farmacêutica, devido a reprodutibilidade e agilidade (seis minutos de bioimpressão) do método. Em conjunto, estes resultados demonstram que o método de SLA adaptado, é eficiente para imprimir hidrogéis carregados com células em uma ampla faixa de rigidez da MEC, evidenciando a precisão da técnica.

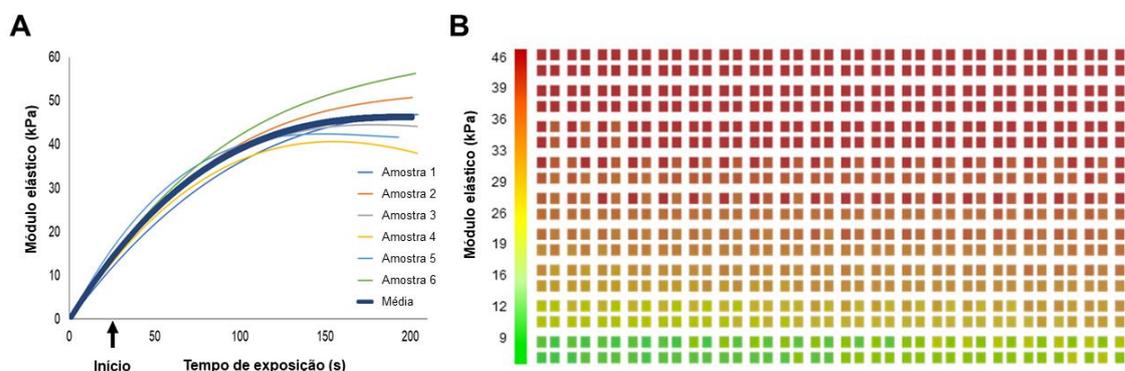
Figura 2: Printabilidade de alto rendimento de hidrogéis. (A) Absorção de rodamina-b em função da porosidade do biomaterial (n=720). (B) Geometrias demonstrando a capacidade versátil do processo de impressão, bem como a absorção de rodamina-b em função do aumento da rigidez (n=160). (C) Impressão de alto rendimento de diferentes estruturas geométricas com controle da elasticidade da matriz.



O módulo de elasticidade de cada microambiente está apresentado na Figura 3. As medidas ($n=6$) foram realizadas em tempo real durante a fotopolimerização em um fotoreômetro (Figura 3A), para caracterizar o efeito das

propriedades mecânicas no sucesso da bioimpressão. Os dados resultantes foram então utilizados para gerar um mapa de calor espacial da elasticidade da matriz (Figura 1B), onde foi demonstrado que o módulo de elasticidade dos hidrogéis aumentou proporcionalmente (9 a 46 kPa) ao aumento nos tempos de exposição à luz (25 a 205 s). Relatos anteriores utilizando experimentos de baixo rendimento, mostraram que as propriedades mecânicas do GelMA possuem uma tendência similar aos resultados aqui apresentados (21-22).

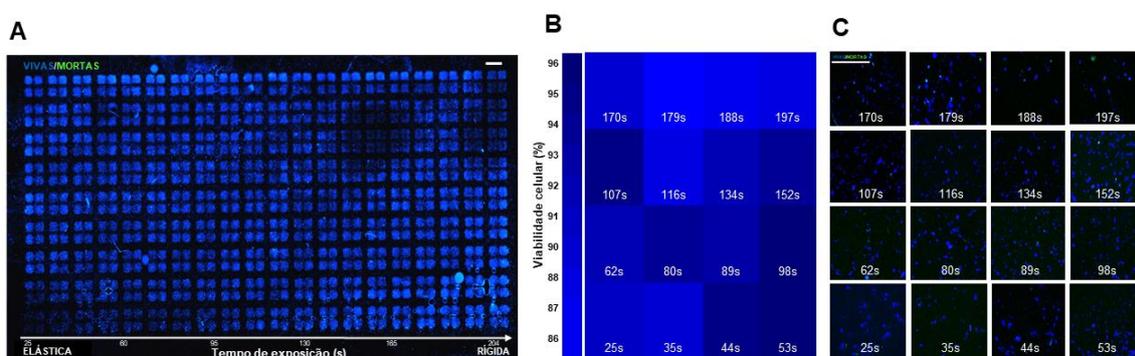
Figura 3: Módulo elástico dos hidrogéis de acordo com o respectivo tempo de exposição. (A) Curvas individuais resultantes da análise reológica de cada amostra. (B) Mapa de calor expressando os resultados das curvas individuais.



Demonstrado o desenvolvimento e reprodutibilidade da tecnologia, realizamos ensaios *in vitro* para investigar a resposta celular nestes microambientes. Para tal, foi analisada a viabilidade celular após cinco dias em cultura, a fim de observar se as células foram capazes de tolerar 204 s de exposição à luz e fora do seu ambiente estéril. Os resultados estão apresentados na Figura 4 A-C, onde pode-se observar alta viabilidade celular (i.e. $86 \pm 8,7\%$ a $96 \pm 2,8\%$). A viabilidade mais baixa ($86 \pm 8,7\%$) foi atribuída principalmente à matriz de hidrogel altamente reticulada, onde o acesso das células aos nutrientes é levemente reduzido (22). Esses resultados são consistentes com aqueles relatados por Dolatshahi-Pirouz et al (2014), que alcançaram viabilidade celular de 78 e 91% em 5 e 7 dias respectivamente, em microambientes de baixo rendimento (8). De forma geral, esses dados sugerem a potencialidade da

ferramenta desenvolvida para estudar com segurança a resposta de células-tronco ao microambiente, sem afetar a saúde das células encapsuladas.

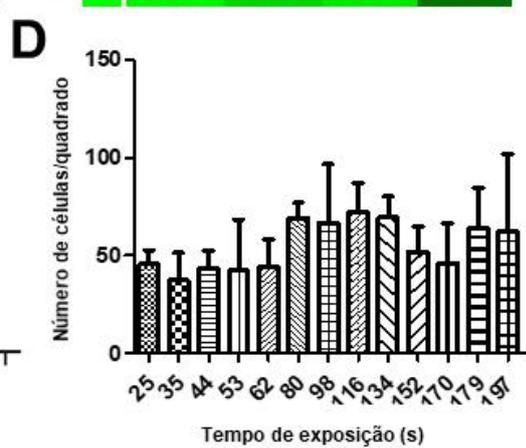
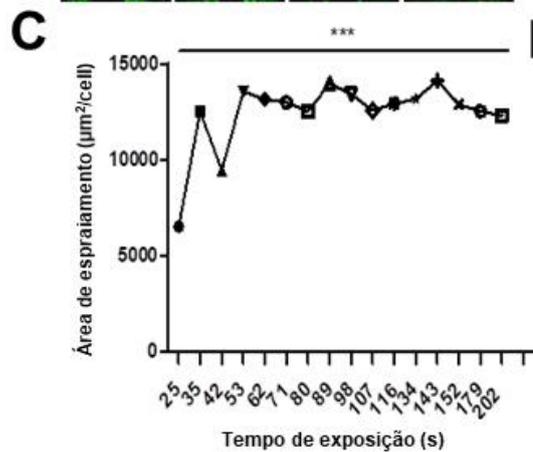
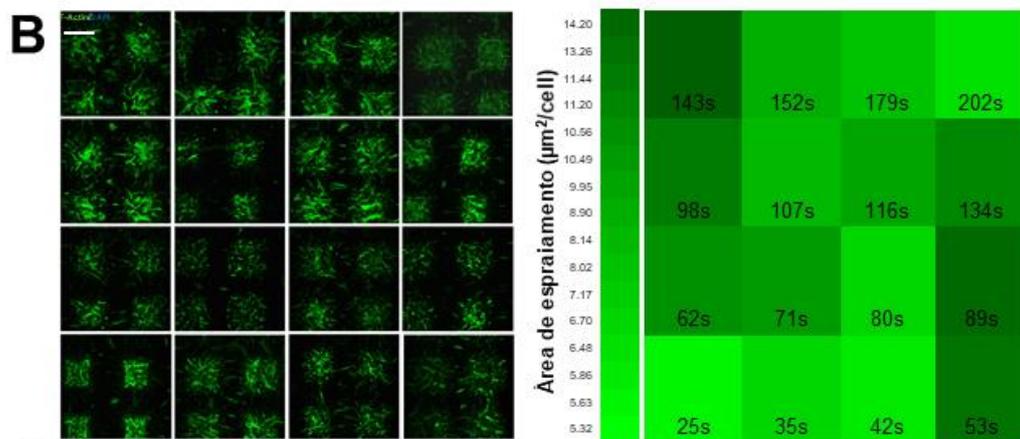
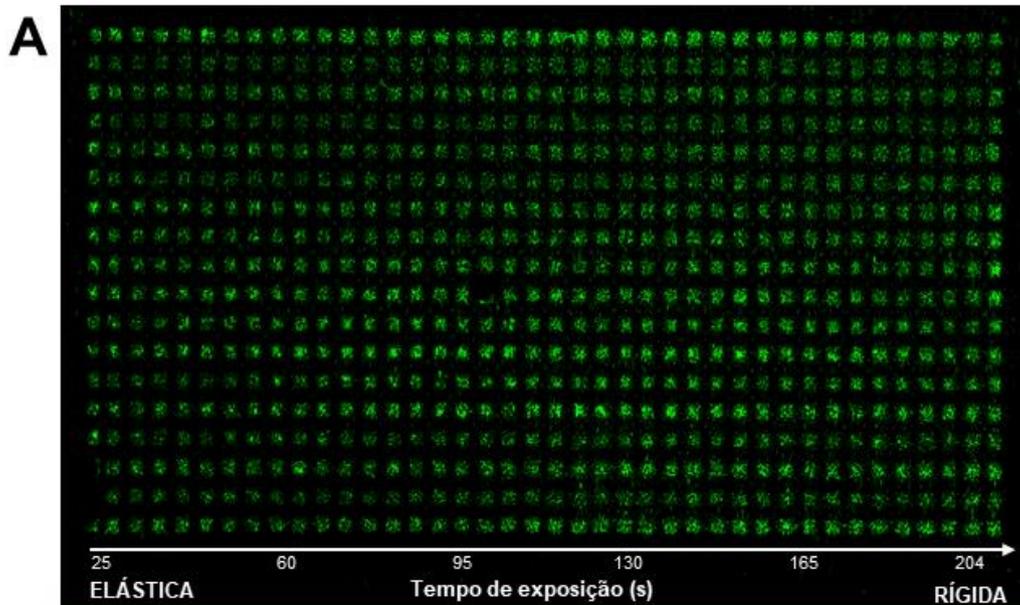
Figura 4: Resposta celular frente a exposição à luz durante o processo de biofabricação. (A) Viabilidade celular nos microambientes de hidrogel, em diferentes tempos de exposição. (B) Viabilidade quantitativa em dezesseis microambientes diferentes ao longo da amostra. Os resultados são expressos como média das quadruplicatas. (C) Imagens representativas do ensaio de viabilidade celular cinco dias após bioimpressão, demonstrando alta viabilidade de SCAPs.



Diante disto, para entender o comportamento do espraiamento de células-tronco no microambiente desenvolvido, cultivamos os hidrogéis durante três dias. Com base nos resultados expressos na Figura 5, foi possível observar claramente o espraiamento como uma função da rigidez da matriz (Figura 5A), nas condições estudadas, com pico de propagação em 44 kPa (143s) (Figura 5B). Curiosamente, não foi observada associação estatisticamente significativa entre a rigidez e a proliferação celular (Figura 5D), o que sugere que a área de espraiamento é um puro efeito da rigidez da matriz. Estudos prévios demonstraram que os hidrogéis de GelMA são excelentes *scaffolds* biomiméticos para apoiar a proliferação, espraiamento celular e formação de tecidos (23) em diferentes linhagens celulares, a exemplo de cardiomiócitos (24) e queratinócitos (25).

Figura 5: Espraiamento celular em função das propriedades mecânicas da matriz extracelular (A). (B) Dados ilustrativos e quantitativos do espraiamento celular em dezesseis microambientes com diferentes rigidez. (C) Quantificação

da área de espraiamento celular em diferentes matrizes (n = 4), p <0,05. (D) Proliferação celular em função do incremento da reticulação das matrizes. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão (n = 4).

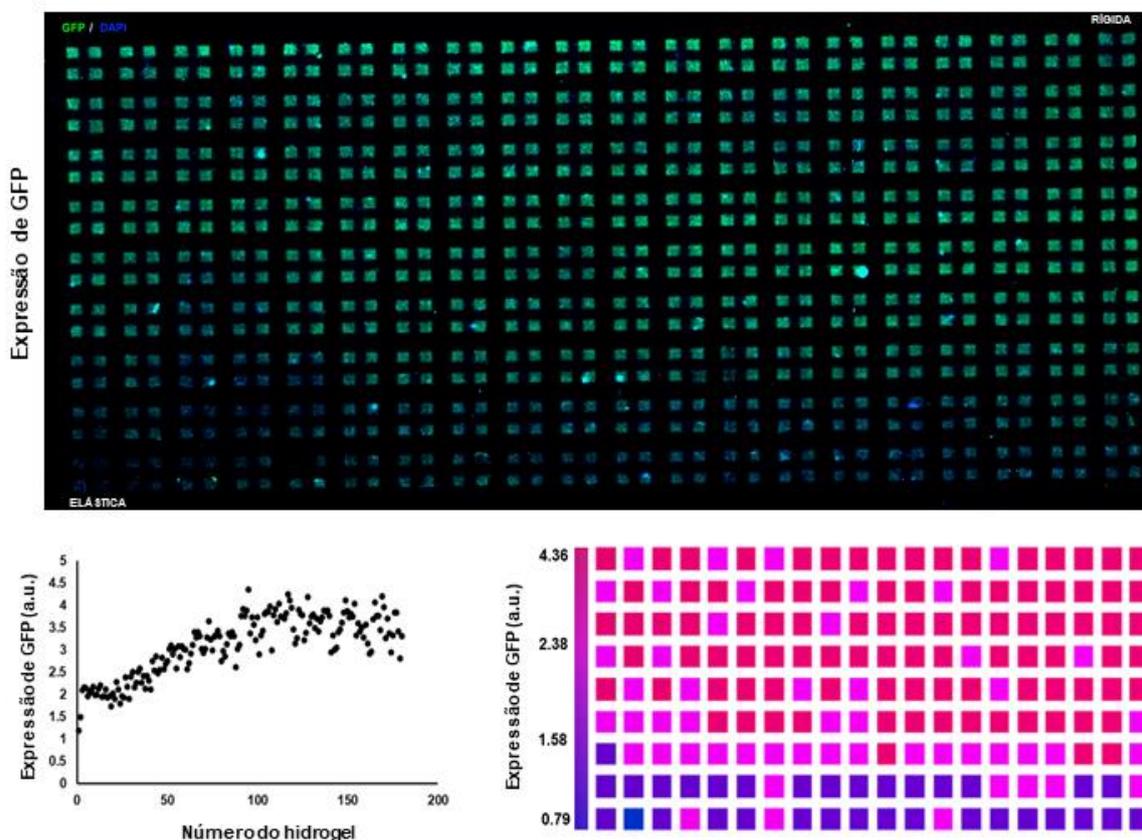


Em vista dos avanços nas áreas de nanotecnologia, engenharia de tecidos e medicina regenerativa, a indústria farmacêutica, tem buscado reduzir os estudos envolvendo animais, devido as questões éticas e financeiras. Neste cenário, os grandes centros de pesquisa tem se dedicado na biofabricação de tecidos cada vez mais complexos através do uso de células-tronco humanas. Tais sistemas podem ser úteis para prever o mecanismo, toxicidade e eficácia de medicamentos (26, 27, 28). Todavia, requerem a compreensão e reprodução do complexo nicho das células. Atualmente, um dos grandes desafios na biofabricação de microambientes celulares complexos, consiste em integrar todos ou boa parte dos componentes da MEC, tais quais fatores solúveis (proteínas da MEC e fatores de crescimento) e biofísicos (rigidez e topografia) (29).

A utilização do mRNA transcrito *in vitro* tem sido largamente investigada na terapia gênica, em função das suas diversas vantagens como nenhum risco de mutagênese de inserção e nenhuma integração genômica devido a sua expressão transitória. Além de não haver necessidade de entrar no núcleo da célula, uma vez que a transfecção ocorre no citoplasma, conferindo agilidade na cinética de expressão que melhora a estabilidade e atividade translacional. Assim, nanopartículas lipídicas tem se destacado como as melhores formulações para entrega sítio-específica do mRNA, de modo a conferir o melhor fornecimento intracelular e escape endossomal (30). Nessa perspectiva, a tecnologia proposta no presente estudo, demonstrou potencial para integrar fatores biofísicos com a resposta celular. Diante disto, para propor uma plataforma ainda mais complexa, incorporamos ao hidrogel testado, nanopartículas lipídicas contendo mRNA (mRNA-LNPs) para estudar a expressão de proteínas liberadas controladamente em microambientes de propriedades mecânicas variadas (Figura 6). Estas nanopartículas foram previamente caracterizadas e estes dados estão publicados no estudo de Patel et al (2017) (11).

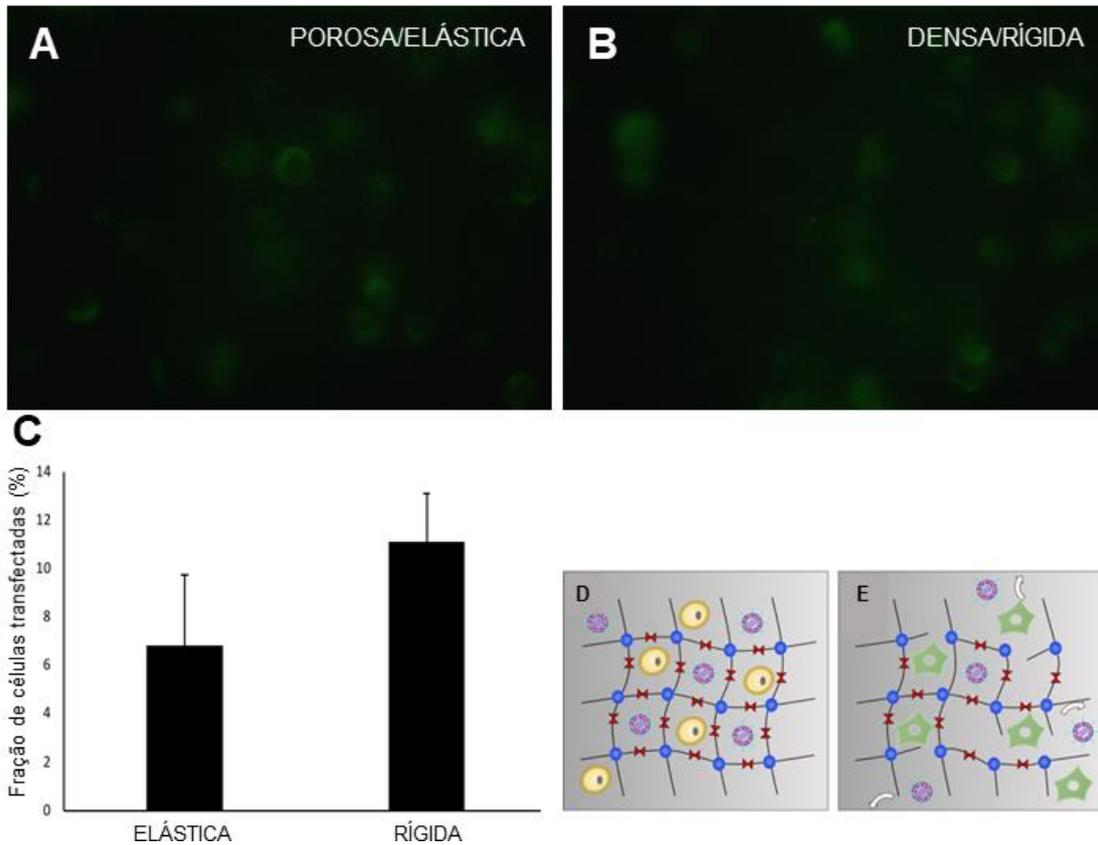
Dessa forma, os resultados apresentados na Figura 6, sugerem que hidrogéis altamente reticulados favorecem uma melhor transfecção de células encapsuladas com mRNA, após 48 horas. Para a compreensão deste fenômeno, imprimimos hidrogéis elásticos (12 kPa) e rígidos (48 kPa) e acompanhamos a expressão de GFP (Figura 7) ao longo do tempo.

Figura 6: Expressão da proteína verde fluorescente (GFP) em microambientes de alto rendimento. (A) Expressão de GFP ao longo dos 720 hidrogéis. (B e C) Dados quantitativos da expressão de GFP após 48 horas.



Diante da análise dos resultados apresentados na Figura 7A, foi possível inferir que mais células foram transfectadas em hidrogéis rígidos, todavia os níveis de expressão foram semelhantes em ambas as matrizes. Assim, estudos futuros utilizando esta plataforma, podem considerar o aumento da concentração de mRNA, para expressão mais rápida da proteína de interesse, tendo em vista a liberação controlada a partir das nanopartículas. Um provável mecanismo para este fenômeno está apresentado na Figura 7 (D e E). As LNPs possuem acesso restrito às células, pois difundem-se através dos poros do hidrogel até encontrá-las. Quando as redes poliméricas da matriz sofrem degradação enzimática pelas MMPs, a difusão do mRNA acontece de forma mais ágil através da matriz, de modo a atingir mais células, e então iniciar o processo de translação.

Figura 7: Mecanismo de captação do mRNA em matrizes com diferentes graus de elasticidade. A transfecção de mRNA foi menor em matrizes elásticas (A), quando comparadas a matrizes mais rígidas (B). (C) Quantificação da transfecção de mRNA em células dispostas em matrizes de propriedades mecânicas distintas. (D e E) Representação esquemática do provável mecanismo envolvido na captação e transfecção de mRNA pelas células.



