

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

GILBERTO BARONI

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO SINVASTATINA NA PREVENÇÃO DA FIBROSE
PERITONEAL**

**PONTA GROSSA
2021**

GILBERTO BARONI

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO SINVASTATINA NA PREVENÇÃO DA FIBROSE
PERITONEAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

**PONTA GROSSA
2021**

Baroni, Gilberto

B265 Desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanocápsulas poliméricas contendo sinvastatina na prevenção de fibrose peritoneal / Gilberto Baroni. Ponta Grossa, 2021.
112 f.

Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1. Fibrose peritoneal. 2. Diálise peritoneal. 3. Sinvastatina. 4. Nanocápsulas. 5. Interleucinas. I. Farago, Paulo Vitor. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615.321

Ponta Grossa, 17 de junho de 2021.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 07/2021 DO DOUTORANDO GILBERTO BARONI REALIZADA NO DIA 17 DE JUNHO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao décimo sétimo dia de junho de dois mil e vinte e um, às 13 horas, via videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Paulo Vitor Farago reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas do doutorando Gilberto Baroni, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelo Professor Doutor Paulo Vitor Farago (UEPG/PR) e demais Doutores (membros titulares): Leandro Cavalcante Lipinski (UEPG/PR), Maria Dagmar da Rocha Gaspar (UEPG/PR), Mona Liza Simionatto (UNICESUMAR/PR) e Thyago Proença de Moraes (PUC/SP). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **"DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO SINVASTATINA NO TRATAMENTO DA FIBROSE PERITONEAL"**.

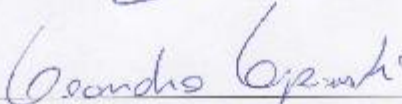
Encerrada a defesa, a banca considerou aprovada a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____


Paulo Vitor Farago 1 - (UEPG - PR) Presidente


Leandro Cavalcante Lipinski 2 - (UEPG - PR) - Titular


Maria Dagmar da Rocha Gaspar 3 - (UEPG - PR) - Titular


Mona Liza Simonatto 4 - (UNICESUMAR - PR) - Titular


Thyago Proença de Moraes 5 - (PUC - PR) - Titular

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, in memoriam, que me ensinaram sempre a valorizar o conhecimento.

À minha irmã, Deisi, minha primeira professora.

Ao meu irmão, Waldir, inspiração para ser médico.

Aos meus filhos, para quem espero ser exemplo.

*À minha esposa Eloina, a você que é minha colega de turma, colega de profissão, colega de pós-graduação, mãe dos meus filhos.
Sem você, nada faria sentido.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por me guiar na busca de novas descobertas. A sua luta na superação das adversidades é o seu maior ensinamento.

À Prof.^a. Jessica Nadal, pois sem ela eu teria me perdido na interpretação dos resultados.

Aos colegas de pós-graduação, especialmente ao Guilherme Camargo, que muito me ajudou na obtenção das nanocápsulas, e à Dra. Adriana Koga, que me ajudou no experimento animal.

Ao Prof. Dr. Leandro Lipinski, por seu apoio e incentivo.

À acadêmica Mylena Ferronato, por sua participação no estudo.

"Que eu seja moderado em tudo, exceto no conhecimento desta ciência; quanto a isso, que eu seja insaciável; concede-me a força e a oportunidade de sempre corrigir o que já adquiri, sempre para ampliar seu domínio; pois o conhecimento é ilimitado e o espírito do homem também pode se ampliar infinitamente, todos os dias, para enriquecer-se com novas aquisições".

Moises Maimonides

RESUMO

Introdução: A diálise peritoneal provoca alterações no peritônio, que pode assumir formas graves, levar à suspensão do tratamento e trazer risco ao paciente. Alguns fármacos, incluindo estatinas, podem eventualmente prevenir o dano, mas não existem estudos usando nanotecnologia para melhorar a ação farmacológica nesta situação clínica. **Objetivo:** Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de SV e estudar a influência do uso das mesmas na fibrose peritoneal induzida em ratos pelo uso de solução de diálise peritoneal rica em glicose. **Métodos:** Foram desenvolvidas nanocápsulas de SV pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, caracterizadas por Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier, Difração de Raios X, Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo, Potencial Zeta, mensuração do tamanho das partículas e da eficiência de encapsulação, e o perfil de liberação *in vitro*. A seguir realizado estudo *in vivo* prospectivo controlado, em ratos Wistar não urêmicos. Foram estudados 48 animais, divididos em 4 grupos: sham, diálise peritoneal, diálise peritoneal com SV convencional, diálise peritoneal usando nanocápsulas poliméricas contendo SV. Os animais dos últimos três grupos foram submetidos diariamente à punção abdominal, sendo infundida solução de diálise peritoneal com glicose a 4,25%. Foi avaliado o grau de fibrose, e expressão de TNF- α e Interleucina-6. **Resultados:** O método de obtenção das nanocápsulas contendo SV resultou em uma incorporação do SV maior que 99%. No estudo animal, a análise mostrou que a expressão de TNF- α e a intensidade da fibrose foram significativamente menores no grupo que utilizou as nanocápsulas de SV. **Conclusão:** Este estudo demonstrou que o uso de SV em nanocápsulas poliméricas foi capaz de reduzir a inflamação peritoneal induzida por solução de diálise.

Palavras-chave: Fibrose peritoneal. Diálise peritoneal. Sinvastatina. Nanocápsulas. Interleucina 6. TNF- α .

ABSTRACT

Introduction: peritoneal dialysis causes changes in the peritoneum, which can take severe forms, which can bring risk to the patient. Some drugs, including statins, may eventually prevent damage, but there are no studies using nanotechnology to improve the action of drugs. **Objective:** To develop and characterize simvastatin nanocapsules and to study the influence of their use on peritoneal fibrosis induced in rats by the use of glucose-rich peritoneal dialysis solution. **Methods:** Simvastatin nanocapsules were developed using a preformed polymer interfacial deposition method, which were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Field Emission Gun Scanning Microscopy, X Ray Diffraction, Zeta Potential, measurement of the particle size, encapsulation efficiency and *in vitro* release profile. Next, a prospective controlled in vivo study was performed on non-uremic Wistar rats. 48 animals were studied, divided into 4 groups: sham, peritoneal dialysis, peritoneal dialysis with conventional simvastatin, peritoneal dialysis using polymeric nanocapsules containing simvastatin. The animals were submitted to abdominal puncture daily, and a peritoneal dialysis solution was infused with 4.25% glucose. The degree of fibrosis and the expression of TNF- α and Interleukin-6 were evaluated. **Results:** The method of obtaining nanocapsules achieved an incorporation greater than 99%. In the animal study, the analysis showed that TNF- α expression and fibrosis intensity were significantly less intense in the group using SV nanocapsules. **Conclusion:** a study showed that the method is capable of forming simvastatin nanocapsules, and that their use reduces peritoneal inflammation induced by dialysis solution.

Key words: Peritoneal fibrosis. Peritoneal dialysis. Simvastatin. Nanocapsules. Interleukin 6. TNF- α .

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação da DRC conforme TFG e Proteinúria.....	19
Quadro 2 – Causas de Esclerose Peritoneal Encapsulante	25
Quadro 3 – Características dos Colágenos I e III.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Número de pacientes em TRS de 2001 a 2020	20
Figura 2 –	Prevalência de Pacientes em Diálise no Brasil por milhão de habitantes de 2013 a 2020	20
Figura 3 –	Diagnóstico de Base dos pacientes em diálise no Brasil de 2016 a 2020.....	22
Figura 4 –	Porcentagem de pacientes em diálise, conforme modalidade e fonte pagadora no ano de 2020	24
Figura 5 –	Modelo da fisiopatologia da fibrose	30
Figura 6 –	Processo fisiopatológico da PE	38
Figura 7 –	Representação esquemática do método de obtenção de nanocápsulas.	43
Figura 8 –	Representação esquemática das nanocápsulas.....	43
Figura 9 –	Estrutura da SV	45
Figura 10 –	Mecanismo anti-inflamatório das estatinas	47
Figura 11 –	Linearidade do método de UHPLC-DAD	73
Figura 12 –	Cromatograma da NC-SV e NC-N.....	75
Figura 13 –	Tamanho médio e potencial zeta da formulação NC-SV	76
Figura 14 –	Fotomicrografia das formulações NC-SV e NC-0 observadas por FE-SEM; (a) NC-SV (aumento de 68 kx) e (b) NC-0 (aumento de 83 kx) (c) NC-SV (aumento 30kx) com mensuração de tamanho de partículas.....	76
Figura 15 –	Espectroscopia FTIR das formulações	77
Figura 16 –	Difratograma a 2 θ das formulações.....	78
Figura 17 –	Perfil de Liberação <i>in vitro</i> da SV livre e da formulação NC-SV em solução aquosa contendo 30% de etanol.	79
Figura 18 -	Expressão de Colágeno Tipo I nos grupos experimentais. Rebuscar.	81
Figura 19 –	Expressão de Colágeno Tipo III nos grupos experimentais	81
Figura 20 –	Fotomicrografias dos cortes histológicos, coloração HE (200x), do Peritônio Parietal dos grupos experimentais	82
Figura 21 –	Fotomicrografia de corte histológico	83
Figura 22 –	Expressão de TNF- α nos grupos experimentais	84
Figura 23 –	Expressão de IL-6 nos grupos experimentais.....	85
Figura 24 –	Fotomicrografia de imuno-histoquímica de TNF- α e IL-6 nos grupos experimentais estudados.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Formulações das nanocápsulas poliméricas contendo SV, obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado	62
Tabela 2 –	Dados da repetitividade e precisão intermediária	73
Tabela 3 –	Dados obtidos na análise de exatidão pelo método de recuperação	74
Tabela 4 –	Espessura do peritônio e Colágenos I e III	80

LISTA DE SIGLAS

AGE	Produtos de Glicação Avançada
cm	Centímetro
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DP	Diálise Peritoneal
DPAC	Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua
DRC	Doença Renal Crônica
DRX	Difração de Raio X
EE	Eficiência de encapsulação
ECM	Matriz Extra Celular
EMT	Transição Epitelial para Mesenquimal
FE-SEM	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
FTIR	Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier
g	Grama
HA	Hipertensão Arterial
HD	Hemodiálise
HE	Hematoxilina - Eosina
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
IRC	Insuficiência Renal Crônica
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
kg	Kilograma
L	Litro
m	Metro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
mOsm	Milliosmole
NC-SV	Nanocápsulas de SV
NC-0	Nanocápsulas sem SV
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PE	Esclerose Peritoneal Encapsulante
®	Marca registrada
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SV	Sinvastatina
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TG	Termogravimetria
TGF	Fator Transformador de Crescimento
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRS	Terapia Renal Substitutiva
UHPLC-DAD	Cromatografia líquida de ultra-alto desempenho com detector de matriz de fotodiodo
μ M	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVO	17
1.1.1	Geral	17
1.1.2	Específicos	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	DOENÇA RENAL CRÔNICA	18
2.1.1	Definição e classificação da doença renal crônica	18
2.1.2	Epidemiologia da doença renal crônica	19
2.1.3	Diálise Peritoneal	23
2.2	FIBROSE PERITONEAL E ESCLEROSE PERITONEAL ENCAPSULANTE	25
2.2.1	Conceito e classificação	25
2.2.2	Prevalência	26
2.2.3	Fisiopatologia	29
2.2.3.1	Fibrose	29
2.2.3.2	Colágeno	31
2.2.3.3	Citocinas	33
2.2.3.4	Fisiopatologia da Esclerose Peritoneal Encapsulante	34
2.2.4	Modelos Experimentais	39
2.3	NANOTECNOLOGIA	41
2.4	ESTATINAS	44
2.4.1	SV e Nanotecnologia	50
2.4.2	Poli (ϵ -caprolactona)	59
3	MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1	EQUIPAMENTOS	60
3.2	REAGENTES E SOLVENTES	61
3.2.1	SV	61
3.2.2	Polímero	61
3.2.3	Água purificada	61
3.2.4	Solventes e demais reagentes	61
3.3	OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO SV	62
3.3.1	Mistura física	63
3.4	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO	63
3.4.1	Limite de detecção e quantificação	63
3.4.2	Linearidade	64
3.4.3	Precisão	64
3.4.4	Robustez	64
3.4.5	Eficiência de encapsulação de nanopartículas	65
3.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	65
3.5.1	Determinação do pH	65
3.5.2	Espectrometria de difração a laser	65
3.5.3	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (<i>Field emission gun scanning electron microscopy</i> – FE-SEM)	66
3.5.4	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> – FTIR)	66

3.5.5	Difração de raios X (<i>X-ray diffraction</i> – DRX)	66
3.6	PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	66
3.7	ESTUDO <i>IN VIVO</i>	67
3.7.1	Amostra.....	67
3.7.2	Ambiente de experimentação	67
3.7.3	Indução da fibrose	68
3.7.4	Formulações contendo SV	68
3.7.5	Grupos experimentais	68
3.7.6	Coleta de Material.....	69
3.7.7	Análise do material	70
4	RESULTADOS	72
4.1	OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	72
4.2	PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR UHPLC/DAD PARA A QUANTIFICAÇÃO DO SV	72
4.2.1	Linearidade e faixa de trabalho	72
4.2.2	Precisão	73
4.2.3	Exatidão	74
4.2.4	Robustez	74
4.3	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	74
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	75
4.4.1	Espectrometria de difração a laser	75
4.4.2	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE- SEM)	76
4.4.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	77
4.4.4	Difração de raios X (DRX)	78
4.5	PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	79
4.6	ESTUDO <i>IN VIVO</i>	80
4.6.1	Avaliação da Espessura do Peritônio Parietal e Colágeno	80
4.6.2	Avaliação da Expressão de TNF- α	84
4.6.3	Avaliação da Expressão de IL-6.	85
5	DISCUSSÃO	87
6	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS.....	95
	APÊNDICE A – IDENTIFICAÇÃO DE GAIOLA	107
	APÊNDICE B – PLANILHAS DE ACOMPANHAMENTO	108
	APÊNDICE C – DESCRIÇÃO DA OPERAÇÃO	109
	APÊNDICE D – FORMULÁRIO DE ENCAMINHAMENTO	110
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO.....	111
	ANEXO B – CÁLCULO DO NÚMERO DA AMOSTRA.....	112

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é definida como anormalidade da estrutura e função renal que se mantém por três meses. Esta definição foi adotada pela Sociedade Internacional de Nefrologia, conforme proposto pelo *National Kidney Foundation–Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI)*, em 2002. (INKER *et al.*, 2014).

O diagnóstico precoce é extremamente importante para o manuseio dos pacientes portadores de DRC, pois possibilita a educação pré-diálise e a implementação de medidas preventivas que retardam ou mesmo interrompem a progressão para os estágios mais avançados da DRC, assim como diminuem morbidade e mortalidade iniciais (BASTOS, 2011). Quando a DRC chega à fase avançada, denominada Insuficiência Renal Crônica (IRC), faz-se necessário instituir alguma forma de Terapia Renal Substitutiva (TRS), que são modalidades de tratamento complexas e caras, tornando o seu custeio um desafio para todos os países, mesmo os desenvolvidos (ROMÃO JUNIOR, 2004).

Existem várias modalidades de TRS: a hemodiálise (HD), a diálise peritoneal (DP) e o transplante renal. Cada modalidade provê melhora dos sintomas da uremia, mas todas têm impacto na vida social. A DP se popularizou após a introdução da diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC). A DP envolve o transporte de solutos e de água através de uma membrana natural, o peritônio, que separa dois compartimentos, quais sejam, o sangue nos capilares e a solução de diálise na cavidade abdominal.

A DP é um bom método de TRS, especialmente nas modalidades DPAC e na diálise peritoneal automática, na qual as trocas são feitas por um sistema automatizado. A DPAC, por ser feita em domicílio, causa um menor impacto na vida social dos pacientes, proporcionando uma sobrevida equivalente à oferecida pela HD. Tem, aparentemente, vantagem nos primeiros dois anos de terapia, preservando melhor a função renal residual (STANLEY, 2010).