Na doença venosa, as MMPs degradam a matriz extracelular, conduzindo a um desequilíbrio na razão entre colágeno tipo I e tipo III, tornando a matriz mais rígida e desencadeando os sinais e sintomas característicos da doença (31). A plataforma desenvolvida neste trabalho, pode ser útil para estudar a evolução da patogênese da IVC, onde hidrogéis carregados com mRNA-LNPs podem ajudar na síntese destas proteínas conduzindo ao reequilíbrio e possível regeneração da função das válvulas venosas. A combinação ideal de biomateriais e a resposta celular guiada pela complexidade do microambiente proposto associado a sistemas de liberação de mRNA não havia sido investigada até o momento. O desenvolvimento de biomateriais com o nível de complexidade

relatado nesse trabalho, é certamente uma área que merece ser explorada para futuras aplicações farmacêuticas e regenerativas, como na terapia da doença venosa.

2.4. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados comprovaram que as células tronco respondem de forma diferenciada a diferentes estímulos mecânicos em um modelo tridimensional de matriz extracelular. Diante disto, esses resultados geram embasamento científico que permitem utilizar esta tecnologia como proposta para outros tipos de géis com ampla faixa de rigidez, e potencialmente testar gradientes químicos e fatores de crescimento em uma plataforma de alto rendimento. Assim, a tecnologia inédita proposta nesse trabalho, pode contribuir como uma referência para biofabricar microambientes cada vez mais complexos, de modo a mimetizar o microambiente celular e estudar o desenvolvimento de doenças como a insuficiência venosa, bem como desenvolver estratégias terapêuticas sítio-específicas.

REFERÊNCIAS

1. Bryant SJ, Vernerey FJ. Programmable Hydrogels for Cell Encapsulation and Neo-Tissue Growth to Enable Personalized Tissue Engineering. *Advanced healthcare materials*. 2018;7(1).
2. Cavo M, Fato M, Peñuela L, Beltrame F, Raiteri R, Scaglione S. Microenvironment complexity and matrix stiffness regulate breast cancer cell activity in a 3D in vitro model. *Scientific Reports*. 2016;6:35367.
3. Lv H, Li L, Sun M, Zhang Y, Chen L, Rong Y, et al. Mechanism of regulation of stem cell differentiation by matrix stiffness. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6(1):103.
4. Laura MP, M. DJPE, Felipe P, Beatriz P. Role of substrate biomechanics in controlling (stem) cell fate: Implications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018;12(4):1012-9.
5. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. 2006;126(4):677-89.
6. Ranga A, Gobaa S, Okawa Y, Mosiewicz K, Negro A, Lutolf MP. 3D niche microarrays for systems-level analyses of cell fate. *Nature Communications*. 2014;5:4324.
7. Wu Wl, Rezai P, Hsu HH, Selvaganapathy PR. 1 - Materials and methods for the microfabrication of microfluidic biomedical devices. *Microfluidic Devices for Biomedical Applications: Woodhead Publishing*; 2013. p. 3-62.
8. Dolatshahi-Pirouz A, Nikkhah M, Gaharwar AK, Hashmi B, Guermani E, Aliabadi H, et al. A combinatorial cell-laden gel microarray for inducing osteogenic

differentiation of human mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*. 2014;4:3896.

9. Kwon H, Kim M, Seo Y, Moon YS, Lee HJ, Lee K, et al. Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*. 2018;156:172-93.
10. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science (New York, NY)*. 1990;247(4949 Pt 1):1465-8.9. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010;31(24):6121-30.
11. Patel S, Ashwanikumar N, Robinson E, DuRoss A, Sun C, Murphy-Benenato KE, et al. Boosting Intracellular Delivery of Lipid Nanoparticle-Encapsulated mRNA. *Nano Letters*. 2017;17(9):5711-8.
12. Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral vectors for gene delivery. *Chemical reviews*. 2009;109(2):259-302.
13. Reichmuth AM, Oberli MA, Jaklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Therapeutic Delivery*. 2016;7(5):319-34.
14. Oberli MA, Reichmuth AM, Dorkin JR, Mitchell MJ, Fenton OS, Jaklenec A, et al. Lipid Nanoparticle Assisted mRNA Delivery for Potent Cancer Immunotherapy. *Nano Letters*. 2017;17(3):1326-35.
15. Patel S, Athirasala A, Menezes PP, Ashwanikumar N, Zou T, Sahay G, et al. Messenger RNA Delivery for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Tissue engineering Part A*. 2018.
16. Ruparel NB, de Almeida JF, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. *Journal of endodontics*. 2013;39(3):357-63.
17. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010;31(24):6121-30.
18. Monteiro N, Thrivikraman G, Athirasala A, Tahayeri A, Franca CM, Ferracane JL, et al. Photopolymerization of cell-laden gelatin methacryloyl hydrogels using a dental curing light for regenerative dentistry. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2018;34(3):389-99.
19. Athirasala A, Tahayeri A, Thrivikraman G, Franca CM, Monteiro N, Tran V, et al. A dentin-derived hydrogel bioink for 3D bioprinting of cell laden scaffolds for regenerative dentistry. *Biofabrication*. 2018;10(2):024101.
20. Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(11):4872-7.
21. Wang Z, Tian Z, Menard F, Kim K. Comparative study of gelatin methacrylate hydrogels from different sources for biofabrication applications. *Biofabrication*. 2017;9(4):044101.
22. Bertassoni LE, Cardoso JC, Manoharan V, Cristino AL, Bhise NS, Araujo WA, et al. Direct-write Bioprinting of Cell-laden Methacrylated Gelatin Hydrogels. *Biofabrication*. 2014;6(2):024105-.
23. Yue K, Santiago GT-d, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*. 2015;73:254-71.
24. Noshadi I, Walker BW, Portillo-Lara R, Shirzaei Sani E, Gomes N, Aziziyan MR, et al. Engineering Biodegradable and Biocompatible Bio-ionic Liquid

- Conjugated Hydrogels with Tunable Conductivity and Mechanical Properties. *Scientific Reports*. 2017;7(1):4345.
25. Zhao X, Lang Q, Yildirimer L, Lin ZY, Cui W, Annabi N, et al. Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Advanced healthcare materials*. 2016;5(1):108-18.
26. Donnelly H, Salmeron-Sanchez M, Dalby MJ. Designing stem cell niches for differentiation and self-renewal. *Journal of the Royal Society Interface*. 2018;15(145):20180388
27. Bao M, Xie J, Huck WTS. Recent Advances in Engineering the Stem Cell Microniche in 3D. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*. 2018;5(8):1800448.
28. Ma Y, Lin M, Huang G, Li Y, Wang S, Bai G, et al. 3D Spatiotemporal Mechanical Microenvironment: A Hydrogel-Based Platform for Guiding Stem Cell Fate. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla)*. 2018:e1705911.
29. Park MH, Subbiah R, Kwon MJ, Kim WJ, Kim SH, Park K, et al. The three dimensional cues-integrated-biomaterial potentiates differentiation of human mesenchymal stem cells. *Carbohydrate polymers*. 2018;202:488-96.
30. Guan S, Rosenecker J. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems. *Gene Therapy*. 2017;24:133.
31. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jullien ND, Lembrez N, Mestries-Dubois P, Fabiani JN, et al. Decreased production of collagen Type III in cultured smooth muscle cells from varicose vein patients is due to a degradation by MMPs: possible implication of MMP-3. *Journal of vascular research*. 2005;42(5):388-98.

CAPÍTULO III

NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CARREGADAS COM HESPERETINA EM POLIAMIDA: UMA NOVA FORMULAÇÃO TÊXTIL PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS

Os experimentos apresentados neste capítulo foram realizados no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob supervisão da Prof. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres.

O artigo oriundo deste capítulo foi publicado no Periódico International Journal of Nanomedicine (FI: 4.37)

Apresentação

A insuficiência venosa crônica (IVC) é caracterizada por distúrbio do fluxo sanguíneo da veia periférica para a veia central, com hipertensão venosa associada que resulta em alterações na pele. Tradicionalmente, a abordagem clínica para o tratamento desta doença baseia-se no uso de meias compressivas. Recentemente, alguns estudos têm sugerido efeito terapêutico promissor de flavonóides no tratamento dos sintomas da IVC. Ademais, avanços no desenvolvimento de sistemas mais eficazes de administração de fármacos, usando estratégias nanotecnológicas associadas a produtos têxteis, tem contribuído para a concepção de novas opções terapêuticas. Diante disto, o presente trabalho buscou utilizar a nanotecnologia para desenvolver uma formulação inovadora contendo o flavonóide hesperetina (HT) e então impregná-la em fibras têxteis como possível alternativa ao tratamento de doenças venosas. Para tal, foram preparadas nanocápsulas de núcleo lipídico através do método de deposição interfacial do método de polímero pré-formado na concentração de 0,5 mg/mL. Foi então determinado o perfil de tamanho e distribuição das partículas e desenvolvido método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação do fármaco nas amostras. Estudos de eficiência de encapsulação ($98,81\% \pm 0,28\%$), microscopia, liberação de fármaco (HT livre: $104,96\% \pm 12,83\%$; HT nanoencapsulado: $69,90\% \pm 1,33\%$), penetração/permeação, teor de fármaco ($0,46 \pm 0,01$ mg/mL) e o efeito da lavagem do tecido após a impregnação do fármaco foram realizados como parte do estudo. Os resultados demonstraram que as nanocápsulas apresentaram tamanho e distribuição adequados com liberação controlada do fármaco e penetração/permeação nas camadas da pele. Além disso, o tecido de poliamida demonstrou maior adesividade da formulação, com um conteúdo 2,54 vezes maior do que a fibra de algodão; após uma e cinco lavagens, essa relação foi 2,80 vezes maior. Diante do exposto, meias compressivas impregnadas com nanocápsulas de hesperetina constituem uma plataforma terapêutica promissora a ser avaliada em futuros ensaios clínicos envolvendo doenças venosas.

3.1. INTRODUÇÃO

Os flavonóides são um grande grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos em plantas (1). Hesperetina (HT), 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavanona, é um bioflavonóide natural encontrado abundantemente em frutas cítricas com promissor efeito antioxidante e propriedades antiinflamatórias bem conhecidas na literatura (2,3). Vários estudos demonstraram que a HT pode exercer efeitos vasculoprotetores através da inibição de radicais livres e modulação da expressão de moléculas relacionadas à inflamação, como tromboxano A₂, inibindo a adesão de monócitos ao endotélio e reduzindo a adesão de moléculas a parede do vaso (4). Além disso, a HT através da inibição dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem e o aumento das correntes dos miócitos dependentes dos canais de K⁺ tem um efeito vasorelaxante direto. Assim, tais efeitos, tornam a hesperetina, uma excelente candidata ao tratamento das manifestações clínicas da insuficiência venosa crônica (5).

No entanto, o uso clínico de HT tem sido limitado devido à sua baixa solubilidade em água e reduzida biodisponibilidade *in vivo*. A baixa biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos exige o uso de altas doses para superar níveis sub-terapêuticos no plasma (6,7). Para contornar essa limitação, um grande número de estudos foi publicado descrevendo novos sistemas de liberação, como complexos de inclusão com ciclodextrinas (8-11) e nanopartículas (7,12-15). Sistemas nanoparticulados são considerados veículos promissores de moléculas bioativas. Diante disto, estudos envolvendo a nanoencapsulação de produtos advindos de fontes naturais, como a HT, tem sido extensivamente investigados nos últimos anos (16).

Todavia, um dos principais desafios em relação às doenças crônicas é a baixa adesão do paciente aos tratamentos prescritos. Muitas condições clínicas requerem cuidados baseados, em grande parte, no autogerenciamento do paciente (geralmente requerendo multi-terapias complexas). As tecnologias médicas que monitoram mudanças no estilo de vida do paciente são fundamentais para o tratamento. Nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, em países desenvolvidos, apenas 50% dos pacientes que sofrem com doenças crônicas aderem aos tratamentos na forma que foram prescritos (17). Diante desse cenário, a nanotecnologia é uma

ferramenta importante na concepção de novas formulações ou produtos para a saúde (11,17).

As nanopartículas usadas como sistemas de liberação de fármacos têm tamanhos de partícula na faixa de 50 a 300 nm (18). A depender dos métodos e materiais usados para a preparação, diferentes estruturas supramoleculares podem ser obtidas. Em geral, quando compostas por um núcleo oleoso ou lipídico envolto por um invólucro polimérico, são conhecidas como nanocápsulas (19-21). Esses sistemas apresentam diversas vantagens, incluindo a liberação controlada e sustentada do fármaco, permitindo um tratamento eficaz e menos tóxico do que quando opções convencionais são utilizadas (20).

Na pele, as nanocápsulas podem atuar como um sistema de reservatório para fármacos lipofílicos (22) controlando sua penetração/permeação na pele através do contato com o estrato córneo (18). Vários estudos avaliaram a administração de nanocápsulas por diferentes vias, tais como, oral, ocular, cutânea, vaginal e parenteral, demonstrando a versatilidade dos sistemas (12). As nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) são um tipo muito específico de nanocápsulas poliméricas não tóxicas (14) nas quais o núcleo oleoso é formado por um organogel composto por triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico e monoestearato de sorbitano. A composição química central permite que essas nanocápsulas controlem a penetração de fármacos em diferentes tecidos (13). Uma variedade de nanossistemas como carreadores lipídicos nanoestruturados, nanossuspensões e nanocristais foram estudadas com HT (15,23,24). Todavia, o presente estudo propõe o encapsulamento de HT em nanocápsulas de núcleo lipídico.

Dentro deste cenário de novas tecnologias médicas, as nanopartículas atraíram o setor têxtil e encorajaram o desenvolvimento de tecidos contendo fármacos ou ingredientes ativos para administração tópica em uma variedade de usos, incluindo o tratamento de insuficiência venosa crônica e outras condições (25,26) bem como em tecidos antibacterianos e repelentes de insetos (27). Nestes biomateriais, o fármaco é liberado em resposta a um estímulo cutâneo, como sudorese, fricção ou enzimas da pele (28). Diante disto, o objetivo desse trabalho consiste em propor uma abordagem inovadora para o tratamento de úlceras venosas baseada em meias compressivas contendo nanocápsulas de HT. Este biomaterial, é seguro, simples de usar e através da ação sinérgica do

fármaco à compressão, pode evitar os efeitos adversos relatados para os flavonóides de uso oral. A eficácia dessa estratégia promissora foi avaliada por estudos *in vitro* de liberação e penetração/permeação em modelo de pele de orelha de porco.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Preparação das nanocápsulas

Nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (29). As fases orgânica e aquosa (Tabela 1) foram aquecidas separadamente sob agitação, e após solubilização total dos componentes, a fase orgânica foi vertida cuidadosamente sobre a fase aquosa sendo essa mistura mantida sob agitação por mais 10 minutos a 40°C. Posteriormente, essa preparação foi transferida para rotaevaporador onde o volume final da formulação foi ajustado. A fração volumétrica empregada foi de acordo com a formulação otimizada por Venturini et al (2011) (21). O polímero utilizado para estruturar a parede das nanocápsulas foi a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) ($M_w = 80.000$), o teor de hesperetina utilizado para preparação das NP foi de 0,5 mg/mL. A composição da formulação para um volume final de 10 mL está descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Composição química das nanocápsulas.

FASE ORGÂNICA	FASE AQUOSA
Monoestearato de sorbitano.....38,5 mg	Polissorbato80.....76,8 mg
Triglicerídeos ác. cáprico/caprílico...0,1648 mL	Água.....53 mL
Hesperetina.....5 mg	
poli(ϵ -caprolactona).....100 mg	
Acetona.....27 mL	

3.2.2. Caracterização físico-química das nanocápsulas

3.2.1.1. Determinação do diâmetro de partícula e índice de polidispersão

As análises de determinação de diâmetro/tamanho das partículas foram realizadas empregando-se duas técnicas diferentes, sendo elas espalhamento

de luz e difratometria à laser. O diâmetro médio e a distribuição de tamanho de partícula foram determinados por difratometria à laser (*Mastersizer*® 2000, *Malvern*). Para essa determinação, foi utilizado como parâmetro o índice de refração do poliestireno de 1,59 e um espectro de leitura compreendido entre 0,02 – 2000 µm. O diâmetro médio baseado no volume (d4,3) foi utilizado como parâmetro para a distribuição de tamanho de partículas. Medidas do diâmetro de partículas correspondentes a 10, 50 e 90% da distribuição acumulada (d0,1, d0,5 e d0,9, respectivamente) também foram realizadas. Por meio dessas medidas, foi determinado o valor de *span*, definido como uma medida da dispersão granulométrica, que relaciona valores encontrados do diâmetro das partículas correspondentes a 10, 50 e 90% respectivamente, da distribuição acumulada para uma amostra, sendo estes valores calculados pela Equação 1:

$$\text{Span} = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad \text{Equação 1}$$

Em seguida, foram realizadas análises em triplicata do diâmetro das LNCs e índice de polidispersão (PDI), determinados através de espalhamento de luz dinâmico (*Zetasizer*® nano-ZS modelo ZEN 3600, *Malvern*), após diluição das dispersões (500 vezes, v/v) em água filtrada em filtro 0,45 µm Millipore.

3.2.1.2. Potencial zeta das partículas e pH das suspensões de nanocápsulas

O potencial zeta das formulações contendo os nanocarreadores foi obtido através da medida da mobilidade eletroforética (*Zetasizer*® nano-ZS modelo ZEN 3600, *Malvern*), após diluição das dispersões (500 vezes, v/v) em solução de NaCl 10 mM previamente filtrada através de membrana 0,45 µm Millipore. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações. A análise de pH das suspensões foi realizada utilizando-se potenciômetro previamente calibrado com tampão 4,0 e 7,0. A medida foi feita diretamente nas suspensões. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações.

3.2.1.3. Teor de hesperetina nas LNCs

A concentração total de hesperetina nas formulações de nanocápsulas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com degaseificador DGU-20A3, um injetor automático SIL-20A, duas bombas LC-20AD, detector de arranjo de diodo SPD-M20Avp (DAD) acoplados a uma interface CBM-20A. A fase móvel (1,0 mL/min) utilizada foi constituída de acetonitrila/água/ácido acético 1% (50:49:1 v/v). Cada suspensão (200 µL) foi tratada com acetonitrila (10 mL). As amostras (n=3) foram mantidas em ultrassom por 60 minutos. Cada dispersão foi então centrifugada a 17.632 xg durante 15 min. A solução foi então filtrada (*Millipore* 0,45 µm) e injetada (100 µl) em CLAE. O método utilizado foi previamente validado de acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

3.2.1.4. Eficiência de encapsulação das nanocápsulas

Para análise da eficiência de encapsulação da hesperetina nas nanocápsulas foi realizado o ensaio de ultrafiltração - centrifugação utilizando membrana *Microcon* 10.000 Daltons, *Millipore*®. A suspensão (400 µL) foi colocada em tubo *Ultrafree* e centrifugada a 7280 xg por 10 minutos. Durante esse processo, as nanocápsulas ficaram retidas no filtro e a porção de fármaco não associado passou através da membrana. O ultrafiltrado foi quantificado em CLAE e a concentração do fármaco associado as nanocápsulas foi calculada pela razão entre a quantidade total de hesperetina na formulação e a quantidade da substância presente na fase aquosa da suspensão.

3.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão

A formulação diluída (*5x-Milli-Q*®) foi gotejada (10 µL) em grade de amostra (filme de suporte *Formvar-Carbon*, *Electron Microscopy Sciences*) e negativamente corada com solução de acetato de uranila (2% p/v). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (TEM JEOL 1230) operando a 80 kV (Serviço de Microscopia Eletrônica da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil).

3.2.4. Estudo de liberação *in vitro*

Para este estudo, inicialmente foi necessária a realização de testes prévios de solubilidade da hesperetina, visando à escolha da solução receptora que mantivesse a condição *sink*. A escolha da solução receptora a ser utilizada no estudo de liberação e permeação cutânea *in vitro* foi baseada na solubilização da quantidade de fármaco presente em um volume de solução receptora que demonstrasse ser capaz de manter a condição *sink* ($C_t < 0,1 C_s$). O teste foi realizado através da adição de uma quantidade excessiva de hesperetina na solução receptora que foi submetida ao vórtex e que, posteriormente, foi deixada em repouso por 24 horas. Foi então coletada uma alíquota da fase límpida, diluída e analisada em CLAE. As soluções receptoras testadas foram: DMSO (0,5% e 2%), etanol 10%, 30% e 50%, propilenoglicol (1% e 2%), tween 80 (1%, 5% e 10%).

3.2.4.1. Estudo de liberação *in vitro*

O ensaio foi realizado sob agitação em banho-maria a 37°C, durante 24 horas, mantendo condição *Sink*. Em um saco de diálise, foi colocado 1 mL da formulação, este foi imerso em 100 mL de meio receptor. Nos tempos especificados, foi retirado 1 mL da solução e o meio repostado na mesma quantidade. O estudo foi realizado em comparação com uma solução hidroalcolica (10% v/v) de hesperetina livre. Os dados obtidos foram ajustados aos modelos matemáticos monoexponenciais e biexponenciais semi-empíricos usando o *software Scientist® 2.0 (MicroMath®, EUA)*. Os ajustes foram analisados considerando a correlação entre pontos experimentais e perfis teóricos e o maior valor dos critérios de seleção de modelos (MSC) fornecidos pelo *software*.

3.2.5. Viabilidade celular

A viabilidade de queratinócitos (linhagem HaCaT) foi determinada pelo ensaio de MTT. As células HaCaT (9×10^3 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações (5, 10, 20, 30, 40, 50 μM ; $n = 4$) de nanocápsulas contendo hesperetina (NC-HT), nanocápsulas brancas (NC-BR) e dimetilsulfóxido (DMSO) e incubados por 24 horas a 37 °C. A viabilidade celular foi avaliada usando MTT (brometo de 3- [4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difenil

tetrazólio). Após o tratamento indicado, 100 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço por 3 horas a 37 °C. O sal MTT foi reduzido a cristais de formazan pelas células viáveis. Em seguida, os cristais formados foram solubilizados em DMSO e medidos a 570 e 630 nm em um leitor de microplacas (*Spectramax M2e* e v 5.4.1; *SoftMax Pro Software Interface*; *Molecular Devices*, Sunnyvale, CA, EUA). Os valores foram convertidos em viabilidade celular, considerando 100% como controle sem tratamento. O experimento foi realizado em triplicata. A viabilidade celular para os grupos tratados foi calculada com base nas células sem tratamento, o que representou 100% de viabilidade (30,31).

3.2.6. Teste de irritabilidade cutânea utilizando membrana corioalantóica do ovo de galinha (HET-CAM)

O potencial de irritabilidade das nanocápsulas de hesperetina foi avaliado pela técnica HET-CAM. Para isso, ovos fertilizados de galinha foram incubados a $37,7 \pm 0,2$ °C e umidade relativa de $60 \pm 5\%$ por 8 dias. Em seguida, um orifício circular com um diâmetro de cerca de 2 cm foi cortado no polo menos convexo dos ovos, sem causar danos aos vasos sanguíneos e deixando a membrana corioalantóide (CAM) exposta. O ensaio foi realizado com nanocápsulas de hesperetina (460 µg/mL) e nanocápsulas brancas. A solução salina e NaOH 1N foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. 100 µL das amostras foram aplicadas na CAM. Após a aplicação, a CAM foi observada por 300 segundos, analisando o tempo de ocorrência da hemorragia, lise vascular e coagulação. Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3). O escore de irritação (I) das amostras foi determinado de acordo com a equação 2 (32,33), onde:

$$I = \left(\frac{301 - sH}{300} * 5 \right) + \left(\frac{301 - sL}{300} * 7 \right) + \left(\frac{301 - sC}{300} * 9 \right) \quad \text{Equação 2}$$

I: escore de irritação da amostra; sH: tempo da hemorragia em segundos; sL: tempo de lise vascular em segundos; sC: tempo de coagulação em segundos.

3.2.7. Determinação da densidade das formulações estudadas

O cálculo da densidade relativa das formulações estudadas (suspensão de nanocápsulas contendo hesperetina e solução hidroalcoólica de hesperetina) foi realizado através da utilização de picnômetro com volume de 10 mL, onde foi possível obter a densidade das formulações em relação a um produto de densidade conhecida (água).

3.2.8. Impregnação dos tecidos com as nanopartículas

As formulações testadas (suspensão de nanocápsulas e solução hidroalcoólica de hesperetina) foram transferidas para um frasco *spray* e a mesma foi borrifada 3 vezes. Para que fosse possível calcular a quantidade teórica de hesperetina após borrifar as formulações nos tecidos, foi realizada a pesagem dos mesmos antes e após a aplicação do produto, e para o cálculo da concentração teórica de fármaco em cada tecido estudado, foi utilizada a densidade relativa das formulações.

3.2.9. Caracterização dos tecidos após impregnação

3.2.9.1. Determinação do teor de hesperetina após impregnação

A concentração de hesperetina nos tecidos (algodão – A e poliamida - P) após a impregnação dos mesmos com as formulações, foi determinada por CLAE. Um pedaço de cada tecido (6 cm x 6 cm) foi picotado e inserido em um tubo de ensaio contendo acetonitrila sendo submetido ao vórtex por 5 min e, posteriormente, ao ultrassom por 30 minutos para extração do fármaco. Após extração, foi retirada uma alíquota da solução e transferida para um balão volumétrico, para ajuste da concentração final. A solução no balão volumétrico foi filtrada e conduzida ao CLAE para quantificação. O método de extração e leitura em CLAE foi previamente validado.

3.2.9.2. Lavagem dos tecidos

As amostras foram introduzidas em um béquer contendo 500 mL de água destilada com 2 g/L de sabão (*Savon de Marseille*) totalmente dissolvido. O béquer foi introduzido em banho termostático a 30°C. O tecido foi agitado utilizando um agitador de hélice por 10 min a 200 rpm. Posteriormente, os pedaços de tecidos foram removidos e lavados 2 vezes em água destilada nas

mesmas condições acima descritas. A cada 1 e 5 lavagens os pedaços de tecidos foram retirados e secos em temperatura ambiente. Os pedaços de tecidos foram tratados com acetonitrila a fim de extrair a hesperetina contida na fibra para determinar a quantidade de fármaco restante após determinada lavagem.

3.2.9.3. Análise morfológica dos tecidos

Antes e após a impregnação e lavagens, os tecidos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (*Scanning Microscope* JSM-5800-Jeol). As amostras foram recobertas com ouro antes das análises e visualizadas em aumentos de até 5500 vezes.

3.2.10. Teste de permeação/penetração *in vitro* e absorção na pele da orelha suína

Os ensaios de permeação cutânea *in vitro* foram realizados em células de Franz automatizadas, com as nanocápsulas antes e após impregnação nos tecidos. Esse aparelho é constituído de 6 células que são envoltas por uma “jaqueta” onde passa água com temperatura controlada, cada uma com compartimento receptor de 7 mL e uma área disponível para difusão de 1,77 cm². Todo esse sistema é ainda acoplado a uma placa de agitação magnética. No estudo foi empregada membrana natural (pele de orelha de porcas, sem pêlo e sem o tecido subcutâneo e gorduroso presente abaixo da derme) com espessura de 1,65-1,90 mm. A pele de cerca de 1 mm, obtida da epiderme e parte da derme, foi obtida de orelha suína mediante utilização de bisturis e do dermatótomo. Esta camada de pele foi congelada e estocada a -20°C. No momento da utilização, a fina camada de pele foi descongelada a temperatura ambiente, seca com papel de filtro e cortada com as dimensões adequadas para a Célula de Franz. O ensaio foi realizado com temperatura controlada de 32°C ± 0,5°C. A solução receptora foi colocada no compartimento receptor. Sobre a extremidade das células foram esticadas as membranas, com a derme voltada para a solução receptora e sobre essas foram colocados as amostras (A+HT livre; P+ HT livre; A+NC-HT; P+NC-HT). Para fins de comparação a hesperetina livre e a formulação de LNCs aplicadas diretamente na pele também foram avaliadas.

Alíquotas das amostras no meio receptor foram coletadas a cada 15min, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12h, 18, 24 e 48h e levadas ao CLAE para quantificação.

Ao fim do experimento, o estrato córneo foi removido da pele através da técnica de *tape stripping*, utilizando 18 pedaços de fita adesiva. Em seguida, a epiderme e a derme foram separadas utilizando banho de água quente (60 °C) por 45 segundos, seguido por remoção com bisturi. A hesperetina, foi extraída das camadas da pele com acetonitrila. A epiderme e a derme foram dissolvidas em 6 mL de acetonitrila em tubos de ensaio e submetidas a 2 minutos de extração em vórtex, seguido de 30 minutos no banho de ultrassom. As amostras foram filtradas em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm e analisadas por CLAE (34, 35).

3.2.11. Análise estatística

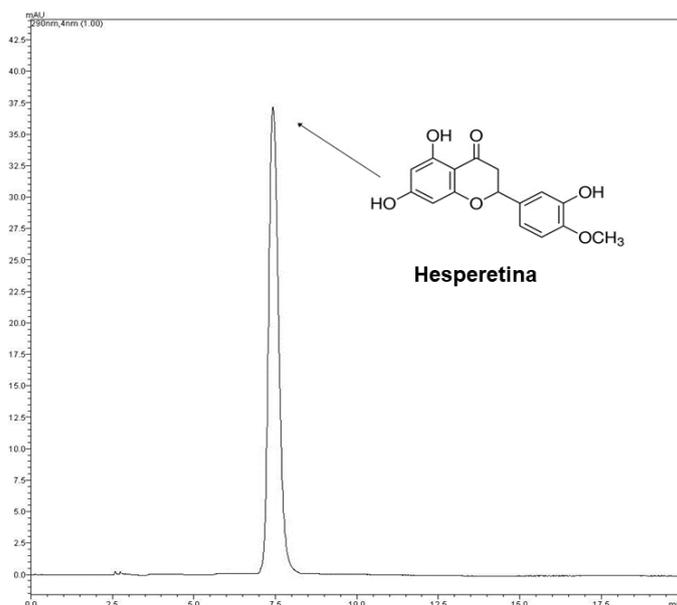
Os resultados de liberação, penetração e permanência da hesperetina após as lavagens foram analisados estatisticamente com auxílio do software *GraphPad Prism* versão 5.0, sendo os resultados expressos como média ± desvio padrão. Os resultados foram comparados através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Tukey*.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado apresentado na Figura 1 mostra o perfil cromatográfico CLAE-DAD da hesperetina a 290 nm. O pico de HT teve um tempo de retenção de 7,5 minutos. O método de HPLC desenvolvido foi validado através dos testes de linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez. O valor de *r* obtido a partir dos dados de cinco concentrações foi superior a 0,999, atestando a linearidade do método. O LD e LQ foram 0,88 e 0,93 µg/mL, respectivamente, indicando que o método desenvolvido exibiu alta sensibilidade. No teste de variabilidade intradia, os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram inferiores a 0,05%. No teste de variabilidade inter-dia, os DPRs foram de 0,38% e 0,49% nos dias 1 e 2, respectivamente. Os valores de DPR dos ensaios de precisão indicaram que o método desenvolvido foi suficientemente preciso. A exatidão o DPR das concentrações baixa, média e alta foram de 99,99 ± 0,075%; 99,97 ± 0,034% e

100,01 ± 0,071%, respectivamente, demonstrando que o método analítico estava exato. Nenhuma alteração significativa foi observada com a mudança da coluna analítica e vazão, mostrando que o método foi robusto nas condições avaliadas.

Figura 1: Cromatograma da hesperetina obtido por CLAE-DAD (290 nm).



As formulações de nanocápsulas apresentaram-se de cor branca opalescente e uma reflexão azulada devido ao efeito *Tyndall*, como já foi relatado anteriormente para nanopartículas lipídicas de quetiapina (36) e para formulações de LNC semelhantes às do nosso estudo (21). Além disso, o tamanho médio das partículas foi de 204 ± 1 nm com um baixo índice de polidispersão (PDI) ($0,14 \pm 0,02$). O potencial zeta foi de $-11,8 \pm 0,9$ mV (Tabela 2). A repulsão eletrostática resultante da densidade de carga superficial (34) é em geral, o mecanismo para uma estabilização cinética da fase coloidal hidrofóbica dispersa em água. No entanto, o polissorbato 80 está revestindo as nanocápsulas. Neste caso, o valor negativo do potencial zeta foi próximo de zero como consequência da composição química (poliéster revestido por polissorbato 80), cujo mecanismo de estabilização é baseado no efeito de impedimento estérico (13, 36-38).

A reprodutibilidade da distribuição de tamanho do lote mostra que a formulação foi cineticamente estável, isto é, o sistema tem uma separação de fase retardada. A PCL utilizada na formulação das nanocápsulas possui grupos

terminais COOH, que podem apresentar um equilíbrio ácido-base formando carboxilatos, tornando a superfície carregada negativamente. Raber et al (2014) mostraram que nanopartículas carregadas negativamente interagem mais efetivamente com a superfície da pele, facilitando o transporte através dos folículos (39). O perfil do diâmetro de partículas determinado por difração de laser mostrou um diâmetro médio ponderado em volume $D(4,3)$ de 233 ± 8 nm, $D(0,5)$ de 198 ± 8 nm e polidispersividade (valor de span) de $1,75 \pm 0,02$ (Tabela 2). Os resultados demonstraram que as nanocápsulas desenvolvidas possuem diâmetros médios adequados e distribuições granulométricas estreitas no presente estudo (Figura 2A).

Propriedades físico-químicas similares em relação à distribuição de tamanho e potencial zeta foram relatadas em outros estudos para o mesmo tipo de nanocarreador polimérico. Oliveira et al (2013) em um estudo com formulação de éster dietil metotrexato (MTX (OEt) 2-LNC0.5) em uma fração de volume LNC similar, tinham mediana de diâmetros, baseado em um volume de $D(0,5) = 160$ nm (40). Friedrich et al (2016) desenvolveram nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com tacrolimus com $D(0,5) = 192$ nm (baseado em volume) e um potencial zeta de $-13,05$ mV (41). A PCL na interface partícula-água conduziu a valores de pH ligeiramente ácidos ($6,50 \pm 0,09$) devido à presença de grupos ácidos carboxílicos terminais no esqueleto do polímero (Tabela 2) (19, 40).

Figura 2: Caracterização das nanocápsulas. (A) Tamanho de partícula das nanocápsulas contendo hesperetina obtido por difração a laser ($n = 3$). (B) Microscopia eletrônica de transmissão das nanocápsulas de núcleo lipídico.

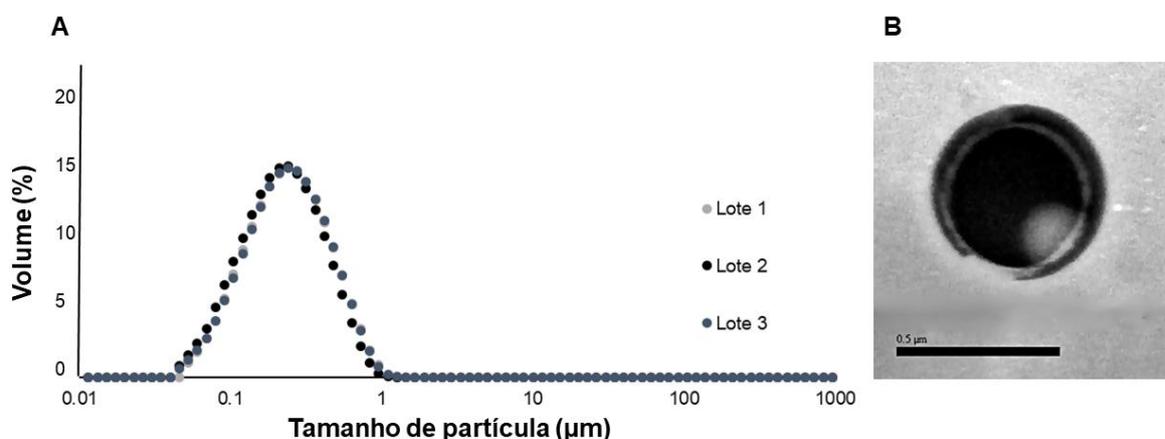


Tabela 2: Caracterização das nanocápsulas.

\varnothing (nm)	PDI	ζ (mV)	D(4,3) (nm)	D(0,5) (nm)	Span	pH	Teor (mg/mL)	EE (%)
204 \pm 1	0,14 \pm 0,02	-11 \pm 0,9	233 \pm 8	198 \pm 8	1,75 \pm 0,02	6,5 \pm 0,09	0,46 \pm 0,01	98,8 \pm 0,28

Nota: \varnothing : diâmetro das nanocápsulas; PDI: índice de polidispersividade; ζ : potencial zeta; D(4,3): diâmetro médio das partículas; d(0,5): diâmetro de 50% das partículas; Span: extensão da distribuição de tamanho; EE: eficiência de encapsulação

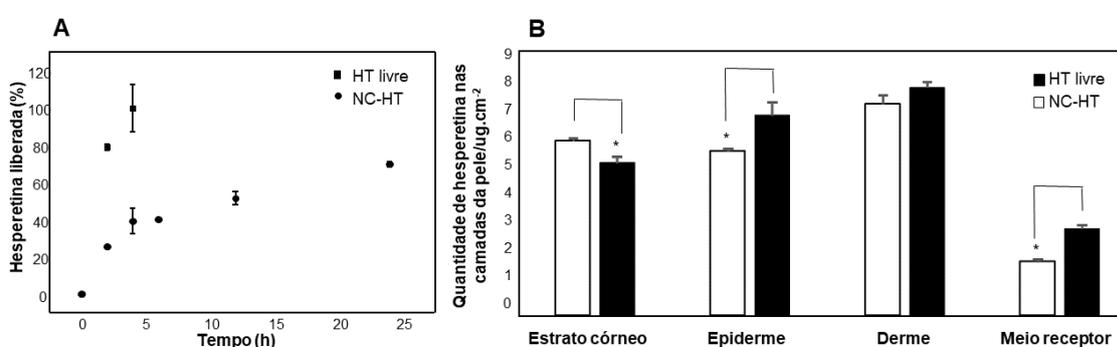
O teor de fármaco determinado para as nanocápsulas de núcleo lipídico carregado com HT foi de 0,46 \pm 0,01 mg/mL. Além disso, os resultados de eficiência de encapsulação mostraram que 98,81 \pm 0,28% (Tabela 2) das moléculas de hesperetina foram aprisionadas nas nanocápsulas, o que é esperado para moléculas hidrofóbicas como a HT. Estes dados sugerem uma forte afinidade entre o núcleo lipídico das nanocápsulas e o flavonóide. Em geral, a lipofilicidade do fármaco é o principal parâmetro em termos de partição de fármacos entre as pseudo-fases das dispersões coloidais (41). Segundo o algoritmo proposto por Oliveira et al (2013), os fármacos que apresentam valores de log D positivos, como o da hesperetina (2,82) possuem um mecanismo de distribuição do fármaco do tipo III, indicando sua maior afinidade com a fase lipofílica das nanocápsulas (40).

Ademais, a microscopia de transmissão das nanocápsulas contendo hesperetina, mostrou uma estrutura núcleo-coroa de nanopartículas esféricas e confirmou seu tamanho nanométrico (Figura 2B) (42, 43). Achados semelhantes foram descritos por Fathi et al (2013) e Pánek et al (2011) para outras formulações de nanocarreadores contendo HT compostas de polissorbato 80/monoestearato de glicerol/compritol e poliestireno/tetrahydrofurano/água, poli (metacrilato de metila)/acetona /água, respectivamente (23, 44).

O experimento de liberação *in vitro* da hesperetina livre (HT livre) e nanoencapsulada (NC-HT) foi realizado através do método de saco de diálise, utilizando etanol 10% (v/v) como meio de liberação. Os resultados do estudo estão apresentados na Figura 3A. A hesperetina livre teve uma difusão rápida (104,96 \pm 12,83%) após 4 h de experimento. Em contraste, após 24 h, apenas 69,90 \pm 1,33% da HT foi liberada das nanocápsulas, indicando que este

configura-se como um excelente sistema de liberação sustentada do fármaco. Além disso, a fase *burst* inicial corrobora com o mecanismo de encapsulamento proposto (tipo III), no qual o fármaco está parcialmente localizado na parede polimérica das LNCs.

Figura 3: Perfis de liberação e penetração/permeação *in vitro* de hesperetina livre (HT livre, dissolvida em solução hidroalcolica 10% (v/v), e nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com hesperetina (NC-HT). (A) Perfil de liberação (n = 3). (B) Penetração/permeação em pele de orelha suína. *Representam significância estatística (p <0,05) (n=6).



De acordo com os estudos de modelagem da liberação, realizados através de modelos matemáticos baseados no maior coeficiente de correlação (r) e critério de seleção de modelo (MSC), o melhor ajuste cinético mostrou ser o modelo de ordem zero (k_1 : $0,0696 \pm 0,0054h$ e $0,7951 \pm 0,0266 h$; r : $0,9905 \pm 0,0081$ e $0,9821 \pm 0,0013$; MSC: $0,5572 \pm 0,1880$ e $1,4187 \pm 0,4005$) para NC-HT e HT livre, respectivamente. Com base nos resultados descritos acima, foi possível observar o perfil de liberação do fármaco a uma taxa constante (independentemente da concentração). De acordo com um estudo de revisão realizado por Siepmann & Siepmann (2008), se condições perfeitas de diálise são mantidas durante todo o período de experimento, a liberação do fármaco é primariamente controlada pela difusão através da matriz do nanocarreador (45). A meia-vida de liberação da hesperetina das nanocápsulas foi 9,9483 h, confirmando a alta eficiência de encapsulamento já discutido neste estudo, enquanto o fármaco livre apresentou uma difusão significativamente mais rápida ($t_{1/2} = 0,8716 h$). No que se refere ao tipo de liberação, a NC-HT obedeceu ao

modelo de difusão de *Fick*. O nanossistema estudado, compreendeu um sistema de reservatório com depósito de fármaco circundado por uma membrana formando uma barreira de controle de liberação formada por PCL (40 - 44).

Nanocarreadores que apresentam liberação sustentada do fármaco, podem atuar como bons sistemas de liberação, direcionando e melhorando a penetração do princípio ativo (42). A penetração cutânea da hesperetina livre e nanoencapsulada foi determinada a partir da remoção sucessiva do estrato córneo e da extração do fármaco das camadas da pele. Nossos resultados (Figura 3B) mostraram quantidades significativamente maiores ($p < 0,05$) de fármaco nanoencapsulado ($6,31 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) do que hesperetina livre ($5,52 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) no estrato córneo. Em contraste, na epiderme, foi observada uma maior quantidade ($p < 0,05$) de hesperetina livre ($7,23 \pm 0,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) em relação ao fármaco nanoencapsulado ($5,94 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Na derme, a quantidade de hesperetina proveniente das nanocápsulas foi de $7,63 \pm 0,32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, enquanto a concentração de fármaco livre nessa camada foi de $8,23 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, sem diferença significativa observada.

Estes resultados refletem o tipo de nanossistema utilizado, que conforme já fora discutido, age como um reservatório liberando a hesperetina de forma controlada como uma função do tempo (46). Dessa forma, as nanocápsulas controlam a penetração do fármaco na pele, levando a uma quantidade prolongada do flavonóide disponível para a derme, como relatado anteriormente em formulações de nanocápsulas poliméricas (18). A quantidade provavelmente permeada do fármaco é considerada como tudo que foi quantificado no meio receptor, onde observamos uma quantidade significativamente maior ($p < 0,05$) de hesperetina livre ($3,12 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) em comparação com o fármaco carregado pelas LNCs ($1,95 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Tais achados corroboram com os resultados apresentados a partir do ensaio de liberação do fármaco, que demonstrou que a hesperetina livre difunde-se rapidamente da solução hidroalcolica, enquanto é liberada de maneira controlada a partir das nanocápsulas.

Maiti et al (2009) e Kanaze et al (2007) realizaram estudos farmacocinéticos com a hesperetina administrada via oral e detectaram concentrações séricas máximas de $6,12 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $623,37 \text{ ng}/\text{mL}$, em modelos de roedores e humanos, respectivamente. Esses dados quando confrontados com

a hesperetina quantificada no meio receptor, indicam que a formulação proposta no presente trabalho, tem ação tópica. Uma vez que o fármaco não possui quantidade suficiente para atingir a circulação sistêmica, passar pelas fases de metabolização e tornar-se biodisponível em concentração terapeuticamente ativa nos tecidos (47, 48).