No entanto, a DP é sujeita a uma série de complicações, de variados tipos: mecânicas, metabólicas e infecciosas, especialmente peritonite, causa de até 16% dos óbitos que ocorrem em pacientes em DP (LI, 2010). Os maiores obstáculos para o tratamento de longo prazo em DP são as infecções e as alterações sofridas

pela membrana peritoneal exposta às soluções de diálise, alterações estas que afetam 50% dos pacientes em DP, e numa porcentagem menor deles tendo esclerose peritoneal encapsulante (PE) (TREVISANI, 2015).

A fibrose peritoneal simples é uma condição fibrosante discreta da membrana peritoneal e que ocorre após vários anos de diálise. As células mesoteliais perdem as microvilosidades e o tecido submesotelial torna-se espessado. Este espessamento discreto parece ocorrer na maioria dos pacientes submetidos à DP. Em uma pequena minoria, estas alterações escleróticas são ampliadas, de modo que os órgãos viscerais são envoltos em um casulo abdominal espesso e fibrótico. Esta forma mais grave é denominada PE. Trata-se de uma doença de alta morbimortalidade, implicando na perda do peritônio como membrana de troca e consequente mudança de modalidade de tratamento (MIHALACHE *et al.*, 2014).

Devido ao aumento do número de pacientes com IRC, conforme veremos a na revisão da literatura, aumentará o número de pacientes em DP. Por este motivo, se torna importante realizar estudos que possibilitem encontrar modos de prevenir a fibrose peritoneal, especialmente a forma encapsulante.

As estatinas podem ser usadas como fármacos capazes de modificar o curso de diversas doenças, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, existindo poucos dados a respeito do seu uso na prevenção de fibrose peritoneal.

A sinvastatina (SV) é um SV altamente lipofílico, sua solubilidade é baixa e a consequente absorção oral também (MURTAZA, 2012). Como a absorção é crítica para atingir a resposta farmacológica desejada, o emprego da nanotecnologia pode contribuir para a obtenção de melhores resultados no uso deste SV.

Assim, a hipótese alternativa deste trabalho é que o uso de nanocápsulas poliméricas contendo SV pode reduzir a fibrose peritoneal induzida por solução de diálise de forma mais eficaz que o SV puro. E, desse modo, as nanocápsulas poliméricas contendo SV podem figurar como uma estratégia futura para a prevenção e tratamento da PE, condição devastadora e de incidência crescente.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar nanocápsulas poliméricas contendo SV na fibrose peritoneal induzida em ratos.

1.1.2 Específicos

- Obter as suspensões de nanocápsulas poliméricas de poli ϵ caprolactona (PCL) contendo SV;
- Determinar a eficiência de encapsulação (EE) nas nanocápsulas, pelo método de cromatografia líquida de ultra alto desempenho com detector de matriz de fotodiodo (UHPLC/DAD);
- Caracterizar os sistemas poliméricos obtidos por meio de estudos morfológicos e espectroscópicos;
- Investigar o perfil de liberação *in vitro*, por meio de ensaios de dissolução;
- Analisar a estabilidade da SV na suspensão de nanocápsulas;
- Avaliar em um modelo animal o efeito da SV nanoencapsulada na fibrose peritoneal;
- Mensurar a ação da SV nanoencapsulada na expressão de TNF- α e interleucina-6.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

2.1.1 Definição e classificação da doença renal crônica

Os rins são órgãos fundamentais para preservação da vida. Exercem múltiplas funções fisiológicas: excreção de produtos do metabolismo e substâncias exógenas, incluindo fármacos, regulação meio interno, equilíbrio hidroeletrolítico e concentração eletrólitos, manutenção da osmolalidade, equilíbrio ácido-base. Participa, ainda, na regulação da pressão arterial, secreta, metaboliza e excreta hormônios e faz gliconeogênese.

Das funções renais, a mais óbvia é a produção de urina, processo composto de duas etapas: a filtração glomerular e o processamento do ultrafiltrado pelos néfrons. A primeira etapa é crítica, pois se não houver filtração, ou mesmo se a mesma for diminuída, a função de excreção se torna prejudicada, ou mesmo interrompida, o que ocasiona múltiplas alterações no meio interno, que, se não corrigidas, levam o organismo à morte. Esta etapa é tão importante que a sua quantificação, chamada de Taxa de Filtração Glomerular (TFG), é usada para classificar as nefropatias, conforme a mesma varie, visto que as demais funções dos rins também são prejudicadas quando ocorre queda da TFG.

Quando ocorre queda sustentada da TFG por períodos superiores a três meses, estamos diante de uma situação denominada Doença Renal Crônica (DRC), conforme definição da *National Kidney Foundation*.

Em 2012, a *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* avaliou e referendou uma recomendação de 2002 feita pela *National Kidney Foundation*, conforme mostrado no Quadro 1, para classificação da DRC (KIDNEY INTERNATIONAL SUPPLEMENTS, 2013). A mesma classificação é usada hoje, e tem como base a TFG, mas considera também a intensidade da proteinúria, que é marcador de dano glomerular.

Quadro 1 – Classificação da DRC conforme TFG e Proteinúria

Prognóstico de DRC por Categorias de TFG e albuminúria				Categorias de Albuminúria Persistente Descrição e classe		
				A1	A2	A3
				Normal ou levemente aumentada	Moderadamente aumentada	Severamente aumentada
TFG Categorias (ml/min/1,73 m ²) Descrição e classe				< 30 mg/dia	30-300 mg/dia	> 300 mg/dia
	G1	Normal ou alta	> 90 ml/min	G1 A1	G1 A2	G1 A3
	G2	Levemente reduzida	60 - 89 ml/min	G2 A1	G2 A2	G2 A3
	G3a	Leve a moderadamente reduzida	45 - 59 ml/min	G3a A1	G3a A2	G3a A3
	G3b	Moderada a severamente reduzida	30 - 44 ml/min	G3b A1	G3b A2	G3b A3
	G4	Severamente reduzida	15 - 29 ml/min	G4 A1	G4 A2	G4 A3
	G5	Falência renal	< 15 ml/min	G5 A1	G5 A2	G5 A3

DRC: doença renal crônica; TFG: taxa de filtração glomerular. Verde: baixo risco (se não há outros marcadores de doença renal, sem DRC); Amarelo: risco moderadamente aumentado; Laranja: risco alto; Vermelho: risco muito alto.

Fonte: ANDRADE (2020)

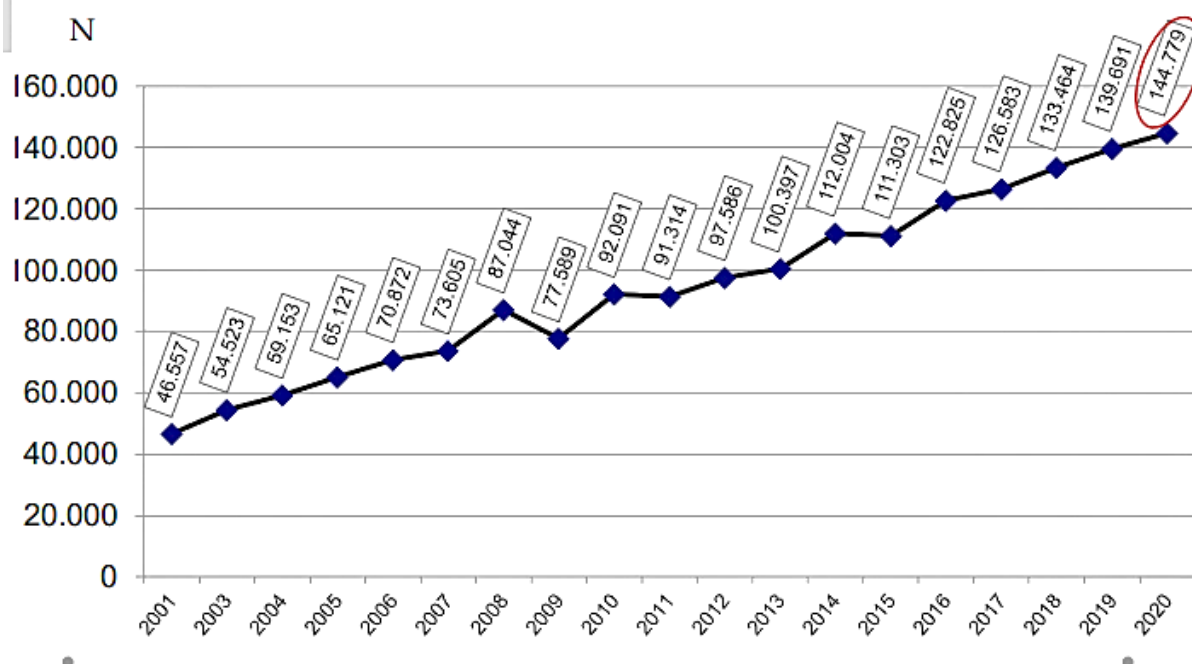
Conforme reduz a TFG, começam a acontecer alterações cada vez mais severas, que acabam impactando o organismo. Quando a TFG fica abaixo de 15mL/min, os rins são incapazes de executar suas funções, especialmente de manutenção do meio interno e equilíbrio hidroeletrolítico, sendo por isto denominada de IRC. Nesta fase, para a manutenção da vida, se faz necessária a instituição de TRS, ou seja, alguma modalidade terapêutica que substitua, ainda que parcialmente, o funcionamento renal. Existem várias formas de TRS, das quais a mais efetiva é o Transplante Renal, e as terapias dialíticas, incluindo a HD e a DP.