Estudos recentes demonstraram que o tamanho reduzido das nanocápsulas permite-lhes penetrar nas células e entregar fármacos intracelularmente sem que os mesmos sofram degradação extracelular (47, 48). Além disso, sistemas de liberação controlada podem prolongar a liberação e aumentar o tempo de contato entre o fármaco com a pele (21). No presente estudo, as nanocápsulas aumentaram a quantidade de fármaco retido no estrato córneo, possivelmente devido à sua estrutura rígida (49) que mantém a liberação controlada do fármaco na pele. Nanocápsulas de núcleo lipídico possuem a característica de perder sua forma algumas horas após a aplicação cutânea devido à interação com os lipídios do estrato córneo (21,50– 52). Juntos estes resultados sugerem que as nanocápsulas de núcleo lipídico são carreadores interessantes para veicular a hesperetina e estudar a ação tópica deste fármaco.

A fim de avaliar a segurança desta formulação, foi realizado o estudo de toxicidade em linhagem de células de queratinócitos. O efeito das nanocápsulas contendo hesperetina em células da linhagem HaCaT foi avaliado após 24 h de tratamento e a viabilidade celular foi determinada usando o ensaio de MTT. As nanocápsulas contendo hesperetina foram testadas nas concentrações de 5 a 50 μM e foi observado que a concentração de 50 μM não afetou significativamente a viabilidade celular (Figura 4), enquanto a hesperetina livre na mesma concentração induziu morte celular nesta linhagem de células. No entanto, após o tratamento com várias concentrações de nanocápsulas contendo hesperetina, a viabilidade celular foi aumentada de uma maneira dependente da concentração. Ademais, as nanocápsulas brancas também não apresentaram toxicidade a esta linhagem de células, quando comparadas com os controles. Demonstrando assim que, tanto o veículo quanto o fármaco são seguros nessas concentrações para serem administrados topicamente.

Figura 4: Efeito de nanocápsulas contendo hesperetina na viabilidade celular de células da linhagem HaCaT e irritabilidade cutânea em modelo de membrana corioalantóica. (A) A viabilidade celular foi determinada por ensaio MTT e os resultados expressos em porcentagem em relação ao controle. Células da linhagem HaCaT foram tratadas com NCHT (nanocápsulas contendo hesperetina), nanocápsulas brancas (NCBR), hesperetina livre e DMSO nas concentrações de C1 a C6 (5 a 50 μM) e comparadas com o controle. (B - D) Irritabilidade cutânea pelo ensaio HET-CAM. (B) NaOH 1N (controle positivo) que mostra hemorragia, lise vascular e coagulação; (C) solução salina (controle negativo); (D) NCBR; (E): NCHT.

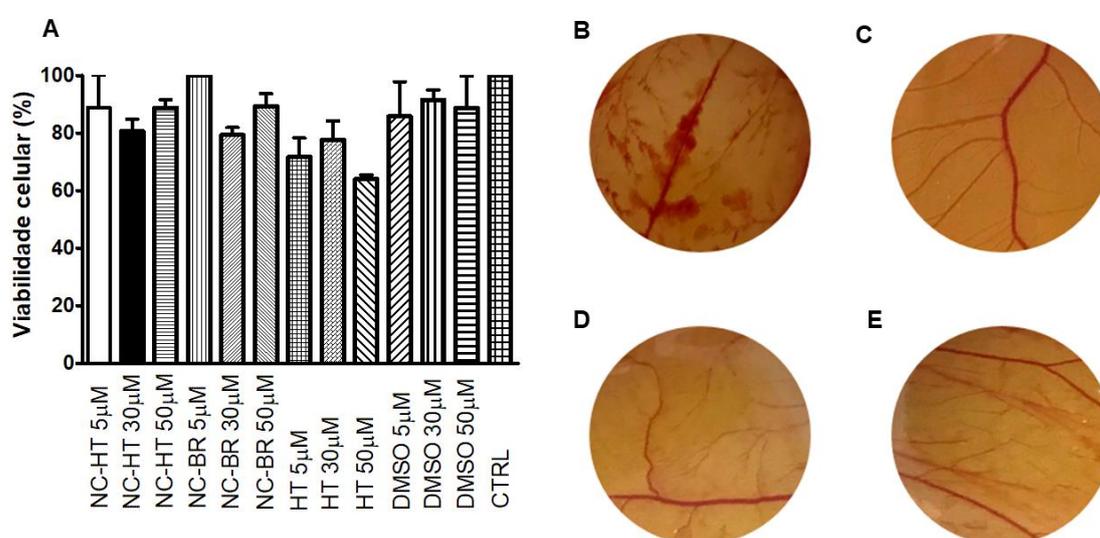


Tabela 3: Escores de irritação (I) baseados no teste de Het-CAM

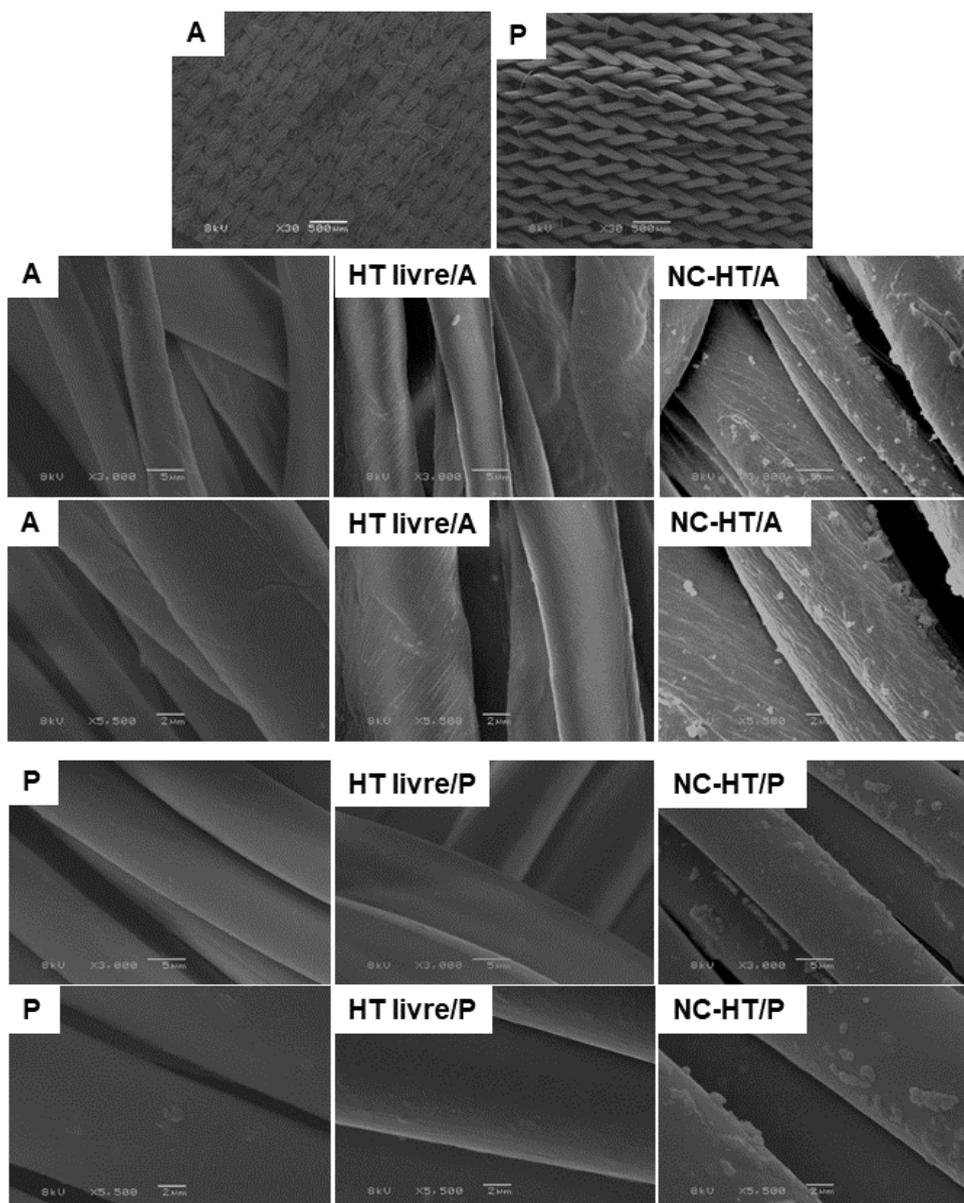
Amostra	I \pm DP	Classificação
NaOH 0,1N (controle positivo)	16,34 \pm 0,2	Severamente irritante
Salina (controle negativo)	0,0 \pm 0,0	Não irritante
NCHT	0,0 \pm 0,0	Não irritante
NCBR	0,0 \pm 0,0	Não irritante

O potencial de irritação cutânea das nanocápsulas de hesperetina foi avaliado pelo escore de irritação (I) utilizando o ensaio HET-CAM. O I foi usado para determinar se as formulações poderiam causar alguma irritação. Valores de

I entre 0 e 0.9: significam que as formulações são não irritantes; 1 - 4.9: potencial de irritação leve; 5 - 8,9 potencial de irritação moderada e 9 - 21 potencial de irritação grave, de acordo com Luepke (1985) e Sahle et al (2014) (32,33). A solução de NaOH 1N foi utilizada como controle positivo e exibiu valor de I de $16,34 \pm 0,2$ (Tabela 3), o que demonstra o seu grave potencial irritante. Por outro lado, a solução de salina (controle negativo) foi não irritante com valor I de 0. Da mesma forma, as nanocápsulas de hesperetina e nanocápsulas brancas também mostraram I de 0, pois não houve hemorragia, lise vascular e coagulação na CAM após a aplicação das formulações, nas concentrações trabalhadas nesse estudo (Figura 4B-D). Portanto, os resultados mostraram claramente que as nanocápsulas de hesperetina não são irritantes e podem ser utilizadas em formulações ou biomateriais para aplicação na pele.

Dado o potencial desta formulação, do ponto de vista físico-químico e de segurança para aplicação tópica, as NC-HT foram impregnadas em fibras têxteis como alternativa aos tratamentos convencionais prescritos para insuficiência venosa crônica. Existem alguns estudos que utilizaram diferentes tecidos (poliamida, poliuretano e viscose) impregnados com produtos naturais (troxerrutina e aescina) para o tratamento dessa doença. No entanto, esses trabalhos utilizaram ciclodextrinas como plataforma de administração dos fármacos (25,26,29), enquanto nosso estudo fez uso de nanocápsulas de núcleo lipídico para veicular hesperetina, uma potencial candidata para o tratamento da insuficiência venosa. Para tal, a formulação desenvolvida foi impregnada em fibras de algodão natural ou fibra sintética (poliamida, obtida com ϵ -caprolactama ou hexametilenodiamina e ácido adípico) largamente empregadas na fabricação de meias de compressão elástica (Figura 5) (53 - 55). A densidade relativa das formulações foi determinada para calcular a quantidade de nanocápsulas borrifadas nos tecidos. Os tecidos foram pesados antes e depois da aplicação das formulações (três vezes). Os valores das densidades da NC-HT e da HT livre foram de 1,03 e 0,93 mg/mL, respectivamente.

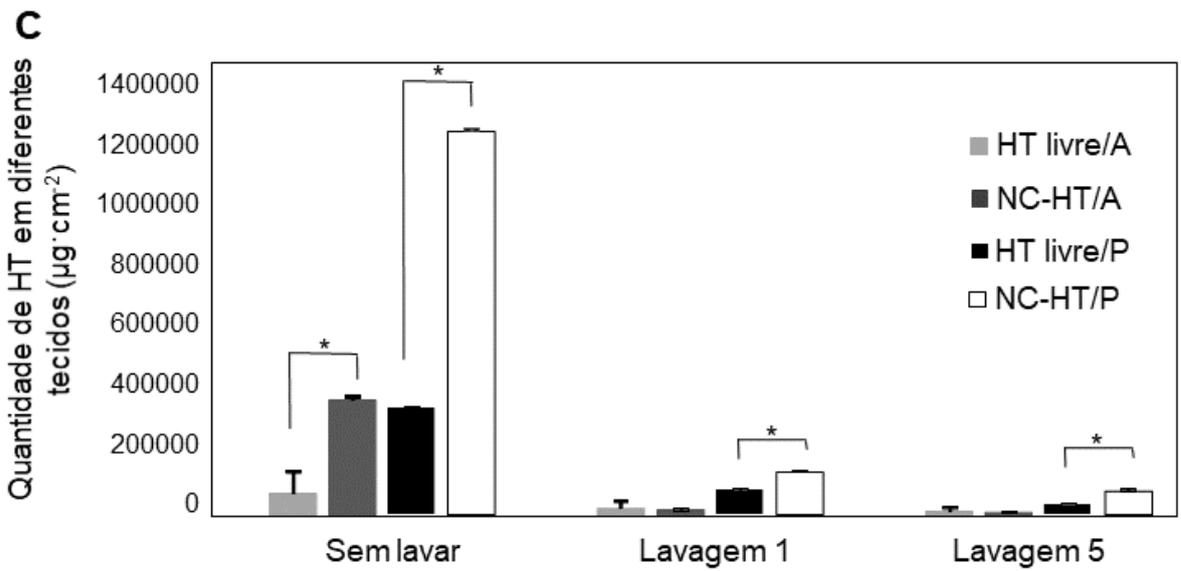
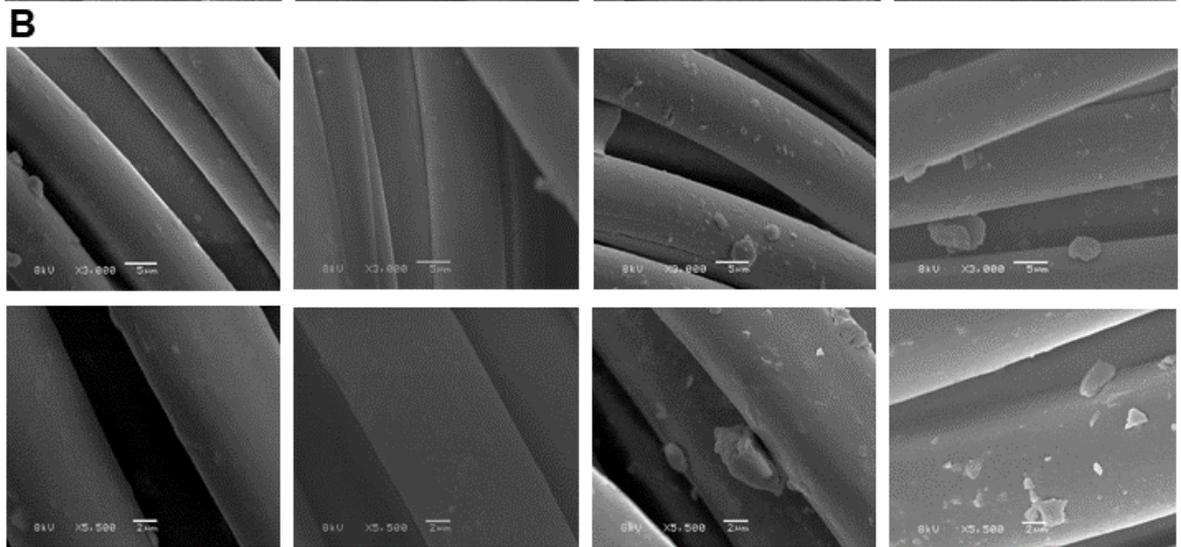
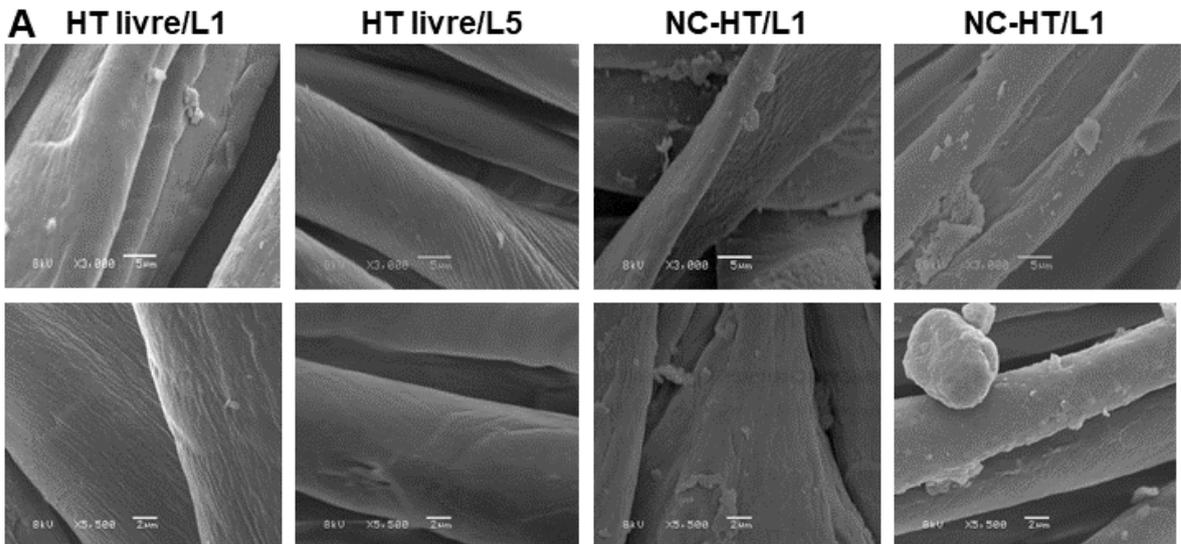
Figura 5: Imagens obtidas por Microscopia eletrônica de varredura de hesperetina nanoencapsulada (NC-Hst) e solução hidroalcoólica (HT livre) impregnada em fibra de algodão (A) e poliamida (P) em diferentes aumentos (3000x e 5500x).



No que se refere ao teor de fármaco nos tecidos após impregnação, foi possível observar que a fibra de algodão apresentou menos fármaco livre (Figura 6A) ($93.033,91 \pm 2.684,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e nanoencapsulado ($387.633,40 \pm 8.331,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) quando comparado com a fibra de poliamida (Figura 6B) (HT livre: $358.577 \pm 1.686,82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e NC-HT: $1.281.281 \pm 5.074,31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). O melhor

perfil de impregnação das amostras em fibras de poliamida (Figura 6C), especialmente em relação as nanocápsulas, pode ser explicado porque os polímeros têm a característica de se unirem através de forças intermoleculares mais fracas, como forças de *van der Waals*, ligação de hidrogênio ou interação dipolo-dipolo. Além disso, a interação polímero-polímero entre o tecido e os polímeros das nanocápsulas é bastante eficaz (54). Isso significa que uma interação entre os dois polímeros é suficiente para produzir um alto nível de adesividade das formulações. Este tipo de interação é uma ligação de hidrogênio entre a poliamida doadora de H do grupo NH e o grupo receptor C = O presente na PCL.

Figura 6: Imagens e quantificação do teor de fármaco dos tecidos após lavagens. (A) Micrografias eletrônicas de varredura de hesperetina nanoencapsulada (NC-HT) e solução hidroalcoólica (HT livre) impregnada em fibras de algodão e (B) poliamida após 1 (L1) e 5 lavagens (L5). (C) Teor de hesperetina nos tecidos após lavagens (n=3; p<0,05).



Após uma e cinco lavagens, a poliamida apresentou 2,54 e 2,80 vezes mais NC-HT, respectivamente, que o algodão (Tabela 3). Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 6) corroboram com esses dados, mostrando um melhor perfil de impregnação em amostras de fibras de poliamida. Além disso, com uma ampliação de 30x (Figura 5), é possível observar a estrutura e disposição das fibras. As fibras de algodão são mais fechadas, enquanto as da poliamida são mais abertas com espaço para melhor impregnação. Além disso, nanocápsulas de tamanho micrométrico (Tabela 4) foram observadas na água em que o algodão foi lavado, em contradição ao que foi exposto durante a caracterização e as partículas impregnadas em poliamida (Tabela 2). Esse dado sugere que tais partículas aderem às fibras de algodão na forma de aglomerados (como mostrado nas imagens de MEV – Figura 6A), uma vez que não há espaço suficiente para a adesão individualizada, como é o caso da poliamida. O alto valor negativo do potencial zeta de NC-HT na poliamida pode ser atribuído à poliamida sozinha, pois ela tem um alto potencial zeta negativo, conforme mostrado por Espinosa-Jiménez (2001) (55). Após a lavagem dos tecidos, observou-se que as formulações foram mais adesivas na poliamida. Sendo assim, este tecido foi definido como a plataforma de escolha para veicular nanocápsulas de hesperetina na realização dos estudos subsequentes.

Tabela 4: Distribuição de tamanho de partícula obtida por espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta de NC-HT impregnadas em diferentes tecidos após lavagens com água.

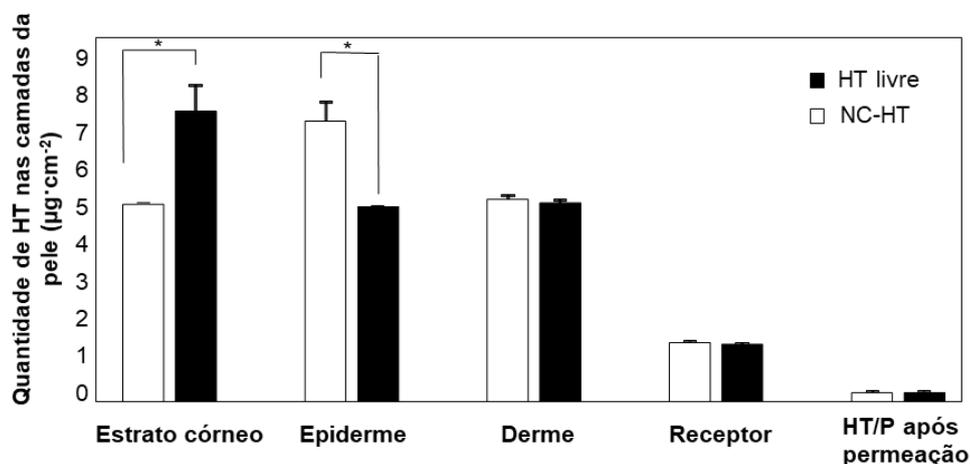
Amostra	Ø (nm)	PDI	ζ (mV)	D(4,3) (nm)	D(0,5) (nm)	Span
NC-HT/A	1.158	0,932	-3,66	473	360	2,36
NC-HT/P	863,40	0,824	-28,3	160	145	1,18

Nota: A: algodão; P: poliamida; ø: diâmetro das nanocápsulas; PDI: índice de polidispersividade; D (4,3): diâmetro das partículas; D (0,5): diâmetro de 50% das partículas com base no volume; Span: extensão da distribuição de tamanho.