2.1.2 Epidemiologia da doença renal crônica

Os rins podem ser afetados por múltiplas doenças, que durante o seu curso acabam por comprometer a TFG, e ocasionar IRC. Dentre elas, destacamos o Diabetes Mellitus (DM) e a Hipertensão Arterial (HA).

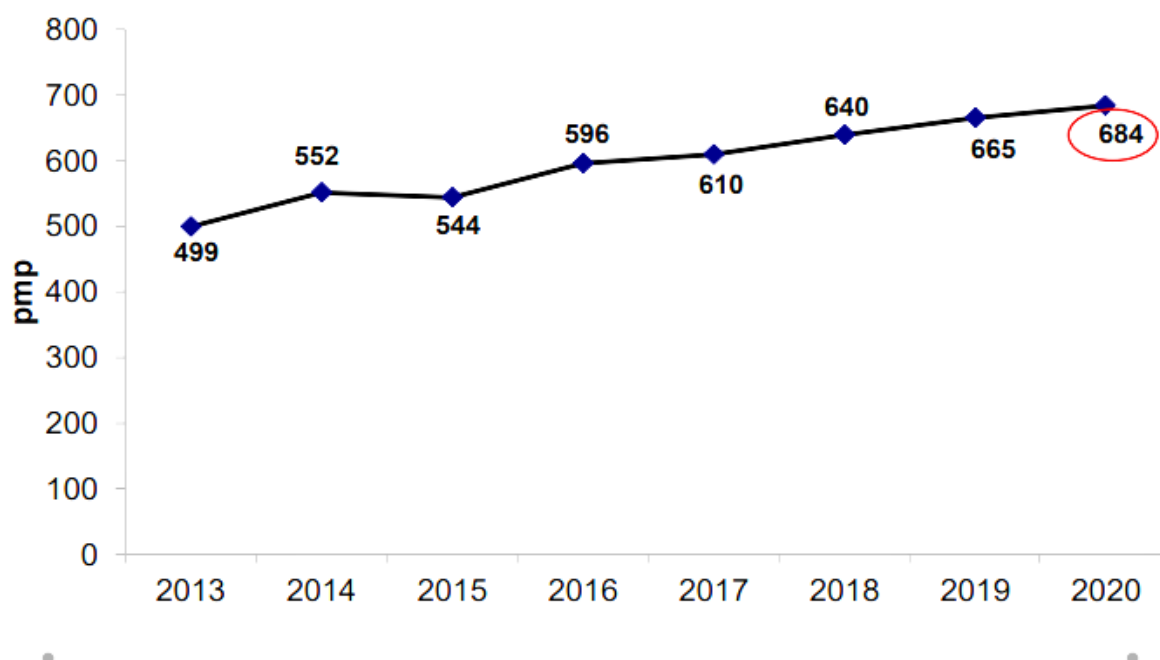
No Brasil, a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) elabora todos os anos o chamado Censo Brasileiro de Diálise, que mostra o panorama brasileiro da DRC. O número de pacientes em TRS é crescente, conforme mostrado nas Figuras 1 e 2, o que tem impactos importantes na saúde geral do país, inclusive pelo alto custo das diversas formas de TRS (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2020).

Figura 1 – Número de pacientes em TRS de 2001 a 2020



Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (2020)

Figura 2 – Prevalência de Pacientes em Diálise no Brasil por milhão de habitantes de 2013 a 2020



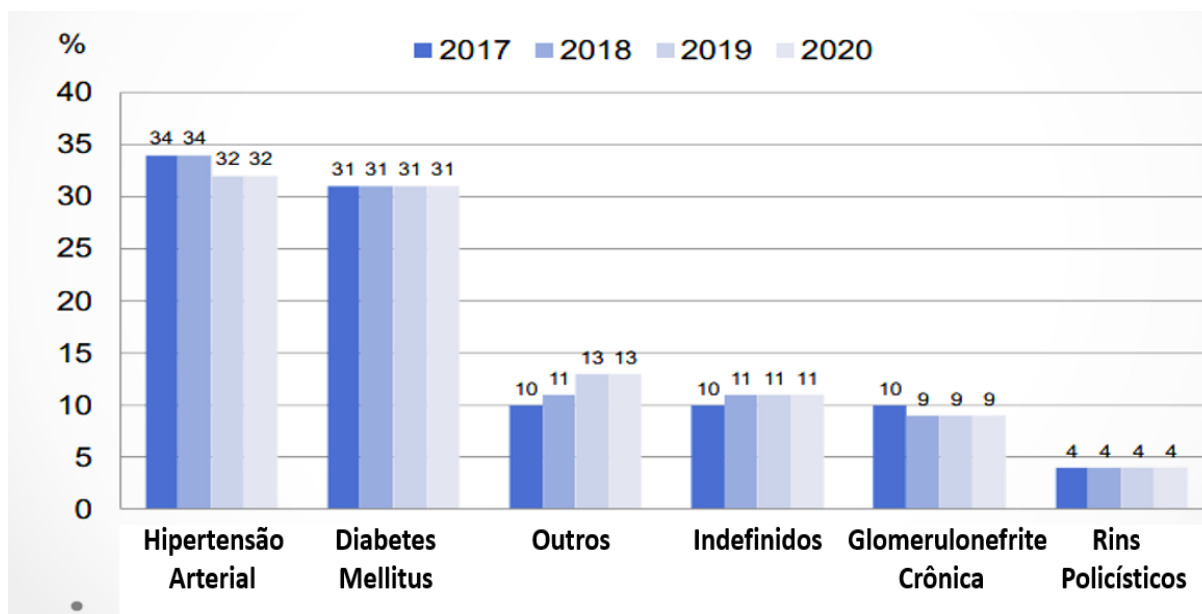
Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (2020)

Como mostrado acima, o número tem se elevado de maneira progressiva, o que pode ser explicado por diversos fatores, incluindo envelhecimento da população e pela alta prevalência de HA e DM na população geral.

No entanto, o Censo da SBN mensura relata apenas os pacientes em TRS. A prevalência de DRC é, portanto, muito maior. Estima-se que a prevalência na população de pacientes com TFG < 60 mL/min/1,73 m² seja de 6,7% (IC95% 6,0 – 7,4), sendo mais elevada em mulheres (8,2% IC95% 7,2 – 9,2) do que em homens (5,0% IC95% 4,2 – 6,0) $p < 0,001$ e em idosos ≥ 60 anos seja de 21,4% (MALTA *et al.*, 2019).