O perfil de penetração/permeação (Figura 7) das nanocápsulas impregnadas em poliamida através da pele de orelha suína mostrou que as partículas foram capazes de conduzir o fármaco do tecido para a pele. Onde

penetrou e foi quantificado na derme sem diferença significativa nesta camada, assim como no meio receptor (etanol a 50%). As nanocápsulas e a hesperetina livre foram capazes de deixar o tecido e permear as camadas da pele com uma diferença significativa apenas no estrato córneo e epiderme. Por se tratar de um sistema de liberação controlada, os elevados níveis de formulação na epiderme sugerem que as NC-HT penetraram/permearam nas camadas da pele em função da sua cinética de liberação. Ademais, a presença de nanocápsulas em diferentes camadas da pele, podem ser interessantes para o tratamento de lesões tóxicas, como úlceras venosas, a depender do nível e extensão de comprometimento da lesão. É importante notar que após 24 horas houve uma quantidade quase idêntica de NC-HT e HT livre nas fibras de poliamida ($0,25 \pm 0,01$ e $0,24 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente) indicando que praticamente toda a formulação foi liberada do tecido para a pele, onde atingiu as camadas mais profundas obedecendo o seu mecanismo de liberação controlada. Radu et al (2016) salientaram que os principais fatores que contribuem para a liberação de fármacos de fibras têxteis para a pele são sudorese, fricção e enzimas cutâneas (28). Diante do exposto, a poliamida é uma boa plataforma para veicular nanocápsulas contendo hesperetina, sendo portanto promissora no tratamento de doenças venosas, devido a sua segurança, potencial não irritante e atividade vasoprotetora do fármaco.

Figura 7: Perfil de penetração/permeação cutânea de hesperetina nanoencapsulada (NC-HT) e fármaco livre (HT livre) impregnados em fibras têxteis de poliamida (P). *p <0,05; n=6.



3.4. CONCLUSÃO

Em conclusão, as nanocápsulas de núcleo lipídico foram formuladas com sucesso, mostrando características adequadas de tamanho e distribuição. Além disso, essas formulações apresentaram liberação controlada através de um modelo de liberação por difusão de *Fick*. A adesão das nanocápsulas aos tecidos após as lavagens foi considerada maior na poliamida em comparação com as fibras de algodão. Esta por sua vez, foi capaz de veicular as nanocápsulas do tecido para as camadas mais profundas da pele, onde exercerá efeito local, sem irritação nem dano celular, demonstrando a segurança da formulação. Estes dados apóiam futuros ensaios clínicos que avaliem o efeito de meias compressivas impregnadas com nanocápsulas de hesperetina para o tratamento de manifestações clínicas da doença venosa.

REFERÊNCIAS

1. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life sciences*. 2015;124:64-74.
2. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy research : PTR*. 2015;29(3):323-31.
3. Adelli GR, Hingorani T, Punyamurthula N, Balguri SP, Majumdar S. Evaluation of topical hesperetin matrix film for back-of-the-eye delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;92(0):74-82.
4. Gimenez-Bastida JA, Gonzalez-Sarrias A, Vallejo F, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Hesperetin and its sulfate and glucuronide metabolites inhibit TNF-[small alpha] induced human aortic endothelial cell migration and decrease plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels. *Food & Function*. 2016;7(1):118-26.
5. Liu Y, Niu L, Cui L, Hou X, Li J, Zhang X, et al. Hesperetin inhibits rat coronary constriction by inhibiting Ca²⁺ influx and enhancing voltage-gated K⁺ channel currents of the myocytes. *European journal of pharmacology*. 2014;735:193-201.
6. Jin Y-R, Han X-H, Zhang Y-H, Lee J-J, Lim Y, Chung J-H, et al. Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC- γ 2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity. *Atherosclerosis*. 194(1):144-52.
7. Arya A, Khandelwal K, Ahmad H, Laxman TS, Sharma K, Mittapelly N, et al. Co-delivery of hesperetin enhanced bicalutamide induced apoptosis by

exploiting mitochondrial membrane potential via polymeric nanoparticles in a PC-3 cell line. *RSC Advances*. 2016;6(7):5925-35.

8. Menezes PP, Serafini MR, Santana BV, Nunes RS, L.J. QJ, G.F. S, et al. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochim Acta*. 2012;548:45– 50

9. Menezes PP, Serafini MR, Quintans-Júnior LJ, Silva GF, Oliveira JF, Carvalho FMS, et al. Inclusion complex of (-)-linalool and β -cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim*. 2014;115:2429–37.

10. Menezes Pdos P, Araujo AA, Doria GA, Quintans-Junior LJ, de Oliveira MG, dos Santos MR, et al. Physicochemical characterization and analgesic effect of inclusion complexes of essential oil from *Hyptis pectinata* L. Poit leaves with beta-cyclodextrin. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2015;16(5):440-50.

11. Yang L-J, Xia S, Ma S-X, Zhou S-Y, Zhao X-Q, Wang S-H, et al. Host-guest system of hesperetin and β -cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;59:1016-24.

12. Frank LA, Contri RV, Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2015;7(5):623-39.

13. Mathes C, Melero A, Conrad P, Vogt T, Rigo L, Selzer D, et al. Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. *Journal of Controlled Release*. 2016;223:207-14.

14. Bulcao RP, de Freitas FA, Dallegrave E, Venturini CG, Baierle M, Durgante J, et al. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2014;86(2):167-77.

15. Al Shaal L, Mishra PR, Muller RH, Keck CM. Nanosuspensions of hesperetin: preparation and characterization. *Die Pharmazie*. 2014;69(3):173-82.

16. Bitencourt PER, Ferreira LM, Cargnelutti LO, Denardi L, Boligon A, Fleck M, et al. A new biodegradable polymeric nanoparticle formulation containing *Syzygium cumini*: Phytochemical profile, antioxidant and antifungal activity and in vivo toxicity. *Industrial Crops and Products*. 2016;83:400-7.

17. WHO. Adherence to long-term therapies: evidences for action. Geneve2003.

18. Contri RV, Katzer T, Ourique AF, da Silva ALM, Beck RCR, Pohlmann AR, et al. Combined Effect of Polymeric Nanocapsules and Chitosan Hydrogel on the Increase of Capsaicinoids Adhesion to the Skin Surface. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2014;10(5):820-30.

19. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LdL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*. 2003;26:726-37.

20. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;385(1–2):113-42.

21. Venturini CG, Bruinsmann FA, Contri RV, Fonseca FN, Frank LA, D'Amore CM, et al. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;79:36-43.

22. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*. 2007;2(DTI-2-Guterres-et-al):147-57.
23. Fathi M, Varshosaz J. Novel hesperetin loaded nanocarriers for food fortification: Production and characterization. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(3):1382-91.
24. Shete G, Pawar YB, Thanki K, Jain S, Bansal AK. Oral bioavailability and pharmacodynamic activity of hesperetin nanocrystals generated using a novel bottom-up technology. *Molecular pharmaceutics*. 2015;12(4):1158-70.
25. Cravotto G, Beltramo L, Sapino S, Binello A, Carlotti ME. A new cyclodextrin-grafted viscose loaded with aescin formulations for a cosmeo-textile approach to chronic venous insufficiency. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2011;22(10):2387-95.
26. Nichifor M, Constantin M, Mocanu G, Fundueanu G, Branisteanu D, Costuleanu M, et al. New multifunctional textile biomaterials for the treatment of leg venous insufficiency. *J Mater Sci: Mater Med*. 2009;20(4):975-82.
27. Yuan Gao, Cranston R. Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles. *Textile Research Journal*. 2008;78(1):60-72.
28. Radu C-D, Parteni O, Ochiuz L. Applications of cyclodextrins in medical textiles — review. *Journal of Controlled Release*. 2016;224:146-57.
29. Jornada DS, Fiel LA, Bueno K, Gerent JF, Petzhold CL, Beck RCR, et al. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. *Soft Matter*. 2012;8(24):6646-55.
30. Frank LA, Chaves PS, D'Amore CM, Contri RV, Frank AG, Beck RCR, et al. The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: Increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;114:202-12.
31. Li M, Lin XF, Lu J, Zhou BR, Luo D. Hesperidin ameliorates UV radiation-induced skin damage by abrogation of oxidative stress and inflammatory in HaCaT cells. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2016;165:240-5.
32. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1985;23(2):287-91.
33. Sahle FF, Wohlrab J, Neubert RH. Controlled penetration of ceramides into and across the stratum corneum using various types of microemulsions and formulation associated toxicity studies. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2014;86(2):244-50.
34. Serafini MR, Detoni CB, Guterres SS, da Silva GF, de Souza Araujo AA. Determination of in vitro usnic acid delivery into porcine skin using a HPLC method. *Journal of chromatographic science*. 2015;53(5):757-60.
35. Forgearini JC, Michalowski CB, Assumpção E, Pohlmann AR, Guterres SS. Development of an Insect Repellent Spray for Textile Based on Permethrin-Loaded Lipid-Core Nanocapsules. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2016;16(2):1301-9.
36. Carreño F, Paese K, Silva CM, Guterres SS, Dalla Costa T. Pre-clinical investigation of the modulation of quetiapine plasma pharmacokinetics and

tissues biodistribution by lipid-core nanocapsules. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016;119:152-8.

37. Pereira RL, Leites FI, Paese K, Sponchiado RM, Michalowski CB, Guterres SS, et al. Hydrogel containing adapalene- and dapson-loaded lipid-core nanocapsules for cutaneous application: development, characterization, in vitro irritation and permeation studies. *Drug development and industrial pharmacy*. 2016:1-8.

38. Benvegna DM, Barcelos RC, Boufleur N, Pase CS, Reckziegel P, Flores FC, et al. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules decrease its adverse motor side effects and oxidative stress markers in rats. *Neurochemistry international*. 2012;61(5):623-31.

39. Raber AS, Mittal A, Schafer J, Bakowsky U, Reichrath J, Vogt T, et al. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014;179:25-32.

40. Oliveira CP, Venturini CG, Donida B, Poletto FS, Guterres SS, Pohlmann AR. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter*. 2013;9(4):1141-50.

41. Friedrich RB, Coradini K, Fonseca FN, Guterres SS, Beck RC, Pohlmann AR. Lipid-Core Nanocapsules Improved Antiedematogenic Activity of Tacrolimus in Adjuvant-Induced Arthritis Model. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2016;16(2):1265-74.

42. Ribeiro RF, Motta MH, Härter APG, Flores FC, Beck RCR, Schaffazick SR, et al. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;59:875-84.

43. Stella B, Arpicco S, Rocco F, Marsaud V, Renoir J-M, Cattel L, et al. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;344(1-2):71-7.

44. Panek J, Filippov SK, Konak C, Nallet F, Noirez L, Karlsson G, et al. Polymeric Nanoparticles Stabilized by Surfactants Investigated by Light Scattering, Small-Angle Neutron Scattering, and Cryo-TEM Methods. *Journal of Dispersion Science & Technology*. 2011;32(6):888-97.

45. Siepmann J, Siepmann F. Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;364(2):328-43.

46. Batheja P, Sheihet L, Kohn J, Singer AJ, Michniak-Kohn B. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. *Journal of Controlled Release*. 2011;149(2):159-67.

47. Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M, Niopas I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European journal of clinical nutrition*. 2007;61(4):472-7.

48. Maiti K, Mukherjee K, Murugan V, Saha BP, Mukherjee PK. Exploring the Effect of Hesperetin–HSPC Complex—A Novel Drug Delivery System on the In Vitro Release, Therapeutic Efficacy and Pharmacokinetics. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(3):943.

49. Mallipeddi R, Rohan LC. Nanoparticle-based vaginal drug delivery systems for HIV prevention. *Expert opinion on drug delivery*. 2010;7(1):37-48.

50. Frank LA, Sandri G, D'Autilia F, Contri RV, Bonferoni MC, Caramella C, et al. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:3151-61.
51. Fiel LA, Rebelo LM, de Melo Santiago T, Adorne MD, Guterres SS, Soares de Sousa J, et al. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. *Soft Matter*. 2011;7(16):7240-7.
52. Küchler S, Abdel-Mottaleb M, Lamprecht A, Radowski MR, Haag R, Schäfer-Korting M. Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;377(1–2):169-72.
53. Qin Y. 2 - An overview of medical textile products. *Medical Textile Materials: Woodhead Publishing*; 2016. p. 13-22.
54. Qin Y. 3 - A brief description of textile fibers. *Medical Textile Materials: Woodhead Publishing*; 2016. p. 23-42.
55. Espinosa-Jiménez M, Ortega AO, Weigand RP. Análisis electrocinético y termodinámico del proceso de adsorción de azul ácido 45 sobre tejido de poliamida. *BOLETÍN INTEXTER (UPC)* 2001:37-41.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DO USO DE MEIAS COMPRESSIVAS IMPREGNADAS COM NANOCÁPSULAS DE HESPERETINA NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS VENOSAS: UM RELATO DE CASO

As avaliações apresentadas neste capítulo foram realizados no Ambulatório de Cirurgia Vascular do Hospital Universitário da UFS, sob supervisão da médica cirurgiã-vascular Dra. Cristiane Vilaça Campos Gomes, através de financiamento oriundo do edital MCTI/CNPq Nº01/2016 - Faixa B e apoio da Sigvaris-Brasil e Fármacos Farmácia com Manipulação.

O artigo oriundo deste capítulo foi submetido ao Periódico Angiology (FI: 3.02)

Apresentação

A insuficiência venosa crônica (IVC) é uma doença altamente prevalente que afeta milhões de indivíduos. As manifestações clínicas seguem a classificação CEAP e consistem em veias varicosas, edema, eczema, lipodermatoesclerose ou ulceração venosa. Diferentes alternativas terapêuticas têm sido discutidas, mas clinicamente as meias compressivas ainda são o padrão ouro para o tratamento da doença. Além disso, medicamentos orais venoativos do grupo dos flavonóides tem sido prescritas para aliviar os sintomas clínicos da doença. Nesta perspectiva, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um método seguro e eficiente para impregnar nanocápsulas à base de hesperetina (capítulo 3 desta tese) em fibras têxteis usadas na fabricação de meia de compressão. Este biomaterial é capaz de controlar a liberação do fármaco e promover sua permeação até camadas internas da pele, sendo resistente a várias lavagens. Para investigar clinicamente seu potencial cicatrizante em úlceras venosas, realizamos um ensaio piloto sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe-Brasil: CAAE - 1428318.7.0000.5546 e consentimento do paciente. Que utilizou o biomaterial durante seis meses e após três meses de tratamento, as úlceras iniciaram o processo de cicatrização, melhorando sua qualidade de vida. Este trabalho contribui para futuras investigações clínicas com um maior número de pacientes em estudos multicêntricos com úlceras venosas para evidenciar ainda mais a potencialidade desta nova tecnologia.

4.1. INTRODUÇÃO

A insuficiência venosa crônica (IVC) é uma condição clínica debilitante e altamente prevalente que afeta milhões de indivíduos principalmente nos países ocidentais (1, 2). Essa doença é atribuída a vários fatores como predisposição genética e desequilíbrio da síntese de proteínas (colágeno tipo I e tipo III), causada por metaloproteinases de matriz (MMPs), levando a um remodelamento anormal e distensibilidade das veias associado à redução da elasticidade (3). Além disso, o receptor VEGFR-2, responsável pela manutenção da viabilidade endotelial, também é degradado pelas MMPs, conduzindo a um estado de morte celular, que associada com a degradação da matriz extracelular, leva ao desenvolvimento da IVC (4).

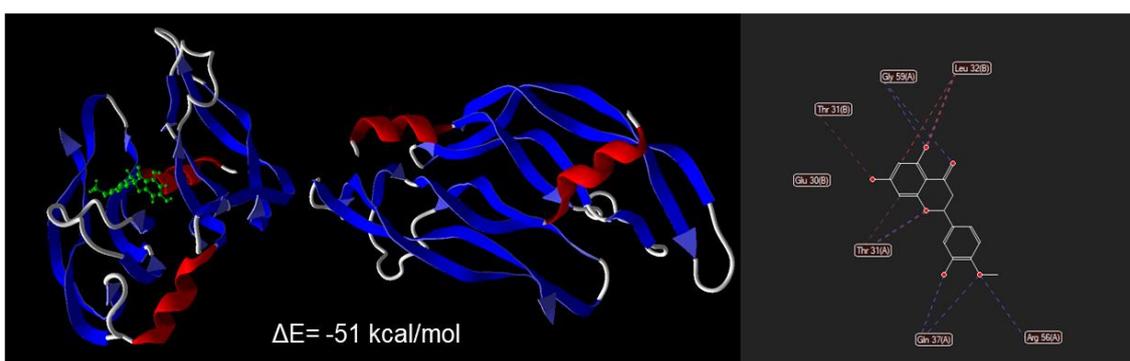
Assim, a doença manifesta-se com uma variedade de sinais e sintomas causados pela incompetência valvular ou refluxo, advindos da hipertensão venosa (5). A IVC pode resultar em varizes, edema, eczema, lipodermatoesclerose ou ulceração venosa, a mais avançada manifestação clínica da doença, que está fortemente associada ao refluxo (6). A maioria das internações hospitalares nos Estados Unidos é devido a úlceras venosas, ocorrendo em aproximadamente 20.550 pacientes a cada ano, o que gera um custo de tratamento de US\$ 3 bilhões/ano (7). O tratamento clínico de primeira escolha da IVC é reconhecido mundialmente como meia de compressão composta por pressões externas iniciais de 20 a 30 mmHg (8). Digno de nota, estudos têm demonstrado o efeito positivo dos flavonóides (como a fração flavonóica purificada micronizada - associação de diosmina e hesperidina) no processo cicatricial de úlceras venosas (9). Entretanto, essas alternativas terapêuticas são reconhecidas pela baixa biodisponibilidade oral, associada à presença de efeitos colaterais, principalmente distúrbios gastrointestinais (10).

À luz dessas considerações, nosso grupo de pesquisa publicou recentemente um método novo e eficiente para impregnar nanocápsulas à base de hesperetina em fibras têxteis usadas na fabricação de meias de compressão (descrito no capítulo 3 desta tese). Nossos resultados demonstraram claramente a liberação controlada do fármaco com permeação/penetração subsequente dessas nanocápsulas do tecido para a derme, enquanto manteve as partículas remanescentes aderidas ao tecido durante sucessivas lavagens (11). Esta

tecnologia não foi relatada anteriormente e pode ser uma excelente plataforma para tratamento tópico, promissora no tratamento de úlceras venosas.

A hesperetina é um flavonóide derivado da hesperidina, um produto natural seguro e comercialmente disponível, com atividades antioxidante, antiinflamatória e vasoprotetora bem descritas na literatura (12). Em vista disso, a hesperetina é promissora na manutenção da saúde vascular, segura e não irritante, conforme demonstrado no capítulo 3 desta tese. Para entender o papel deste fármaco no processo de cicatrização de úlceras venosas, foram realizadas investigações de *docking* entre a hesperetina e o receptor VEGFR-2, envolvido na cascata patológica da IVC. O produto natural é teoricamente (-51 kcal / mol) capaz de atingir o receptor VEGFR-2, geralmente clivado pelas MMPs, na doença venosa, restaurando a viabilidade endotelial (4) (Figura 1). Esse mecanismo provavelmente está envolvido no processo de cicatrização das úlceras, uma vez que o fármaco interage com o receptor evitando sua degradação pelas MMPs.

Figura 1: Mecanismo teórico da ligação da hesperetina no receptor de membrana VEGFR-2. O flavonóide faz interações estéricas com THR 31 da cadeia A, e ambos, LEU 32 e THR 31 da cadeia B. Também foram realizadas ligações de hidrogênio entre GLY 59, THR 31, GLN 37 e ARG da cadeia A. Nota: Gly: Glicina; Leu: Leucina; Thr: treonina; Gln: glutamina; Arg: Arginina.



Fonte: Menezes, P.P. (2019)

Portanto, este estudo tem como objetivo apresentar o relato de caso de um paciente com úlceras de grande extensão, recidivas e não cicatrizadas. Os

desfechos dessa avaliação concentram-se na melhora da qualidade de vida do paciente, bem como obter uma melhor compreensão da eficácia dessa tecnologia no processo de cicatrização de úlceras venosas.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Desenho do estudo

O paciente (sexo masculino, 50 anos, IMC: 34,1, escolaridade: ensino médio completo) foi informado pelos pesquisadores sobre todos os procedimentos utilizados no estudo para que não ocorresse nenhuma dúvida e/ou qualquer tipo de constrangimento. Então, aceitou participar da pesquisa mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foi submetido às condutas médicas protocoladas pela unidade de serviço (Ambulatório de Cirurgia Vascular do Hospital Universitário - HU/UFS), e orientado a utilizar a meia (3/4, 20 – 30 mmHg) contendo nanocápsulas de hesperetina produzidas sob condições assépticas (descritas no capítulo 3 desta tese) após acordar. A meia foi indicada para ser utilizada durante todo o dia, podendo realizar suas atividades normais. As avaliações foram conduzidas respeitando o mascaramento triplo-cego do estudo. O paciente foi avaliado nos tempos zero (T0), três (T3) e após seis meses (T6) de tratamento. As avaliações consistiram em registro fotográfico, avaliação das características da pele na região perilesional, avaliação da qualidade de vida mediante respostas ao questionário *Aberdeen* e escala visual analógica para mensuração da dor, bem como ultrassom com *doppler*

4.2.2. Avaliação Macroscópica

O paciente foi avaliado macroscopicamente quanto a redução do edema, eritema e irritação cutânea. Nos tempos pré-determinados, foi realizado o registro fotográfico padronizado da área lesionada por uma câmera digital (*Nikon*[®] D3400), posicionada a aproximadamente 40 cm da região comprometida, perpendicularmente à sua superfície. Em seguida, as imagens digitalizadas no formato JPG foram analisadas quanto ao índice de retração da úlcera através do *software Image J*[®], que é um processador e analisador de imagens em Java de domínio público. A análise das imagens através do *software*

permitiu a quantificação da taxa de redução das áreas comprometidas. Para calcular o índice de retração da lesão, foi utilizada a equação 1, onde:

$$TC = \frac{T_0 - T_6}{T_0} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

TC: taxa de cicatrização; T0: início do estudo; T6: final do estudo.