O Censo da SBN também mostra que as principais causas de IRC são o DM e a HA, conforme a Figura 3. Se considerarmos a alta prevalência de DM e HA na população brasileira, vemos que a DRC e a IRC têm a possibilidade de atingir prevalências muito mais elevadas, pois estima-se que existiam, em 2019, aproximadamente 16.000.000 (prevalência de 11,4%) de diabéticos na população entre 20 e 79 anos (IDF DIABETES, 2019). O número de hipertensos no Brasil é ainda maior. Segundo o Ministério da Saúde, em 2018, 24,7% da população que vive nas capitais brasileiras afirmaram ter diagnóstico de HA. Os novos dados do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) mostram também que a parcela da sociedade mais afetada é formada por idosos: 60,9% dos entrevistados com idade acima de 65 anos disseram ser hipertensos, assim como 49,5% na faixa etária de 55 a 64 anos (BRASIL, 2019), mas, obviamente, não se sabe quantos são os brasileiros afetados pela HA, mas que não têm diagnóstico. Isto faz prever que a prevalência da IRC será realmente crescente, panorama também observado em outros países e regiões. Também é preocupante que estas doenças podem se apresentar conjuntamente nos pacientes, o que ocorre comumente, afetando 16,2% da população brasileira com 60 ou mais anos, conforme demonstrado por Francisco (2018).

Figura 3 – Diagnóstico de Base dos pacientes em diálise no Brasil de 2016 a 2020



Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (2020)

Segundo o ERA-EDTA Registry (2019 - com levantamento dos dados de 2017) que coleta dados de 37 países europeus, a prevalência de pacientes com IRC em TRS, nas suas diversas modalidades, varia de 667 (Sérvia) a 1516,6 (Espanha, Múrcia) pacientes/milhão habitantes. Este estudo também demonstrou, mais uma vez, a baixa expectativa de vida da população em TRS. Para demonstrar isto, quando comparamos um indivíduo de 25 anos da população geral com um paciente em TRS, temos uma expectativa de vida de 57 contra 18 anos. No ano seguinte, o Registro ERA-EDTA cobriu uma população geral de 636 milhões de pessoas. No geral, a incidência de TRS para IRC foi de 129 pacientes/milhão habitantes, com uma prevalência de 897 pacientes/milhão habitantes, com 57% dos pacientes em HD, 5% em DP e 38% vivendo com um transplante renal. O mesmo levantamento mostrou que, para pacientes que começaram a diálise entre 2009–13, a probabilidade de sobrevivência não ajustada em 5 anos foi de 42,6%.

Na população norte-americana, segundo o United States Renal Data System / *Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States* (USRDS, 2019), o número de pacientes com IRC aumenta em 20.000 por ano, e a prevalência aumenta continuamente desde 2006. No final de 2017, existiam 746.557 pacientes com IRC, com uma prevalência de 2.204 pacientes/milhão de habitantes. Já no final de 2018 este número chegou a 2.242 pacientes/milhão de habitantes.

2.1.3 Diálise Peritoneal

Quando a TFG cai abaixo de 15mL/min, ou quando surgem sintomas da IRC, existe a necessidade de se iniciar alguma modalidade de TRS. Existem três modalidades de terapia: o transplante renal, a hemodiálise (HD), e a diálise peritoneal (DP).

A DP se popularizou após a introdução da diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC). A DP envolve o transporte de solutos e de água através de uma membrana natural, o peritônio, que separa dois compartimentos, quais sejam, o sangue nos capilares e a solução de diálise na cavidade abdominal. O acesso à cavidade peritoneal é feito com uso de cateteres implantáveis cirurgicamente, que permitem a infusão e drenagem das soluções utilizadas para a realização da DP.

As soluções para DP apresentam, na sua constituição, sódio, cálcio, magnésio, cloreto e lactato, além de glicose. Sua osmolalidade pode variar de 344 a 483 mOsm/L, tendo, portanto, uma osmolalidade maior que a do organismo. Esta alta osmolalidade da solução de DP é dada pelo alto conteúdo de glicose, que varia de 1,5 a 4,25%, tendo uma concentração no líquido de DP muito maior que no sangue dos pacientes em DP. A elevada concentração de glicose, e consequente alta osmolalidade do líquido de DP, é o fator principal que promove a retirada de líquidos do paciente, pois a força osmótica promove o fluxo de líquidos para a cavidade peritoneal, da qual será drenado para o meio externo. Esta retirada de líquidos ajuda corrigir a tendência à retenção de água e eletrólitos que ocorre nos pacientes com IRC. Além da glicose, também pode ser utilizada a icodextrina como substância para gerar hiperosmolalidade e promover o balanço negativo de líquidos na DP.

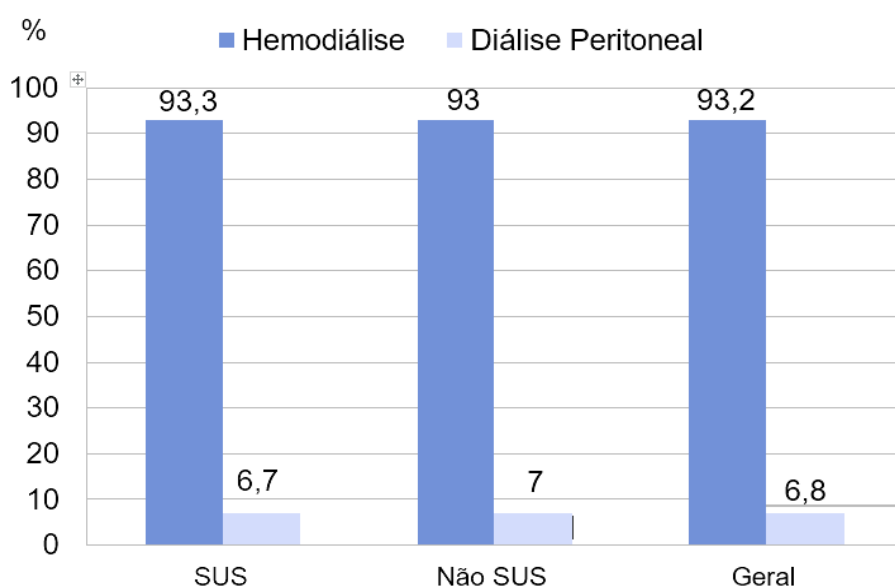
O peritônio, que na DP é o dialisador, é uma serosa formada por uma camada delgada de tecido conjuntivo frouxo, revestida por epitélio pavimentoso simples, denominado mesotélio. A porção que recobre os órgãos e tem continuidade com o mesentério é denominada peritônio visceral, e a parte que recobre a parede interna do abdome é chamada peritônio parietal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A DP é um bom método de TRS, seja na DPAC e na diálise peritoneal automática, na qual as trocas são feitas por um sistema automatizado. A DPAC, por ser feita em domicílio, causa um menor impacto na vida social dos pacientes, proporcionando uma sobrevida equivalente à oferecida pela HD.

No entanto, a DP é sujeita a uma série de complicações, de variados tipos: mecânicas, como formação de hérnias e migração do cateter; metabólicas, como dislipidemias e obesidade. Mas as principais complicações são as infecciosas, como infecção no orifício de saída do cateter na parede abdominal, e a peritonite, que é a principal complicação da DP.

A DP não é a principal modalidade de TRS. Conforme pode ser visto na Figura 4, no Brasil, 6,8% da população em TRS usa a DP como método.

Figura 4 – Porcentagem de pacientes em diálise, conforme modalidade e fonte pagadora no ano de 2020



Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (2020)

Nossa realidade não difere muito da europeia, na qual a DP é a modalidade usada por 5% da população em TRS (ERA-EDTA, 2017), nem da americana, na qual a DP é o tratamento de 7,1% da população em TRS (USRDS, 2019).

Os maiores obstáculos para a permanência por longo prazo em DP são as infecções (peritonites bacterianas) e as alterações sofridas pela membrana peritoneal, que geram perda da capacidade dialítica, por modificação tanto na difusão como na ultrafiltração, que chegam a ocorrer em quase 50% dos pacientes em DP, e tem intensidade variável, tendo como expressão máxima a esclerose peritoneal encapsulante (TREVISANI, 2015).

2.2 FIBROSE PERITONEAL E ESCLAROSE PERITONEAL ENCAPSULANTE

2.2.1 Conceito e classificação

Quando existem processos que irritam o peritônio, como ocorre nas peritonites infecciosas, pode existir, no curso do processo inflamatório, um processo de fibrose. O Quadro 2 exibe uma série de causas de fibrose peritoneal.

Quadro 2 – Causas de Esclerose Peritoneal Encapsulante

Etiopatogenia	Causas Específicas
Fármacos	Betabloqueadores (practolol, timolol, propranolol) Quimioterápicos (metotrexate) Asbestos
Procedimentos médicos e cirúrgicos	Diálise peritoneal Derivação peritônio venoso – LeVeen Derivação ventrículo peritoneal Trauma Quimioterapia intraperitoneal Transplante hepático Lavagem peritoneal com povidine Pós transplante: renal, hepático e intestinal
Infecção	Tuberculose peritoneal Peritonite por citomegalovírus Peritonite por parasitas Peritonite recorrente
Inflamatória/Autoimune	Sarcoidose Lúpus eritematoso sistêmico Febre familiar do Mediterrâneo Corpos estranhos Peritonite por mecônio
Doenças outras	Cirrose hepática Malignidade gastrointestinal: pancreática, neuroendócrina. Malignidade renal Endometriose Ruptura de cisto dermoide Ovário luteinizante Linfomas Adenomiose Leiomioma
Sistêmicas	Deficiência de Proteína S

Fonte: Adaptado de Machado (2016); Singhal *et al.* (2019).

A solução de DP é também um irritante para o peritônio, seja pela sua osmolalidade, pelo alto conteúdo de glicose, ou de icodextrina, e também pelo pH, que varia de 5,0 a 6,5. Além da solução, outro fator crítico é a ocorrência eventual de peritonite infecciosa, como complicação da DP. Deste modo, não é surpreendente que pacientes em DP possam apresentar, ao longo do tratamento, quadros de fibrose peritoneal, que como dito anteriormente tem intensidade variável.

A *International Society of Peritoneal Dialysis* define PE como uma entidade clínica caracterizada por obstrução intestinal persistente, intermitente ou recorrente, associada com espessamento, esclerose, encapsulação ou calcificação, com ou sem presença de marcadores de inflamação (KAWAGUCHI *et al.*, 2000).

A PE pode ser classificada conforme a gravidade dos sintomas em quatro estágios, conforme Moinuddin *et al.* (2015), que usam mesma classificação de Nakamoto, de 2005.

- Estágio 1 – Pré PE – assintomático, com ascite mínima e sem inflamação.
- Estágio 2 – Inflamatório – paciente sintomático, presença de náuseas e diarreia, condizente com encapsulação parcial das alças intestinais e edema das mesmas. Existe presença de exsudação e fibrina.
- Estágio 3 – Encapsulação – presença de sintomas obstrutivos, formação de casulos fibróticos envolvendo as alças. Presença de inflamação moderada a severa.
- Estágio 4 – Obstrução crônica. Presença de obstrução absoluta, com formação definida de casulos fibrosos. Presença de pouca ou nenhuma inflamação residual.

2.2.2 Prevalência

O primeiro relato de PE em DP foi feito por Ghandi, que descreveu cinco pacientes em DP que foram submetidos à laparotomia por motivos variados, e nos quais foi encontrado espessamento peritoneal (GANDHI *et al.*, 1980).

A prevalência da PE aumenta conforme o tempo de permanência do paciente em DP. Rigby e Hawley (1998), num estudo retrospectivo, encontraram prevalência de 6,4% e 19,4%, respectivamente, aos cinco e oito anos em DP.

Korte *et al.* (2011), em um estudo multicêntrico, retrospectivo, caso controle, que envolveu 2.022 pacientes, mostraram que a prevalência de PE foi de 2,7%,

correspondendo a 61 casos. A PE foi causa importante de transferência de DP para HD. Durante o estudo, 34 pacientes com PE foram a óbito, e em 30 destes casos o óbito foi relacionado a esta doença. Foram encontrados como fatores de risco para o seu desenvolvimento: tempo em DP, a idade, a falência de ultrafiltração, o uso de icodextrina e a realização de transplante renal.

Mais recentemente, Tseng *et al.* (2018) publicaram um estudo retrospectivo envolvendo 3.202 pacientes, acompanhados de janeiro de 1982 a setembro de 2018, atendidos em três centros de diálise em Taiwan. Foram encontrados 58 casos de PE, com uma prevalência de 1,8%. A incidência de PE aumentou conforme o tempo de DP. Os pacientes em DP, por mais de 10 anos, quando comparados àqueles em DP por 6 anos, tiveram risco relativo de 5,5, com 95% de CI: 1,7 ± 17,1, $p < 0,01$. Dos pacientes do PE, 23 tiveram forma severa. A mortalidade da PE foi de 35% no geral, sendo de 74% naqueles com forma severa.

O surgimento dos sintomas pode ocorrer durante o tempo em DP, mas pode ocorrer de modo muito tardio, conforme relatado por Devenport (2015), que descreveu 4 casos, nos quais o diagnóstico foi feito após 5 anos, e um caso cujo diagnóstico ocorreu após 10 anos, após cessação de DP. Também Ayar *et al.* publicaram uma série de 12 casos de PE em 47 pacientes que receberam TX renal após estarem em DP, sendo que, em 75% dos casos, ocorreram sintomas obstrutivos. (AYAR *et al.*, 2018).

A PE pode também ocorrer em crianças em DP. Conforme estudo publicado por Vidal *et al.* (2013), que revisou 712 pacientes com idades entre 0,6 e 14,4 anos, submetidos à DP entre 1986 a 2011, foi encontrada uma prevalência de 1,9%. O *European Paediatric Dialysis Working Group* publicou um estudo que envolveu 1.472 pacientes, com 2.529 pacientes/ano em DP, mostrou uma prevalência de 1,5%, ou 8,7 casos por 1.000 pacientes/ano (SHROFF *et al.*, 2013).

No entanto, ao analisarmos os estudos de prevalência de PE, temos que levar em conta que o diagnóstico desta condição não consta com um teste de triagem para detectar casos leves, ou assintomáticos, o que explica os casos diagnosticados anos após a cessação da DP (NITSCH; DAVENPORT, 2015). Assim, a real prevalência da PE pode ser maior que a reportada.

O diagnóstico da PE pode ser tardio, como visto anteriormente, mas métodos de diagnóstico por imagem podem fornecer achados importantes. Singhal *et al.* (2019) publicaram uma revisão sobre os achados de imagem da PE.

Segundo estes autores, os principais métodos de imagens e seus achados são mostrados abaixo:

1. Raio-X simples de abdome: geralmente normal. Pode aparecer calcificação no peritônio. Se houver obstrução intestinal, ou perfuração, os achados são compatíveis com estas complicações, mas inespecíficos para PE.
2. Estudos baritados: eram usados no passado. Podem mostrar alteração de motilidade, com partes do intestino com retardo do trânsito, e partes com aceleração. Um achado mais típico é imagem em serpentina, com alças fixas em forma de U que parecem rígidas.
3. Ultrassonografia: EUA mostram aglomeração de alças intestinais no centro do abdome. As alças intestinais podem mostrar espessamento, ou pode ser hiperecoico. Contudo, a vascularização na imagem de fluxo Doppler colorido é geralmente preservado. Um arranjo característico de *loops* de forma concertina com um estreito base posterior é altamente sugestiva de PE. Portanto, a aparência geral se assemelha à de uma couve-flor, que é melhor demonstrada quando há ascites moderadas coexistentes. A aparência da membrana “trilaminar” tem sido descrita como característica da PE: da superfície para profundidade temos: (a) uma membrana hiperecoica superficial; (b) uma camada hipoecoica média do intestino; e (c) uma profunda camada hiperecoica do intestino.
4. Tomografia Computadorizada (TC): atualmente, a TC se tornou a base para o diagnóstico da PE. A administração intravenosa de contraste geralmente é suficiente para fornecer informações. Normalmente, o peritônio é fino, suave e quase imperceptível. Na PE, o mesmo é espessado, com intensificação contínua, e uma espessura superior a 2 mm, que parece ser um ponto de corte razoável. As alças intestinais tendem a se reunir no centro da cavidade abdominal. O uso de contraste baritado pode ser útil para evidenciar obstrução. Ascite loculada pode ser vista e quantificada. Pode existir calcificação focal ou difusa. Dependendo das complicações, como obstrução intestinal ou perfuração, outros achados vão aparecer. Embora possam ser propostos esquemas de pontuação, eles não são muito úteis.