4.2.3. Avaliação das características da área perilesional

Os índices de melanina, eritema e hidratação da pele foram mensurados na região dos membros inferiores do paciente nos tempos zero, três e seis meses. Para tal, foram utilizadas sondas não invasivas que captam sinais da superfície da pele e os enviam para o equipamento *Cutometer*® dual MPA 580 (*Courage e Khazaka*, Colônia, Alemanha), onde são processados os dados. Antes das medidas, o paciente ficou em repouso para aclimatação por um período de 30 min em ambiente com temperatura e umidade controladas (temperatura: 20-22 °C; umidade: 45-55%) no Ambulatório de Cirurgia Vascular do HU/UFS.

A pigmentação da pele foi determinada em função da melanina e hemoglobina (eritema) com uma sonda *Mexameter* MX® através do princípio de absorção de luz em diferentes comprimentos de onda. O resultado das medições foi mostrado em duas janelas distintas na tela do monitor: “E” para os valores de eritema e “M” para os valores da melanina. O nível de hidratação da pele foi analisado através da sonda *Sebumeter*® SM 815.

4.2.4. Avaliação da Qualidade de Vida

O Questionário Aberdeen para Veias Varicosas (AVVQ) é um instrumento validado transculturalmente para a realidade brasileira em uma amostra de 107 pacientes com doença venosa crônica por Leal et al (2012) (13). O AVVQ possui quatro domínios: dor e disfunção, aparência estética, extensão da varicosidade e complicações, sendo composto por 13 questões e tempo de aplicação estimado em aproximadamente 5 minutos. A primeira questão consiste em um diagrama para representação, por desenho, do local de percepção das varizes

em cada membro acometido. As demais questões envolvem perguntas objetivas acerca de dor e impacto social dos sintomas da doença.

4.2.5. Escala Visual Analógica (EVA)

A EVA foi desenvolvida para mensurar e expressar a percepção da dor, podendo ser representada em valores numéricos de 0 a 10, sendo 0 para nenhuma dor e 10 para pior dor possível. O paciente foi avaliado quanto a esta escala nos tempos T0, T3 e T6 (14).

4.2.6. Ultrassom com *Doppler*

O estudo avaliou os diâmetros venosos da veia safena magna nas regiões da junção safeno-femoral, proximal, joelho e distal de ambas as pernas. O exame foi realizado em modo-B com análise espectral pelo *Doppler*, conforme preconizado nas Diretrizes da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vasculare – SBACV (15). Para tal, foram utilizados transdutores lineares de 5 a 7,5 MHz para avaliar o membro inferior até o ligamento inguinal, e um curvo de 2 a 3,5 MHz para avaliar os vasos ilíacos e a cava inferior. O exame foi iniciado com o paciente em posição supina onde foi testada inicialmente a perviedade e a seguir as manobras de refluxo com valsalva e compressões proximais.

4.2.7. Aspectos Éticos

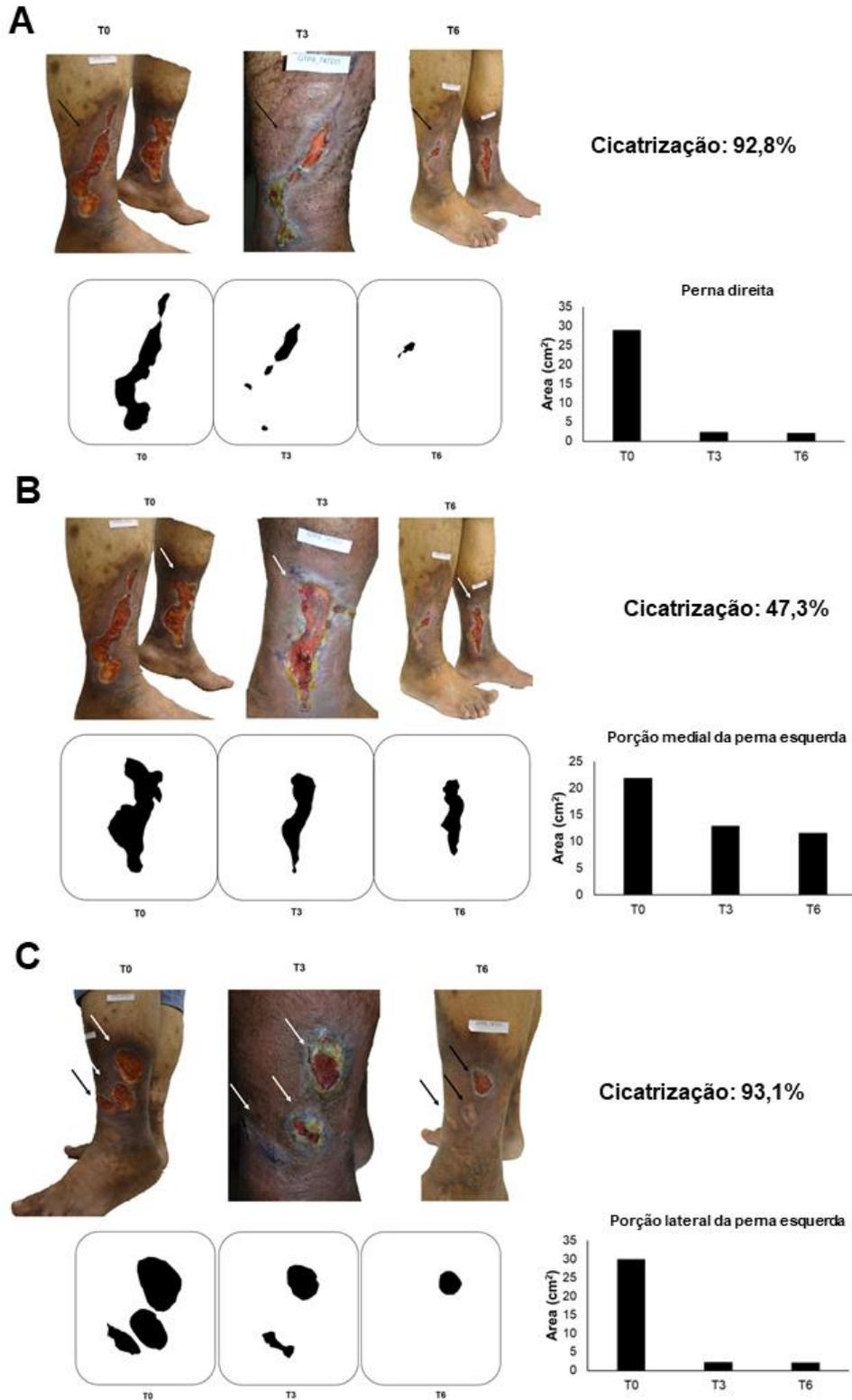
Este estudo respeitou os princípios éticos previstos nos termos da Resolução 466/12 (16), versão 2012, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde sobre pesquisas envolvendo seres humanos, bem como as normas e resoluções advindas do Grupo Mercado Comum (GMC) N°129/96 (17), obedecendo à Lei 6.360 (23 de setembro de 1976) (18), em especial o Art. 76, regulamentada pelo Decreto N° 79.094 (05 de janeiro de 1977) (19). Também foram respeitadas as boas práticas de pesquisa, assim como a regulamentação para a realização de pesquisa clínica, legislada pela ANVISA, em 20 de fevereiro de 2015 (20). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) (CAAE: 91428318.7.0000.5546). Além disso foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) sob número de registro: RBR-5n9cmf e número universal de ensaios clínicos (UTN): U1111-1217-7510.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante da interação da hesperetina com o receptor envolvido na patogênese da doença, decidimos investigar a resposta clínica desse flavonóide em um paciente com úlceras venosas de grandes extensões. Paciente EGJ (GTP8_747231), homem, 50 anos, com úlceras venosas simétricas não cicatrizadas em ambas as pernas, desde 2014. O paciente fora tratado com bota de Unna, *Melilotus officinalis* L. e benzilpenicilina benzatina seis meses antes do início da nova terapia descrita neste estudo, sem nenhum sucesso. A presente investigação teve abordagem quantitativa e qualitativa com vistas a obter uma melhor compreensão sobre a melhora da cicatrização de úlceras venosas, bem como a qualidade de vida do paciente durante o tratamento. Clinicamente, três objetivos devem ser alcançados para obter sucesso no tratamento de úlceras venosas. Estes incluem cicatrização da lesão, melhora na qualidade de vida do paciente e redução da hipertensão venosa, eventos que estão diretamente relacionados entre si.

Diante disto, acompanhamos o paciente durante seis meses e observamos uma potencialização no processo cicatricial das úlceras durante o uso da meia compressiva impregnada com hesperetina. Macroscopicamente, podemos observar que o processo de cicatrização teve início após três meses, com grande porcentagem (92,8%, 93,1% e 47,3%) de retração da área da lesão no final do estudo (Figura 2). Inferimos ainda, que a associação do fator compressão, com as atividades venoativas da hesperetina, parecem ser eficientes para cicatrizar totalmente lesões de pequena extensão e profundidade (Figura 2C). Em contraste, lesões profundas e maiores, necessitam de um tempo maior que seis meses, para obtenção do sucesso no desfecho clínico avaliado (Figura 2A e B).

Figura 2: Visão macroscópica do processo de cicatrização e quantificação da retração da lesão. (A) perna direita, (B) porção medial da perna esquerda, (C) porção lateral da perna esquerda nos tempos 0 (T0), após três meses (T3) e após seis meses (T6).

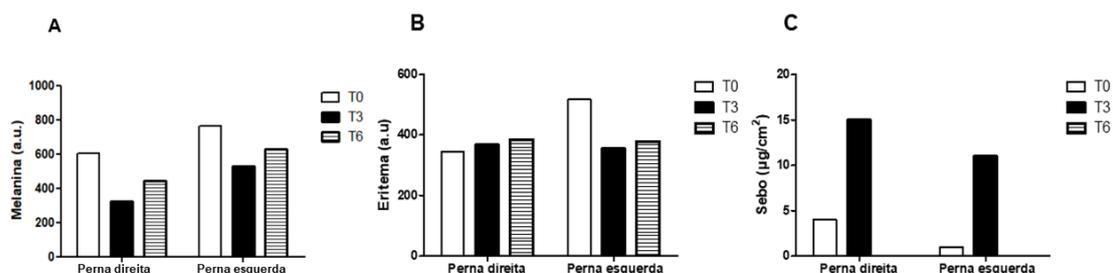


As condições da pele nas áreas perilesionais, como hiperpigmentação, desidratação e eritema (Figuras 2 e 3), estão associadas à cronicidade da doença e à não cicatrização (21). A pigmentação da pele muda durante o curso da IVC, tornando-se grave à medida que a doença avança. No entanto, esse mecanismo não está completamente elucidado. De fato, a anormalidade do metabolismo da melanina (dérmica e epidérmica) desempenha um papel importante na discromia da pele (22). Em nosso estudo, observamos uma redução (Figura 3A) da detecção de melanina nos primeiros três meses de tratamento associado ao processo de cicatrização das úlceras, principalmente na perna direita, que apresentava menos lesões. Em geral, as úlceras venosas tardias e não cicatrizadas têm um alto grau de eritema ou vermelhidão e importante desidratação devido à inflamação e infecção associadas. Observamos, então, redução do eritema (Tabela 1 e Figura 3B) e aumento dos escores de sebo (Tabela 1 e Figura 3C). Estes dados apontam eficácia da terapêutica utilizada tanto na cicatrização de úlceras, bem como no clareamento da pele, necessário em pacientes que apresentam CEAP a partir de 4. Tsai et al (2010) avaliaram a eficácia de uma microemulsão contendo hesperetina e relataram que o fármaco poderia ser usado como um agente clareador eficaz, devido às suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (23). Juntos, esses resultados sugerem, respectivamente, uma melhor perfusão e restauração da função de barreira cutânea, o que corrobora com o progresso da cicatrização das úlceras (Figura 2) (24).

Tabela 1: Parâmetros da pele na área perilesional de úlceras venosas, avaliados pelas sondas *Mexameter*® MX 18, *Tewameter*® TM 300 e *Sebumeter*® SM 815 nos tempos 0, após três meses, e após seis meses.

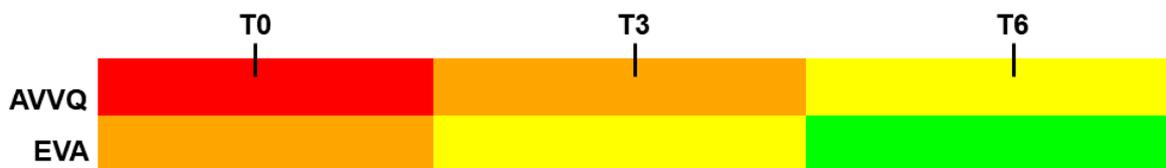
Tempo (meses)	Perna Direita			Perna esquerda		
	Melanina (a.u.)	Eritema (a.u.)	Sebo (µg/cm ²)	Melanina (a.u.)	Eritema (a.u.)	Sebo (µg/cm ²)
0	608	345	4	768	517	1
3	324	367	15	529 ^a	354	11
6	448	385	0	629	379	0

Figura 3: Parâmetros da pele na área perilesional de úlceras venosas, avaliados pelas sondas *Mexameter*® MX 18 (A e B) e *Sebumeter*® SM 815 (C). As medidas foram realizadas diretamente após a remoção do curativo e limpeza da úlcera. Todas as medidas foram realizadas em condições ambiente padronizadas (25°C, 55% umidade), e três leituras consecutivas foram realizadas no mesmo local nos tempos 0 (T0), após três meses (T3) e após seis meses (T6).



Relatos recentes têm demonstrado o impacto negativo na qualidade de vida de pacientes com úlceras venosas (25, 26). Essa variável tem um impacto pessoal notável, principalmente devido à dor intensa, sono comprometido, dificuldade de deambulação e prejuízo nas atividades sociais e laborais (25). O questionário Aberdeen (AVVQ) é um instrumento padronizado e genérico para a avaliação da qualidade de vida relacionada com a doença venosa. Este instrumento é uma medida específica de avaliação da percepção do paciente quanto a qualidade de vida e gravidade da doença, sensível a aspectos inerentes à mesma, focalizando seus sinais e sintomas, e avaliando dimensões importantes comprometidas da qualidade de vida. Teve suas propriedades clinimétricas constatadas como boas, em seu país de origem, sendo utilizado em vários estudos (27). O AVVQ foi validado no Brasil e tem sido utilizado como um importante instrumento para mensurar os desfechos relacionados ao paciente, especificamente para intervenções de IVC (13). É pontuado de 0 a 100, onde 0 significa a melhor qualidade de vida e 100 a condição mais grave, na percepção do paciente (28). Como pode ser observado na Figura 4, tanto o AVVQ quanto o EVA, instrumento amplamente utilizado para medir a intensidade da dor (escala de dor de 0 a 10) (29), concordam com os resultados supracitados. O paciente-caso relatou melhora na sua qualidade de vida (escore AVVQ: 91,6 - 31,2) diretamente associada à diminuição da dor (escore EVA: 7 - 0) resultante da cicatrização das úlceras (30).

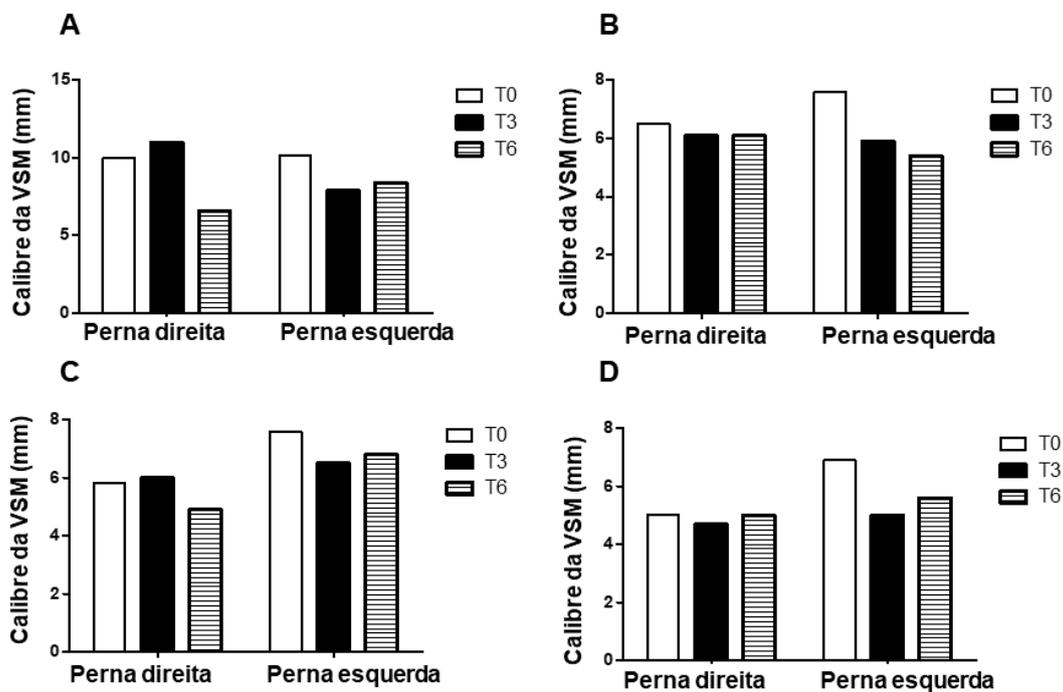
Figura 4: Mapa de calor apresentando os escores do Questionário de Varizes de Aberdeen (AVVQ) - percepção da qualidade de vida - e da Escala Visual Analógica (EVA), respectivamente, ambos da perspectiva do paciente, nos tempos 0 (T0), após três meses (T3) e após seis meses (T6) de avaliação.



Nota: Vermelho: grave; Laranja: moderada; Amarelo: suave; Verde: nenhum

A ultrassonografia com *Doppler* venoso é a modalidade de diagnóstico padrão-ouro para avaliação e monitoramento da resposta após terapia da doença venosa (31). O diâmetro venoso dos diferentes segmentos da veia safena magna (VSM) observado em nosso estudo foi linearmente reduzido (Figura 5) durante o processo de cicatrização, sem diferença estatística entre os momentos avaliados. Segundo relatos anteriores, o limite normal do calibre da VSM é de 4 mm (32,33). Nesse sentido, esse valor pode estar sugerindo um possível benefício do uso associado de meias compressivas e nanocápsulas de hesperetina, devido a atividade hipotensora do flavonóide. O refluxo venoso nos membros inferiores é uma manifestação de um processo degenerativo na parede venosa (32, 34). Nossos achados ressaltam o refluxo na porção distal em ambas as pernas e se mantiveram até o terceiro mês de tratamento, principalmente na perna esquerda, mais comprometida.

Figura 5: Redução do diâmetro da veia safena magna (VSM) nas porções da crossa (A), (B) terço médio de coxa, (C) joelho e (D) terço médio de perna, observado durante o período de cicatrização.



Nota: T0: início do estudo; T3: avaliação após três meses; T6: avaliação após seis meses.

Em conjunto, esses dados nos fornecem indícios de potencialização da cicatrização das úlceras, melhora na qualidade de vida do paciente e redução da hipertensão venosa, achados clínicos que configuram sucesso no tratamento, em relação ao uso das terapias convencionais. Todavia, este estudo é limitado por um pequeno tamanho da amostra, o que pode enfraquecer o poder de conclusão.

4.4. CONCLUSÃO

Para o melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro relato de uma nova meia compressiva carregada com nanocápsulas de hesperetina que demonstrou sucesso como um adjuvante na cicatrização de úlceras venosas. Todos os parâmetros avaliados indicaram a influência positiva do uso de hesperetina associada à compressão na melhoria da qualidade de vida em decorrência da cicatrização. Desse modo, este trabalho contribui para futuras

investigações clínicas com um maior número de pacientes com úlceras venosas em estudos multicêntricos para evidenciar ainda mais a potencialidade desta nova tecnologia. Ademais, investigações adicionais são encorajadas a fim de elucidar biologicamente o mecanismo de ação das nanocápsulas contendo hesperetina na cicatrização de úlceras através do desenvolvimento de modelos que mostrem a expressão dos mediadores envolvidos neste processo.

REFERÊNCIAS

1. Raffetto JD. Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers. *The Surgical clinics of North America*. 2018;98(2):337-47.
2. Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Annals of epidemiology*. 2005;15(3):175-84.
3. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jullien ND, Lembrez N, Mestries-Dubois P, Fabiani JN, et al. Decreased production of collagen Type III in cultured smooth muscle cells from varicose vein patients is due to a degradation by MMPs: possible implication of MMP-3. *Journal of vascular research*. 2005;42(5):388-98.
4. Pocock ES, Alsaigh T, Mazor R, Schmid-Schönbein GW. Cellular and molecular basis of Venous insufficiency. *Vascular Cell*. 2014;6:24.
5. Garcia R, Labropoulos N. Duplex Ultrasound for the Diagnosis of Acute and Chronic Venous Diseases. *The Surgical clinics of North America*. 2018;98(2):201-18.
6. Darvall KA, Bate GR, Adam DJ, Bradbury AW. Generic health-related quality of life is significantly worse in varicose vein patients with lower limb symptoms independent of CEAP clinical grade. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2012;44(3):341-4.
7. McArdle M, Hernandez-Vila EA. Management of Chronic Venous Disease. *Texas Heart Institute Journal*. 2017;44(5):347-9.
8. Mallick R, Raju A, Campbell C, Carlton R, Wright D, Boswell K, et al. Treatment Patterns and Outcomes in Patients with Varicose Veins. *American health & drug benefits*. 2016;9(8):455-65.
9. Franks PJ, Barker J, Collier M, Gethin G, Haesler E, Jawien A, et al. Management of Patients With Venous Leg Ulcers: Challenges and Current Best Practice. *Journal of wound care*. 2016;25 Suppl 6:S1-s67.
10. Dukhanin AS, Vertkin AL. [Pleiotropic effects of phlebotropic drugs: from pharmacological advantages to adverse drug interaction]. *Angiologiiia i sosudistaia khirurgiia = Angiology and vascular surgery*. 2017;23(2):72-80.
11. Menezes PD, Frank LA, Lima BD, de Carvalho YM, Serafini MR, Quintans-Junior LJ, et al. Hesperetin-loaded lipid-core nanocapsules in polyamide: a new textile formulation for topical drug delivery. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:2069-79.
12. Testai L, Calderone V. Nutraceutical Value of Citrus Flavanones and Their Implications in Cardiovascular Disease. *Nutrients*. 2017;9(5):502.

13. Leal FdJ, Couto RC, Pitta GBB, Leite PTF, Costa LM, Higino WJF, et al. Tradução e adaptação cultural do Questionário Aberdeen para Veias Varicosas. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2012;11:34-42.
14. Aquino M, Paixão L, Leal F, Couto R. Análise dos efeitos dos exercícios aquáticos na qualidade de vida de indivíduos com doença venosa crônica. *J Vasc Bras*. 2016;15:27-33
15. Projeto Diretrizes SBACV. Insuficiência Venosa Crônica: Diagnóstico e Tratamento, (2015)
16. Ministério da Saúde. Resolução N° 466/2012 (2012).
17. Mercosul/GMC. Resolução N° 129/96. Regulamento Técnico sobre a verificacao de boas praticas de pesquisa clínica., (1996).
18. BRASIL. Lei N° 6.360/1976 (1976).
19. BRASIL. Decreto N° 79.094/1977 (1977)
20. Ministério da Saúde. Resolução N° 9/2015 (2015)
21. Koh JM, C; McKenzie, G and McGuiness, W. . The relationship between periwound skin condition and venous leg ulcer chronicity *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association* 2015;23:82-9.
22. Caggiati A, Rosi C, Franceschini M, Innocenzi D. The Nature of Skin Pigmentations in Chronic Venous Insufficiency: A Preliminary Report. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2008;35(1):111-8.
23. Tsai YH, Lee KF, Huang YB, Huang CT, Wu PC. In vitro permeation and in vivo whitening effect of topical hesperetin microemulsion delivery system. *International journal of pharmaceutics*. 2010;388(1-2):257-62.
24. Lee DH, Seo ES, Hong JT, Lee GT, You YK, Lee KK, et al. The efficacy and safety of a proposed herbal moisturising cream for dry skin and itch relief: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial--study protocol. *BMC complementary and alternative medicine*. 2013;13:330.
25. Jull A, Muchoney S, Parag V, Wadham A, Bullen C, Waters J. Impact of venous leg ulceration on health-related quality of life: A synthesis of data from randomized controlled trials compared to population norms. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2018.
26. Illescas-Montes R, Atkinson RA, Cullum N. Low-level light therapy for treating venous leg ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018(6).
27. Leal FJ, Couto RC, Pitta GBB. Validação no Brasil de Questionário de Qualidade de Vida na Doença Venosa Crônica (Questionário Aberdeen para Veias Varicosas no Brasil/AVVQ-Brasil). *J Vasc Bras*. 2015;14:241-7.
28. Staniszewska A, Tambyraja A, Afolabi E, Bachoo P, Brittenden J. The Aberdeen Varicose Vein Questionnaire, Patient Factors and Referral for Treatment. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2013;46(6):715-8.
29. Garratt AM, Macdonald LM, Ruta DA, Russell IT, Buckingham JK, Krukowski ZH. Towards measurement of outcome for patients with varicose veins. *Quality in Health Care*. 1993;2(1):5-10.
30. Hawker GA, Mian S, Kendzerska T, French M. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale

- (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). *Arthritis care & research*. 2011;63 Suppl 11:S240-52.
31. O'Meara S, Cullum N, Nelson EA, Dumville JC. Compression for venous leg ulcers. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;11:Cd000265.
 32. Cheung ME FM. Duplex Ultrasound [Internet]. IS, editor: Treasure Island (FL): StatPearls; 2018.
 33. Baliyan V, Tajmir S, Hedgire SS, Ganguli S, Prabhakar AM. Lower extremity venous reflux. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*. 2016;6(6):533-43.
 34. Gibson K, Meissner M, Wright D. Great saphenous vein diameter does not correlate with worsening quality of life scores in patients with great saphenous vein incompetence. *Journal of vascular surgery*. 2012;56(6):1634-41.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, podemos observar a versatilidade da nanotecnologia no que se refere ao desenvolvimento de plataformas para investigação de doenças, bem como alternativas terapêuticas. Com o rápido avanço no desenvolvimento de técnicas de fabricação em 3D e síntese de novos materiais, tais biomateriais funcionais projetados incorporando vários componentes do microambiente celular, podem ser utilizados para a regeneração de tecidos complexos e fabricação de modelos de doenças *in vitro*. Ademais, esses biomateriais podem ser úteis para além de compreender modelos patológicos, investigar a eficácia de tratamentos regenerativos baseados no uso de células tronco associadas com os precursores específicos para síntese de proteínas, como o mRNA. Apesar de todos os esforços realizados nas áreas de engenharia de tecidos e medicina regenerativa, associados com recursos nanotecnológicos, muito ainda há de se estudar a fim de biofabricar plataformas de investigação e tratamento específicas para doenças vasculares, o que ainda é o principal desafio nestas áreas. Por outro lado, o uso de biomateriais inteligentes capazes de liberar de forma controlada o princípio ativo para o tratamento local de doenças como úlceras venosas, tem avançado mais rapidamente, configurando um importante ganho para a terapia utilizada clinicamente. Dessa forma, os resultados apresentados nesta tese propõem tecnologias inovadoras e seguras para o tratamento de úlceras venosas contribuindo para o sucesso terapêutico, sem relatos de efeitos adversos associados. Além disso, o uso de meias compressivas impregnadas com flavonóide nanoencapsulado, contribuiu para desfechos clínicos desejados como melhora da qualidade de vida e cicatrização de úlceras associada com melhora na hipertensão venosa.

De forma complementar ao conteúdo desta tese, o presente material contém apêndices que apresentam artigos desenvolvidos paralelamente a execução desta obra, que tratam de dados complementares cujos resultados contribuíram para a compreensão dos demais capítulos aqui apresentados. Neste sentido, o artigo do Apêndice A consiste na publicação dos resultados gerados no capítulo 3, no *International Journal of Nanomedicine*, seguido do comprovante de depósito de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). O Apêndice B apresenta uma revisão crítica da literatura publicada no periódico *Tissue Engineering Part A*, acerca das aplicações de mRNA nos campos da engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Por sua

vez, o artigo do Apêndice C apresenta uma revisão sistemática referente à utilização de ciclodextrinas em sistemas nanoparticulados publicada no *International Journal of Pharmaceutics*. Este artigo contribuiu para a escolha do tipo de nanopartícula utilizada nas diferentes etapas desse estudo. A aprovação no Comitê de ética e Registro no ReBEC estão apresentados nos Apêndices D e E, respectivamente. Por fim, os Apêndices F a K compreendem os materiais utilizados durante a execução do capítulo 4.

LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Esta tese de doutorado apresenta limitações que abrem oportunidades para novas pesquisas. Primeiramente, a plataforma 3D desenvolvida para estudar a resposta de células tronco ao microambiente celular, poderia agregar além de diferentes propriedades mecânicas e geometrias, mediadores bioquímicos envolvidos na patogênese das manifestações clínicas da doença venosa. No sentido de prevenir os eventos ulcerativos e/ou regenerar as lesões existentes. Esta terapia poderia ainda, ser baseada em um hidrogel injetável carregado com mRNA específico para síntese de colágeno tipo III, sem que o organismo produzisse colágeno do tipo I como um mecanismo de compensação, restabelecendo a função das válvulas bicúspides do endotélio vascular. Outro ponto de fragilidade que contribui para a concepção de novos estudos, é a impregnação das nanocápsulas contendo hesperetina durante o processo industrial de fiação das meias compressivas, ou impregnação por imersão, ou ainda, revestir as nanocápsulas com quitosana, na perspectiva de garantir maior adesividade das nanocápsulas de modo a suportar ainda mais lavagens do tecido. Ademais, novos ensaios clínicos randomizados multicêntricos envolvendo uma ampla amostra de pacientes com úlceras venosas, é incentivada no sentido de consolidar ainda mais os achados clínicos desta tese. Arelado a isso, estudos de farmacocinética utilizando sangue coletado diretamente da veia safena, podem contribuir para a compreensão da ação tópica da hesperetina no endotélio vascular. Outros estudos que visem determinar o mecanismo de ação específico da hesperetina na cicatrização de úlceras venosas também são encorajados.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Hesperetin-loaded lipid-core nanocapsules in polyamide: a new textile formulation for topical drug delivery

Hesperetin-loaded lipid-core nanocapsules in polyamide: a new textile formulation for topical drug delivery

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Nanomedicine
15 March 2017
[Number of times this article has been viewed](#)

Paula dos Passos Menezes¹
Luiza Abrahão Frank²
Bruno dos Santos Lima¹
Yasmim Maria Barbosa
Gomes de Carvalho¹
Mairim Russo Serafini¹
Lucindo José
Quintans-Júnior³
Adriana Raffin Pohlmann⁴
Sílvia Stanisçuaski
Guterres²
Adriano Antunes de
Souza Araújo¹

¹Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil; ²College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ³Department of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil; ⁴Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract: Chronic venous insufficiency is characterized by chronic reflux disorder of blood from the peripheral to the central vein, with subsequent venous hypertension and resulting changes in the skin. Traditionally, nonsurgical treatments relied on the use of compression therapy, and more recently a variety of flavonoids have been shown to have positive effects. There have also been developments of more effective drug delivery systems using various textiles and nanotechnology to provide new therapeutic options. Our objective was to use nanotechnology to develop a new formulation containing hesperetin (Hst), a substance not previously used in the treatment of chronic venous insufficiency, impregnated into textile fibers as a possible alternative treatment of venous diseases. We prepared the nanocapsules using the interfacial deposition of preformed polymer method with an Hst concentration of 0.5 mg/mL and then characterized the size and distribution of particles. To quantify the Hst in the samples, we developed an analytical method using high-performance liquid chromatography. Studies of encapsulation efficiency ($98.81\% \pm 0.28\%$), microscopy, drug release (free-Hst: $104.96\% \pm 12.83\%$; lipid-core nanocapsule-Hst: $69.90\% \pm 1.33\%$), penetration/permeation, drug content (0.46 ± 0.01 mg/mL) and the effect of washing the textile after drug impregnation were performed as part of the study. The results showed that nanoparticles of a suitable size and distribution with controlled release of the drug and penetration/permeation into the skin layers were achieved. Furthermore, it was established that polyamide was able to hold more of the drug, with a 2.54 times higher content than the cotton fiber; after one wash and after five washes, this relation was 2.80 times higher. In conclusion, this is a promising therapeutic alternative to be further studied in clinical trials.

Keywords: lipid-core nanocapsules, polymer, hesperetin, fabrics, impregnation, medical textiles, polyamide, poly(ϵ -caprolactone)

Autorização da Revista

17/10/2018

Copyright Clearance Center



Note: Copyright.com supplies permissions but not the copyrighted content itself.

1
PAYMENT

2
REVIEW

3
CONFIRMATION

Step 3: Order Confirmation

Thank you for your order! A confirmation for your order will be sent to your account email address. If you have questions about your order, you can call us 24 hrs/day, M-F at +1,855,239,3415 Toll Free, or write to us at info@copyright.com. This is not an invoice.

Confirmation Number: 11757377
Order Date: 10/17/2018

If you paid by credit card, your order will be finalized and your card will be charged within 24 hours. If you choose to be invoiced, you can change or cancel your order until the invoice is generated.

Payment Information

Paula Menezes
Oregon Health Science and University
paula.dp.menezes@gmail.com
+1 (503) 270-0849
Payment Method: n/a

Order Details

International journal of nanomedicine

Order detail ID: 71612424
Order License Id: 4451561396422
ISSN: 1178-2013
Publication Type: Journal
Volume:
Issue:
Start page:
Publisher: DOVE Medical Press

Permission Status: **Granted**

Permission type: Republish or display content
Type of use: Republish in a thesis/dissertation

Requestor type: Academic institution

Format: Print

Portion: chapter/article

The requesting person/organization: Federal University of Sergipe

Title or numeric reference of the portion(s): Figure 1 shows the HPLC-DAD...fabric for the treatment of CVI.

Title of the article or chapter the portion is from: Hesperetin-loaded lipid-core nanocapsules in polyamide: a new textile formulation for topical drug delivery

Editor of portion(s): N/A

<https://www.copyright.com/printCoIConfirmPurchase.do?operation=defaultOperation&confirmNum=11757377&showTCCitation=TRUE>

1/6

Author of portion(s)	N/A
Volume of serial or monograph	N/A
Page range of portion	
Publication date of portion	2019, february
Rights for	Main product
Duration of use	Current edition and up to 5 years
Creation of copies for the disabled	no
With minor editing privileges	no
For distribution to	Worldwide
In the following language(s)	Original language of publication
With incidental promotional use	no
Lifetime unit quantity of new product	Up to 499
Title	BIOMATERIAIS PARA ESTUDO E TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA: ABORDAGENS NANOTECNOLÓGICAS E DA MEDICINA REGENERATIVA
Institution name	n/a
Expected presentation date	Feb 2019

Note: This item will be invoiced or charged separately through CCC's **RightsLink** service. [More info](#)

\$ 0.00

Total order items: 1

This is not an invoice,

Order Total: 0.00 USD

Confirmation Number: 11757377

Citation Information

Order Detail ID: 71612424

International journal of nanomedicine by DOVE Medical Press, Reproduced with permission of DOVE Medical Press in the format Republish in a thesis/dissertation via Copyright Clearance Center.

Close

DEPÓSITO DE PATENTE JUNTO AO INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI)



10/03/2017 870170015780
15:42

00.000.2.2.18.0438620.7

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 004858 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 13031547000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: Cidade Universitária, "Prof. José Aloísio de Campos", Jardim Rosa
Elze, São Cristóvão, Aracaju, Sergipe.

Cidade: São Cristóvão

Estado: SE

CEP: 49100000

País: Brasil

Telefone: (79)2105 6865

Fax:

Email: cinttec.ufs@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 10/03/2017 às
15:42, Petição 870170015780

APÊNDICE B – Messenger RNA Delivery for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications

TISSUE ENGINEERING: Part A
Volume 00, Number 00, 2018
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ten.tea.2017.0444



REVIEW ARTICLE

Messenger RNA Delivery for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications

Siddharth Patel, MEng,^{1,*} Avathamsa Athirasala, MSE,^{2,*} Paula P. Menezes, MS,^{2,3,*} N. Ashwanikumar, PhD,¹ Ting Zou, MS,^{2,4} Gaurav Sahay, PhD,^{1,5} and Luiz E. Bertassoni, DDS, PhD^{2,5,6}

¹Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Collaborative Life Science Building, Oregon State University, Portland, OR, 97201, USA;

²Division of Biomaterials and Biomechanics, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Oregon Health and Science University, Portland, OR, 97201, USA;

³Post-graduate Program in Health Sciences, Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, 49100-000, Brazil;

⁴Endodontology, Faculty of Dentistry, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong, China;

⁵Department of Biomedical Engineering, Collaborative Life Science Building, Oregon Health and Science University, Portland, OR, 97201, USA.

⁶Center for Regenerative Medicine, Oregon Health and Science University, Portland, OR, 97201, USA

*Authors contributed equally to this work.

Apresentação do artigo

O presente artigo de revisão buscou elucidar o potencial do uso do RNA mensageiro (mRNA) como estratégia terapêutica nas áreas da medicina regenerativa e engenharia de tecidos. A capacidade de controlar processos celulares e direcionar com precisão a reprogramação celular, tem revolucionado a medicina regenerativa. Avanços recentes na tecnologia de mRNA transcrito *in vitro* (IVT) com modificações químicas, levaram ao desenvolvimento de métodos que controlam a expressão gênica numa relação espaço-temporal. Além disso, existe um impulso atual para o desenvolvimento de abordagens seguras e livres de integração à terapia genética, em pesquisas translacionais. Nesta revisão, descrevemos estratégias de modificações sintéticas de IVT mRNA e tecnologias não-virais para entrega intracelular. Nós fornecemos ainda, evidências inéditas acerca do sucesso de abordagens de engenharia de tecidos que fazem uso de *scaffolds* de hidrogéis carregados com material genético. Além disso, discutimos o potencial transformador do uso de mRNA em formulações nanotecnológicas, que uma vez incorporadas em hidrogéis permitem a manipulação genética controlada para regenerar tecidos e órgãos *in vitro* e *in vivo*. O papel da liberação de mRNA na vascularização, citoproteção e xenotransplante mediado por Cas9-O também foi destacado. Harmonizando as interações do veículo de entrega de mRNA com *scaffolds* poliméricos, observamos que esta associação é capaz de apresentar sinais genéticos que levam ao comando preciso sobre os eventos de reprogramação, diferenciação e atividade secretiva de células-tronco - um objetivo final para a engenharia de tecidos. Esses achados fomentaram a hipótese de que a captação de mRNA nanoencapsulado incorporado em hidrogéis, é dependente das propriedades físico-químicas da matriz extracelular. Esta hipótese foi investigada e os resultados estão apresentados no capítulo 2 desta tese.

Autorização da Revista

18/10/2018

Gmail - RE: LiebertPub Website Customer Question



menezespp <paula.dp.menezes@gmail.com>

RE: LiebertPub Website Customer Question

2 mensagens

Ballen, Karen <KBallen@liebertpub.com>

18 de outubro de 2018 12:28

Para: "paula.dp.menezes@gmail.com" <paula.dp.menezes@gmail.com>

Dear Paula:

Copyright permission is granted for this request.

Please give proper credit to the journal and to the publisher: Mary Ann Lieber, Inc., New Rochelle, NY.

Kind regards,

Karen

APÊNDICE C – Advances of nanosystems containing cyclodextrins and their applications in pharmaceuticals

International Journal of Pharmaceutics 550 (2019) 312–328



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



Review

Advances of nanosystems containing cyclodextrins and their applications in pharmaceuticals



Paula dos Passos Menezes^{a,*}, Tatianny de Araújo Andrade^a, Luiza Abrahão Frank^b,
Eloísa Portugal Barros Silva Soares de Souza^a, Gabriela das Graças Gomes Trindade^a,
Igor Araújo Santos Trindade^a, Mairim Russo Serafini^a, Sílvia Stanisçuaski Guterres^b,
Adriano Antunes de Souza Araújo^{a,*}

^aDepartment of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Brazil

^bCollege of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

Apresentação do artigo

A presente revisão sistemática foi motivada pela necessidade de compreender quais os tipos de nanossistemas recentemente desenvolvidos e suas potencialidades para administração tópica de fármacos. Por muitos anos, pesquisadores trabalharam com estruturas supramoleculares envolvendo complexos de inclusão com ciclodextrinas. Estes estudos resultaram em novos medicamentos comercialmente disponíveis que foram de grande benefício terapêutico. Mais recentemente, pesquisas utilizando nanopartículas, incluindo na formulação ciclodextrinas, tem recebido ênfase no cenário científico devido à versatilidade dos sistemas e seu notável potencial terapêutico. Esta revisão centra-se nos estudos publicados entre 2002 e 2018 envolvendo nanossistemas contendo ciclodextrinas. Consideramos o tipo de nanossistema, sua importância no contexto de saúde, as técnicas físico-químicas usadas para mostrar a qualidade desses sistemas e seu potencial para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas de uso tópico. Estes estudos foram desenvolvidos recentemente e concentraram-se principalmente na ciência básica, sem ensaios clínicos ainda em execução. É importante notar, que tais estudos não incluem testes de toxicidade. Apesar dessa limitação, os ensaios de caracterização realizados, sugerem que essas novas formulações podem ter potencial terapêutico. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a eficácia e segurança desses nanossistemas. Diante do potencial das nanocápsulas para veiculação de fármacos para administração tópica, esta formulação foi escolhida como veículo para a hesperetina. Ademais, hipotetizamos que este fármaco é seguro, não irritante e eficaz para administração tópica. Tais hipóteses foram investigadas e estão apresentadas no capítulo 3 desta tese.

Autorização da Revista



RightsLink®

Home

Create Account

Help



Title: Advances of nanosystems containing cyclodextrins and their applications in pharmaceuticals

Author: Paula dos Passos Menezes, Tatianny de Araújo Andrade, Luiza Abrahão Frank, Eloísa Portugal Barros Silva Soares de Souza, Gabriela das Graças Gomes Trindade, Igor Araújo Santos Trindade, Mairim Russo Serafini, Silvia Stanisçuaski Guterres et al.