5. Ressonância magnética (RM): mostra os mesmos achados da TC, não apresentando vantagens adicionais. Considerando o risco do uso de meios paramagnéticos em pacientes com IRC, a RM tem uso limitado nesta população.
6. Tomografia por emissão de pósitrons (PET): embora o uso de 18 flúor-hidro-glucose possa mostrar inflamação na PE, o PET não oferece vantagem no diagnóstico quando comparado aos outros métodos, especialmente na fase tardia, quando a inflamação pode estar ausente. (SINGHAL *et al.*, 2019).

No entanto, embora os achados de imagem ajudem, o diagnóstico depende de uma constelação de achados clínicos e de imagem (UPPONI *et al.*, 2014). Além do diagnóstico, os exames de imagem, especialmente a TC, permitem planejamento do tratamento adequado e evitam abordagens cirúrgicas desnecessárias (KADOW *et al.*, 2014)

2.2.3 Fisiopatologia

2.2.3.1 Fibrose

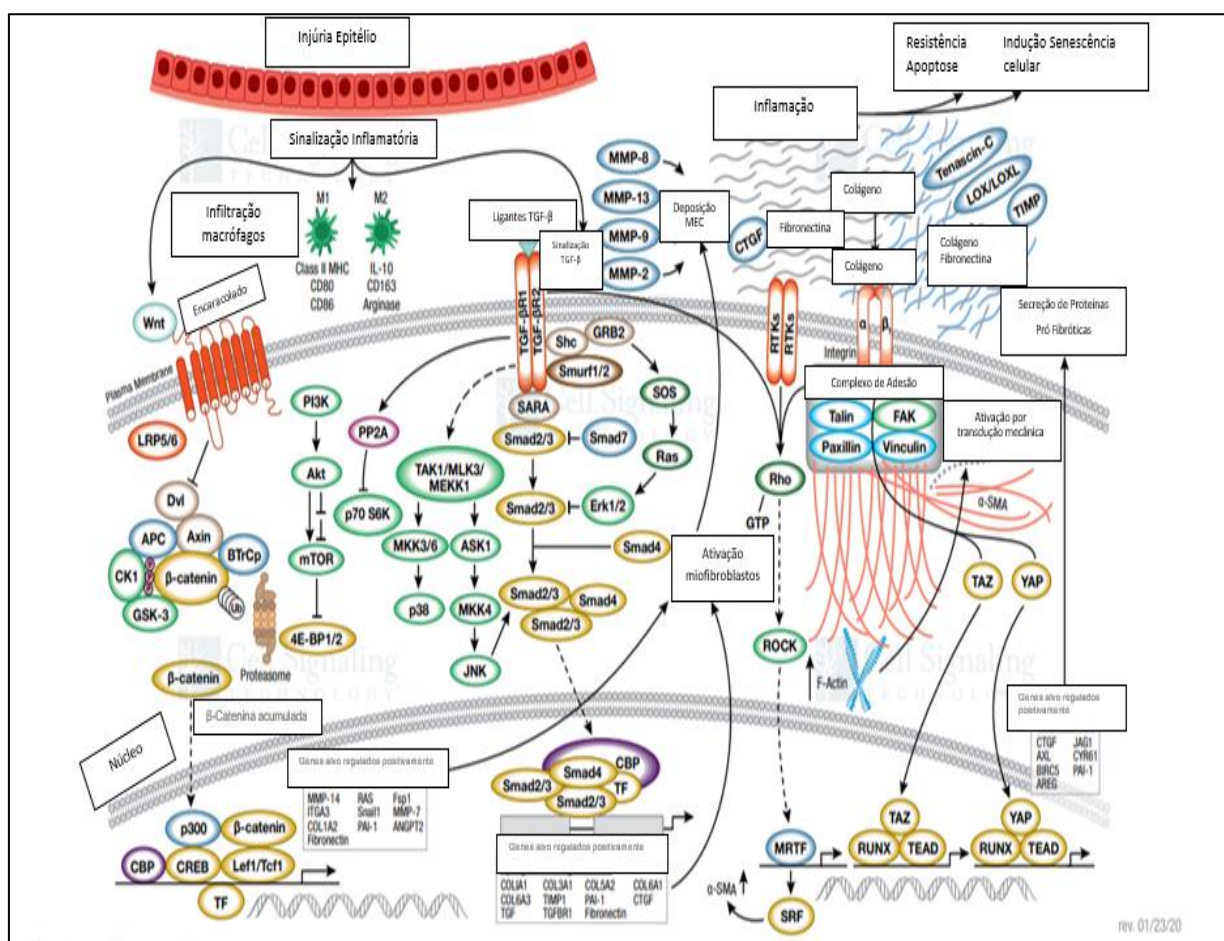
A fibrose é a cicatrização e o endurecimento do tecido causados pela deposição excessiva de proteínas da matriz extracelular (ECM) por miofibroblastos em resposta à inflamação crônica. Uma variedade de estímulos nocivos □ incluindo toxinas, patógenos infecciosos, reações autoimunes e estresse mecânico □ são capazes de induzir uma resposta celular fibrótica. A fibrose pode afetar todos os tecidos do corpo e, se não for controlada, pode resultar em falência de órgãos e morte (WYNN; RAMALINGAN, 2012).

Em resposta ao dano ao tecido, os miofibroblastos (derivados de uma série de fontes, incluindo fibroblastos residentes, células mesenquimais, fibrócitos circulantes e a transdiferenciação de outros tipos de células) iniciam uma resposta de cicatrização de feridas, remodelando o ambiente extracelular para restaurar a integridade do tecido e promover a substituição de células parenquimatosas. Normalmente, esse programa pró-fibrótico é desativado conforme o tecido cicatriza. No entanto, insultos e lesões persistentes resultam na desregulação desse processo, levando à deposição patologicamente excessiva de proteínas da ECM e, em conjunto

com a atividade de miofibroblastos regulados positivamente, cria um ambiente inflamatório crônico com infiltração de macrófagos e células imunes. Nesse meio celular, citocinas e fatores de crescimento são abundantemente liberados, incluindo membros da família do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e Wingless / Int-1 (Wnt1), que atuam como os principais efetores do processo fibrótico. TGF- β e Wnt1 se ligam a seus receptores de superfície celular cognatos e iniciam a sinalização à jusante, levando à translocação nuclear de moduladores transcricionais Smad2 / 3 e CBP / β -Catenina, respectivamente. Isso resulta na expressão regulada positivamente de genes alvo que funcionam para aumentar ainda mais a diferenciação de miofibroblastos e a produção e secreção de proteínas de ECM, incluindo colágeno, laminina e fibronectina (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, 2020).

A Figura 5 detalha a complexa fisiopatologia dos eventos de fibrose.

Figura 5 – Modelo da fisiopatologia da fibrose



Fonte: CELL SIGNALING TECHNOLOGY (2020).

2.2.3.2 Colágeno

A seguir, apresentamos uma revisão sobre o colágeno, baseada em Sorushanova (SORUSHANOVA *et al.*, 2018).

O colágeno é a principal molécula da matriz extracelular (ECM) que se auto monta em fibrilas estriadas cruzadas, fornece suporte para o crescimento celular e é responsável pela resiliência mecânica dos tecidos conjuntivos. É uma estrutura supramolecular complexa e ocorre em morfologias altamente diversas em diferentes tecidos, emprestando-lhes uma gama de funções biológicas. Sendo o componente estrutural fundamental dos tecidos conjuntivos, desempenha um papel fundamental na manutenção de sua integridade estrutural e biológica. Corresponde a toda uma família de glicoproteínas que são caracterizadas por três características exclusivas.