Publication: International Journal of Pharmaceutics

Publisher: Elsevier

Date: 25 March 2019

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

LOGIN

If you're a **copyright.com** user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink** user or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer@copyright.com

APÊNDICE D – Parecer Consubstanciado do CEP

UFS - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO, CEGO, CONTROLADO DO EFEITO DE MEIAS COMPRESSIVAS CONTENDO FLAVONÓIDE NANOENCAPSULADO NO TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA

Pesquisador: PAULA DOS PASSOS MENEZES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 91428318.7.0000.5548

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.771.535

Apresentação do Projeto:

Pesquisa intitulada "ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO, CEGO, CONTROLADO DO EFEITO DE MEIAS COMPRESSIVAS CONTENDO FLAVONÓIDE NANOENCAPSULADO NO TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA, trata-se de um ensaio clínico fase I/II, controlado, randomizado e triplo-cego, com abordagem quantitativa e será desenvolvido com 30 a 59 anos, de ambos os gêneros atendidos no Ambulatório de Cirurgia Vasculardo Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS) com insuficiência venosa crônica diagnosticada por cirurgião vascular apresentando CEAP 2 – 5, a saber: (C2: veias varicosas, C3: veias varicosas mais edema, C4a: hiperpigmentação ou eczema, C4b: lipodermatoesclerose ou atrofia branca, C5: úlcera venosa cicatrizada, C6: úlcera ativa). Além disso, serão incluídos pacientes que através da mensuração do scan doppler apresentem comprometimento similar da veia safena. A pesquisa será desenvolvida em duas etapas, com delineamentos metodológicos distintos. Na primeira etapa do estudo, serão coletados dados sócio-demográficos e clínicos de todos os pacientes admitidos no Ambulatório de Cirurgia Vasculardo HU/UFS. Nesta etapa, os pacientes serão classificados quanto ao estágio da doença seguindo os preceitos da classificação CEAP, utilizando-se um corte transversal. Deste modo, 10 pacientes do Grupo controle positivo utilizarão meia compressiva convencional e medicamento venotônico de uso oral; 10 pacientes do Grupo Teste irão utilizar meia compressiva contendo hesperetina nanoencapsulada e produto placebo de uso oral; 10 pacientes do Grupo

Endereço: Rua Claudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cephu@ufs.br

Continuação do Parecer: 2.771.535

controle negativo utilização meia compressiva convencional e produto placebo de uso oral. O paciente será instruído a calçar a meia teste ou controle diariamente por seis horas ininterruptas, tendo início ao acordar. A partir de então será iniciado o estudo comparativo dos tratamentos em relação à sua irritabilidade cutânea, eficácia, segurança e qualidade na melhora dos sintomas frequentes da doença (varizes, edema, alteração de pigmentação da pele, compreendendo desta forma as classificações CEAP 2 – 6), seguindo os critérios de inclusão e exclusão. Dessa forma, cada paciente deverá comparecer ao ambulatório de cirurgia vascular oito vezes, incluindo dia do cadastro no ensaio clínico, entrega do tratamento mensal e feedback da evolução clínica ao longo do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar o efeito de meias compressivas contendo hesperetina nanoencapsulada em comparação com os tratamentos atuais (meias compressivas convencionais e meias compressivas convencionais associadas com medicamentos venoativos orais) utilizados na prática clínica como produtos de referência.

Objetivo Secundário:

- Avaliar o impacto do uso de meias compressivas contendo hesperetina nanoencapsulada em comparação com os tratamentos convencionais na qualidade de vida dos pacientes portadores de IVC acompanhados no Ambulatório de Cirurgia Vascular do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os autores informam que a pesquisa apresenta riscos orgânicos, que alguns efeitos adversos podem ser pontuados, a exemplo de reações alérgicas a qualquer um dos componentes apresentados pelas meias compressivas contendo hesperetina nanoencapsulada, meias compressivas convencionais ou meias compressivas convencionais associadas com medicamento venoativo oral. Garantem que, caso alguma reação alérgica seja identificada ou relatada a intervenção será imediatamente suspensa e o paciente retirado do estudo. Informam que será garantida toda a assistência médica necessária ao paciente que por ventura apresente alguma reação indesejável oriunda da terapia proposta neste estudo.

Benefícios:

Os autores descrevem como benefício indireto para o participante da pesquisa, a melhora na qualidade de vida em virtude da redução ou erradicação dos sintomas acarretados pela

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº
Bairro: Sanatório CEP: 49.060-110
UF: SE Município: ARACAJU
Telefone: (79)3194-7208 E-mail: cephu@ufs.br

Continuação do Parecer: 2.771.535

insuficiência venosa crônica. Ao mesmo tempo, estarão recebendo tratamento gratuito e avaliação multiprofissional (médica, fisioterapêutica e farmacêutica) a cada 3 meses a contar do início do estudo. Após o término da pesquisa, o paciente será reavaliado pela cirurgia vascular que dará uma feedback da evolução clínica do paciente e este continuará sendo acompanhado pela equipe por um ano após o estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, atendeu o que reza a Resolução 466/2012.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE utiliza linguagem técnica, texto extenso com 3 laudas e somente no final decide convidar o participante para participar do estudo. Garante o anonimato, sigilo das informações, direito de recusa e desistência a qualquer momento sem nenhum prejuízo para os participantes da pesquisa. Informa quais objetivos da pesquisa. Estabelece os benefícios indiretos esperados para os participantes da pesquisa e como fará para amenizar eventuais desconfortos. Colocou os fones dos pesquisadores responsáveis, para eventual necessidade de contato do sujeito da pesquisa. Informa que o TCLE está em duas vias, e que uma via será entregue ao participante da pesquisa.

Consta a Folha de Rosto, devidamente assinada pelo pesquisador e também pelo responsável pela instituição proponente, com carimbo.

O orçamento consta de 13 itens e o valor total de R\$ 20.900,00. Informa que os recursos do projeto serão obtidos do laboratório do Edital MCTI/CNPQ Nº01/2016 - Universal.

Recomendações:

- Elaborar o TCLE com redação objetiva e com linguagem clara, acessível a compreensão dos participantes da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A projeto de pesquisa cumpre o que determina a Resolução 466/2012 desde que seja re elaborado o TCLE conforme recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_763458.pdf	14/06/2018 09:33:06		Aceito

Endereço: Rua Claudio Batista s/nº
 Bairro: Sanatório CEP: 49.060-110
 UF: SE Município: ARACAJU
 Telefone: (79)3194-7208 E-mail: cephu@ufs.br

Continuação do Parecer: 2.771.535

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	14/06/2018 09:31:09	PAULA DOS PASSOS MENEZES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Ensaio_clinico_Paula_Menezes. pdf	12/06/2018 14:26:14	PAULA DOS PASSOS MENEZES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/06/2018 14:25:47	PAULA DOS PASSOS MENEZES	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	12/06/2018 14:25:20	PAULA DOS PASSOS MENEZES	Aceito
Orçamento	Orcamento_financeiro.pdf	08/01/2018 21:01:51	PAULA DOS PASSOS MENEZES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACAJU, 16 de Julho de 2018

Assinado por:
Anita Hermínia Oliveira Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Cláudio Batista s/n°
 Bairro: Sanatório CEP: 49.060-110
 UF: SE Município: ARACAJU
 Telefone: (79)3194-7208 E-mail: cephu@ufs.br

APÊNDICE E – Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

Saúde
Ministério da Saúde

REGISTRO BRASILEIRO DE
Ensaios Clínicos

USUÁRIO paula.dp.menezes@gmail.com SUBMISSÕES 001 PENDÊNCIAS 000

Perfil Patnet SAIR

NOTÍCIAS | SOBRE | AJUDA | CONTATO

PT | ES | EN

Buscar ensaios

BUSCA AVANÇADA

HOME / SUBMISSÕES / SUMÁRIO DO ENSAIO

VISUALIZAÇÃO PRÉVIA

This trial cannot be modified because it has already been approved.

Atualizar

Parte	Nome do formulário	Situação (en)	Situação (pt-br)
1	Identificação do ensaio	Parcial	Parcial
2	Patrocinadores	Concluído	Concluído
3	Condições de saúde	Concluído	Concluído
4	Intervenções	Concluído	Concluído
5	Recrutamento	Concluído	Concluído
6	Tipo do estudo	Concluído	Concluído
7	Desfechos	Concluído	Concluído
8	Contatos	Concluído	Concluído
9	Anexos	Concluído	Concluído

Enviar para Revisão

Todos os campos obrigatórios foram preenchidos.

Upload XML da Plataforma Brasil Escolher arquivo Nenhum arquivo selecionado Enviar

APÊNDICE F –Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Eu, _____
_____, RG _____ declaro estar ciente da minha participação na realização da pesquisa intitulada “ENSAIO CLÍNICO DUPLO-CEGO, CONTROLADO DO EFEITO DE MEIAS COMPRESSIVAS CONTENDO FLAVONÓIDE NANOENCAPSULADO NO TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA”, tendo como pesquisadores responsáveis Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo, da Universidade Federal de Sergipe-UFS, a Cirurgiã Vascular Msc. Cristiane Vilaça Campos Gomes e a pós-graduanda em Ciências da Saúde Paula dos Passos Menezes. Assim como fui informado de que esta pesquisa tem fins exclusivamente científicos, tendo por objetivo principal avaliar a eficácia, segurança e qualidade de um novo produto para o tratamento de insuficiência venosa crônica. Igualmente, declaro estar devidamente esclarecido (a) dos riscos mínimos da pesquisa e que serei imediatamente removido do estudo e receberei toda a assistência médica necessária caso alguma reação indesejável venha a ocorrer. Além disso, tenho conhecimento de que a minha identidade estará mantida sob sigilo. Nestes termos concordo em participar da pesquisa assinando abaixo:

Local e data

Assinatura do pesquisador(a)

Assinatura do paciente ou responsável legal

Pesquisadores:

Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

(Celular: 79 99192-4545, e-mail: adriasa2001@yahoo.com.br)

Msc. Cristiane Vilaça Campos Gomes

(Celular: 79 99155-4028, e-mail: cristianevilaca@gmail.com)

Msc. Paula dos Passos Menezes

(Celular: 79 99152-9392, e-mail: paula.dp.menezes@gmail.com)

APÊNDICE G – Questionário sociodemográfico – Admissão

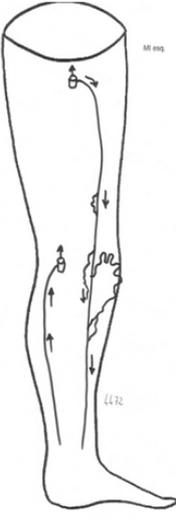
Ensaio clínico duplo-cego, controlado do efeito de meias compressivas contendo flavonóide nanoencapsulado no tratamento da insuficiência venosa crônica

Nº Prontuário:	Data de admissão:
Nome:	
Endereço:	
Sexo:	Telefone:
Data de Nascimento:	Idade:
Estado civil:	Grau de instrução:

Pratica atividade física? Se sim, qual e por quanto tempo?		
Faz uso de medicamentos? Se sim, quais e há quanto tempo faz uso dessa terapia?		
Faz uso de algum medicamento tópico ou cosmético para hidratação da pele? Se sim, qual?		
Usa meias compressivas? Se sim, há quanto tempo?		
Está tomando medicamento para IVC nos últimos 6 meses? Se sim, qual?		
Possui úlcera? Se sim, há quanto tempo?		
Já fez alguma cirurgia? Se sim, de que?		
Está tomando antibiótico nos últimos seis meses? Se sim, qual?		
Já fez escleroterapia? Se sim há quanto tempo?		
Já usou bota de Unna? Se sim, há quanto tempo?		
Já usou ou faz uso de curativo multicamadas? Se sim, qual e há quanto tempo?		
Diabético (a)?	Hipertenso (a)?	
Erisipela?	Linfagite?	
Trombose venosa profunda?	Úlcera não venosa?	
Possui alguma neuropatia?	Circunferência Abdominal:	
Peso:	Altura:	IMC:
CEAP dir.	CEAP esq.	
Úlcera em atividade?	Tamanho atual (mm):	

APÊNDICE H –Parâmetros Clínicos – Admissão

Ensaio clínico duplo-cego, controlado do efeito de meias compressivas contendo flavonóide nanoencapsulado no tratamento da insuficiência venosa crônica

Direita		Esquerda	Tempo de avaliação	0	
<p>CROSSA Diâm Ref</p> <p>TERC MEDIO COXA Diâm Ref</p> <p>PONTO J Diâm Ref</p> <p>TER MEDIO PERNA Diâm Ref</p> <p>CIRCUNFERÊNCIA Diâm 7 cm Diâm 14 cm Diâm 21 cm</p>		<p>CROSSA Diâm Ref</p> <p>TERC MEDIO COXA Diâm Ref</p> <p>PONTO J Diâm Ref</p> <p>TER MEDIO PERNA Diâm Ref</p> <p>CIRCUNFERÊNCIA Diâm 7 cm Diâm 14 cm Diâm 21 cm</p>	Paciente		Data
		CEAP dir CEAP esq		Tornozelo (cm)	
		Panturrilha (cm)		Joelho (cm)	
		Comprimento (cm)		Compressão	
		Úlcera em atividade?		Tamanho (mm)	
		Observações			

APÊNDICE K – Parâmetros Clínicos – Acompanhamento

PARÂMETROS CLÍNICOS - ACOMPANHAMENTO

PACIENTE:

Ensaio clínico duplo-cego, controlado do efeito de meias compressivas contendo flavonóide nanoencapsulado no tratamento da insuficiência venosa crônica

TEMPO 3

TEMPO 6

Direita		Esquerda		Direita		Esquerda	
CROSSA		CROSSA		CROSSA		CROSSA	
Diâm		Diâm		Diâm		Diâm	
Ref		Ref		Ref		Ref	
TERC MEDIO COXA		TERC MEDIO COXA		TERC MEDIO COXA		TERC MEDIO COXA	
Diâm		Diâm		Diâm		Diâm	
Ref		Ref		Ref		Ref	
PONTO J		PONTO J		PONTO J		PONTO J	
Diâm		Diâm		Diâm		Diâm	
Ref		Ref		Ref		Ref	
TER MEDIO PERNA		TER MEDIO PERNA		TER MEDIO PERNA		TER MEDIO PERNA	
Diâm	Diâm	Diâm	Diâm				
Ref	Ref	Ref	Ref				
CIRCUNFERÊNCIA	CIRCUNFERÊNCIA	CIRCUNFERÊNCIA	CIRCUNFERÊNCIA				
Diâm 7 cm	Diâm 7 cm	Diâm 7 cm	Diâm 7 cm				
Diâm 14 cm	Diâm 14 cm	Diâm 14 cm	Diâm 14 cm				
Diâm 21 cm	Diâm 21 cm	Diâm 21 cm	Diâm 21 cm				

Úlcera em atividade?
Tamanho (mm)

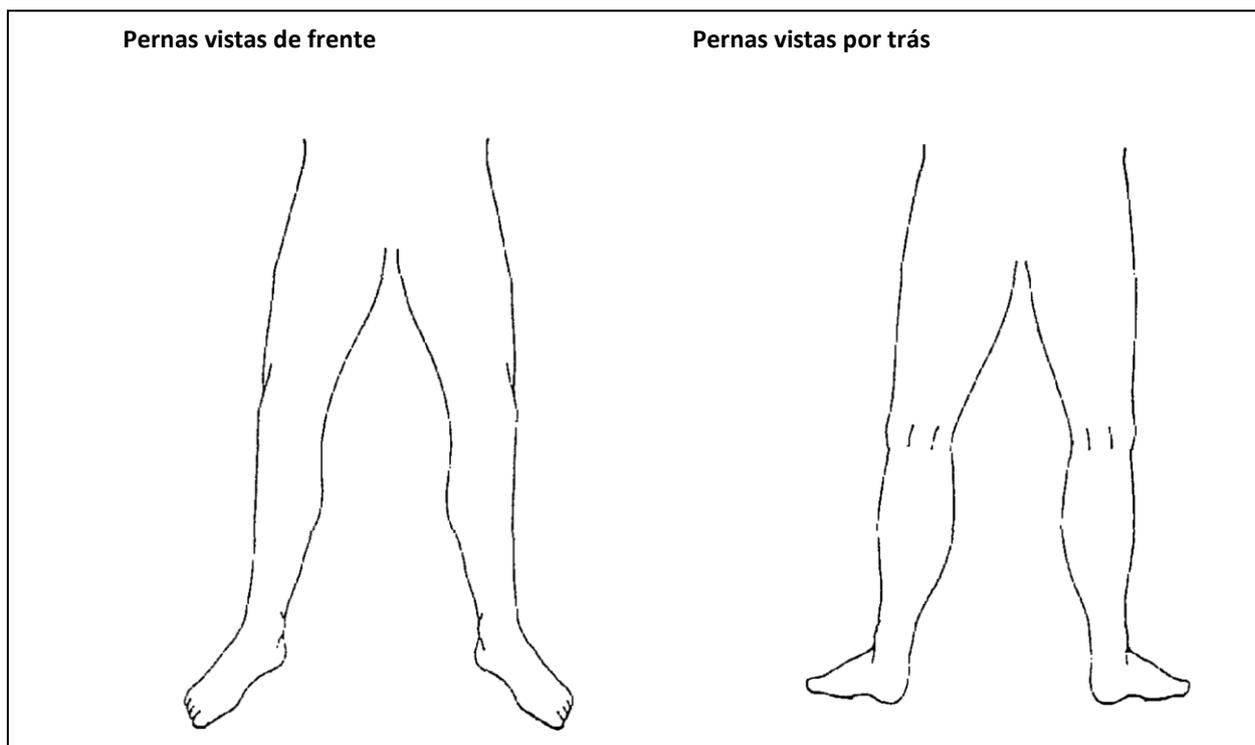
Úlcera em atividade?
Tamanho (mm)

ANEXOS

ANEXO A—Versão adaptada ao Brasil do *Aberdeen Varicose Veins Questionnaire* (AVVQ)

SUAS VARIZES

Desenhar, por favor, suas varizes nas figuras abaixo:



2. Nas últimas duas semanas, por quantos dias suas varizes causaram-lhe dor?		
(Por favor marque uma resposta para cada perna)	Perna D	Perna E
De forma alguma		
Entre 1 e 5 dias		
Entre 6 e 10 dias		
Por mais de 10 dias		

3. Durante as últimas duas semanas, em quantos dias você tomou remédio para diminuir a dor de suas varizes?	
(Por favor, marque um quadrado)	
De forma alguma	
Entre 1 e 5 dias	

Entre 6 e 10 dias	
Por mais de 10 dias	

4. Nas últimas duas semanas, quanto inchaço no tornozelo você teve?	
(Por favor, marque um quadrado)	
De forma alguma	
Ligeiro inchaço no tornozelo	
Moderado inchaço no tornozelo (por exemplo, fazendo com que você sente com seus pés levantados sempre que possível)	
Intenso inchaço no tornozelo (por exemplo, causando-lhe dificuldade para por seus sapatos)	

5. Nas últimas duas semanas, você tem usado meias ou ataduras elásticas?		
(Por favor, marque um quadrado para cada perna)	Perna D	Perna E
Não		
Sim, eu mesmo comprei sem prescrição do médico		
Sim, meu médico prescreveu para mim, a qual eu visto de vez em quando		
Sim, meu médico prescreveu para mim, a qual eu visto todo dia		

6. Nas últimas duas semanas, você teve coceira associada com suas varizes?		
(Por favor, marque um quadrado para cada perna)	Perna D	Perna E
Não		
Sim, mas somente acima do joelho		
Sim, mas somente abaixo do joelho		
Acima e abaixo do joelho		

7. Você tem mancha roxa causada por pequeno sangramento de vasos sanguíneos na pele, associado com suas varizes?		
(Por favor, marque um quadrado para cada perna)	Perna D	Perna E
Não		

Sim		
-----	--	--

8. Você tem elevações, ressecamento ou manchas de pele na área de seu tornozelo?

(Por favor, marque um quadrado)	Perna D	Perna E
Não		
Sim, mas não requer tratamento médico ou de enfermagem		
Sim, e requer tratamento médico ou de enfermagem		

9. Você está com uma ferida de pele associada com suas varizes?

(Por favor, marque um quadrado para cada perna)	Perna D	Perna E
Não		
Sim		

10. A aparência de suas varizes causa-lhe preocupação?

(Por favor, marque um quadrado)	
Não	
Sim, sua aparência causa-me ligeira preocupação	
Sim, sua aparência causa-me moderada preocupação	
Sim, sua aparência causa-me muita preocupação	

11. A aparência de suas varizes influencia sua escolha de roupa, incluindo meia-calça?

(Por favor, marque um quadrado)	
Não	
De vez em quando	
Frequentemente	
Sempre	

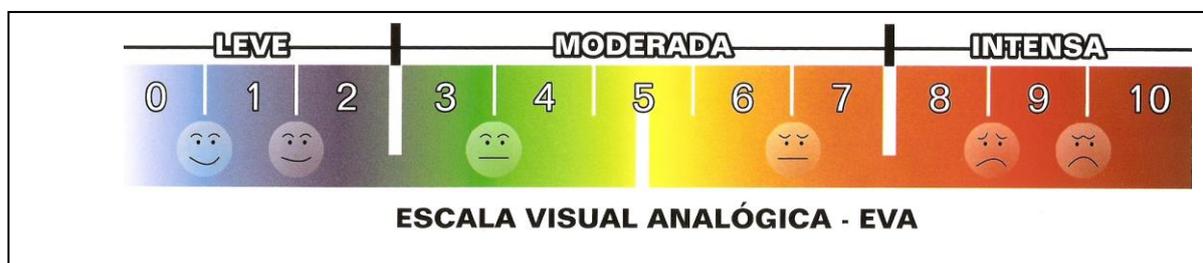
12. Durante as últimas duas semanas, suas varizes interferiram com seu trabalho doméstico ou outras atividades diárias?

(Por favor, marque um quadrado)	
Não	

Eu pude trabalhar mas meu trabalho sofreu um ligeiro prejuízo	
Eu pude trabalhar mas meu trabalho sofreu um moderado prejuízo	
Minhas veias impediram que eu trabalhasse um dia ou mais	

13. Durante as últimas duas semanas, suas varizes interferiram com suas atividades de lazer (incluindo esporte, passatempos e vida social)?	
(Por favor, marque um quadrado)	
Não	
Sim, meu divertimento sofreu um ligeiro prejuízo	
Sim, meu divertimento sofreu um moderado prejuízo	
Sim, minhas veias impediram-me de participar em todas as atividades de lazer	

ANEXO B–Escala Visual Analógica – EVA



Para utilizar a EVA o investigador questionou o paciente quanto ao seu grau de dor sendo que 0 significa ausência total de dor e 10 o nível de dor máxima suportável pelo paciente.

O investigador abordou o paciente e realizou as seguintes perguntas:

- Você tem dor?
- Como você classifica sua dor? (o paciente discorreu livremente sobre a sua percepção da dor e a sua fala foi transcrita nos registros da pesquisa)

Além disso, o paciente foi questionado e não sugestionado, sobre a intensidade da dor mediante EVA ilustrada acima:

- a) Se não tiver dor, a classificação foi zero.
- b) Se a dor for moderada, seu nível de referência foi cinco.
- c) Se for intensa, seu nível de referência foi dez.