A primeira é a sequência de repetição de aminoácidos [Gly-X-Y] n , com e sem interrupções. A segunda característica é a ocupação das posições X e Y pela prolina e sua forma hidroxilada, hidroxiprolina, respectivamente. Em terceiro lugar, a tripla hélice destra é formada por três cadeias α de poliprolina canhotas de comprimento idêntico, o que dá ao colágeno uma estrutura quaternária única. Algarismos romanos são usados para indicar o tipo e as letras gregas para identificar as cadeias, bandas e componentes de peso molecular mais alto. A natureza trimérica de uma molécula de colágeno permite a combinação de três cadeias pró- α idênticas ou de duas cadeias idênticas e uma outra com comprimento adequado e registro de propeptídeo C, ou mesmo de três cadeias diferentes para formar uma hélice tripla completa. O ajuste das respectivas pró-cadeias α , conforme definido pelo seu comprimento, interrupções correspondentes (se houver), o registro correto dos propeptídeos C e sua combinação, delineia diferentes tipos de colágeno. No entanto, existem isoformas dentro de cada tipo de colágeno. Por exemplo, a maior parte do colágeno tipo I existe como heterotrímero de duas cadeias α_1 e uma cadeia α_2 , mas também como homotrímero de três cadeias α_1 . Muitos tipos de colágeno, como o colágeno tipo II, tipo III ou tipo VII, existem exclusivamente como homotrímeros. Na outra extremidade do espectro está o colágeno IV, onde seis cadeias α diferentes estão disponíveis para combinação para produzir um número considerável de isoformas que formam as membranas basais específicas do tecido.

Embora alguns dos 29 tipos de colágeno atualmente identificados mostrem características altamente exclusivas, a maioria deles parece altamente inter-

relacionada, mas confinada a locais específicos do tecido. Com base em sua estrutura primária, o comprimento do domínio da hélice tripla, o peso molecular, o perfil de carga ao longo da hélice, as interrupções da hélice tripla, o tamanho e a forma dos domínios terminais, a clivagem ou retenção destes últimos no agregado supramolecular e variação nas modificações pós-tradução, quatro grupos abrangentes de colágeno podem ser identificados

O Grupo 1 hospeda o colágeno formador de fibrilas tipo I, tipo II, tipo III, tipo V, tipo XI, tipo XXIV e tipo XXVII. Todos eles possuem hélices triplas com trechos Gly-X-Y ininterruptos de, aproximadamente, 300 nm de comprimento.

O Grupo 2 hospeda o colágeno da membrana basal tipo IV, tipo VII e tipo XXVIII. Enquanto o colágeno tipo IV forma uma rede fibrilar, o colágeno tipo VII é criado por meio da associação de dímero antiparalelo e forma fibrilas estriadas cruzadas com um padrão de bandas diferente.

O Grupo 3 contém o colágeno de cadeia curta tipo VI, tipo VIII e tipo X. Eles são nomeados após suas regiões de hélice tripla, que se estendem por até 100 nm e 150 nm, respectivamente.

O Grupo 4 contém colágenos com múltiplas interrupções de seus trechos de hélice tripla Gly-X-Y. O colágeno tipo IX, tipo XII, tipo XIV, tipo XVI e os tipos XIX a XXII compreende os colágenos associados às fibrilas com hélices triplas interrompidas (SORUSHANOVA *et al.*, 2018).

O Quadro 3 mostra as características dos colágenos I e III.

Quadro 3 – Características dos Colágenos I e III.

Tipo	Cadeias	Arranjo Molecular	Estrutura Supramolecular	Massa Molar Cadeia α	Distribuição Tecidual
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ heterotrímero	Monômeros escalonados 67 nm	Fibrilas com faixas de 67 nm de grande diâmetro	95	Pele, tendão, ligamento, córnea, cápsulas de órgãos, dura-máter do cérebro e medula espinhal, osso
I	$[\alpha 1(I)]_3$ Homotrímero	Monômeros escalonados 67 nm	Fibrilas com faixas de 67 nm	95	Tumor, derme, osso
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Monômeros escalonados 67 nm	Fibrilas com faixas de 67 nm de diâmetro pequeno	95	Derme, aorta, útero, mistura no tendão, intestino, vasos sanguíneos, no tecido conjuntivo reticular do fígado, baço e órgãos internos circundantes

Fonte: Adaptado de Sorushanova *et al.* (2018)

A maioria dos tecidos flexíveis (pele, intestino, vasos sanguíneos, pulmão) tem uma razão I:III de 2—3 para 1, enquanto os tecidos rígidos (osso, tendão) contêm apenas colágeno Tipo I (HANCE; CRYSTAL, 1977).

Na fibrose peritoneal, ocorre o acúmulo de proteínas (colágeno I, III, V, VI, fibronectina, tenascina) no interstício, com aumento número de fibroblastos, alguns deles com miofibroblastos características e infiltração de células mononucleares. Na membrana basal, geralmente há acúmulo de colágeno IV e laminina e proteoglicanos e polissacarídeos e glicoproteínas também estão presentes extracelularmente (LOUREIRO *et al.*, 2013).

2.2.3.3 Citocinas

Citocinas, conforme revisão de Akdis *et al.* (2016), são polipeptídios produzidos em resposta a microrganismos e outros antígenos, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias. Atuam no crescimento e diferenciação de linfócitos, ativação das células efectoras desenvolvimento de células hematopoiéticas.

A secreção das citocinas é um evento breve e autolimitado. As ações das citocinas são frequentemente pleiotrópicas e redundantes, podendo influenciar a síntese de outras citocinas de forma antagônica ou sinérgica. Iniciam suas ações pela ligação a receptores de membrana específicos nas células-alvo. As respostas celulares às citocinas são firmemente reguladas e existem mecanismos inibidores por feedback para diminuir estas respostas.

Ainda segundo Akdis, as interleucinas (IL) são um tipo de citocina. São proteínas que se ligam a receptores específicos e têm papel fundamental na comunicação entre leucócitos. Sua nomenclatura tem evolução constante e são classificadas em famílias, baseadas na homologia, semelhanças dos receptores ou propriedades funcionais. Praticamente todas as células que têm participação nos processos imunes, incluindo CD4, CD8, células B e T, Natural Killer, e dendríticas, têm receptores para as IL em diferentes padrões.

A IL-6 é um membro de uma família das IL, que inclui também Fator Inibidor da Leucemia, Fator Neurotrópico Ciliar e Oncostatina M. Sua estrutura é um homodímero, com massa molar de 16 a 26 kDa. Sua ligação ocorre com o fator de Ligação da IL-6 (binding chain - IL-6Ra). A IL-6 é multifuncional, estando

envolvida na regulação da resposta imune, resposta de fase aguda, hematopoese e também na inflamação. É produzida por células endoteliais, fibroblastos, monócitos e macrófagos, em resposta a diversos estímulos, incluindo outras citocinas (IL-1, IL-17, e TNF- α), durante processos inflamatórios. Promove migração e ativação de leucócitos, induz a produção de proteínas de fase aguda, bem como proliferação de células T, diferenciação de células B, e ainda a produção de IgG, IgA e IgM. Tem, também, participação de processos alérgicos.

O Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) é uma importante citocina que tem participação nos mecanismos de defesa imune, inflamação e apoptose. Sua estrutura é um homotrímero, tem massa molar de 26kDa quando ligada à membrana, e 17kDa na forma solúvel. Atua como mediador pró-inflamatório, iniciando o processo, e imunossupressor, inibindo desenvolvimento de autoimunidade, carcinogênese, tendo papel também na limitação de intensidade e duração do processo inflamatório. Níveis sistêmicos elevados de TNF- α podem levar ao choque séptico, e aumentos localizados ocasionam todos os sinais cardinais da inflamação: calor, edema, hiperemia, dor e perda de função.

2.2.3.4 Fisiopatologia da Esclerose Peritoneal Encapsulante

Trevisani (2015) publicou uma revisão sobre a Fibrose Peritoneal e a PE. Exposição a fluidos não biocompatíveis, episódios de infecção, bacteriana e fúngica, ou hemoperitônio, induzem inflamação aguda e crônica que pode causar danos ao tecido peritoneal. O sucesso do reparo de tecido lesionado requer uma resposta controlada, para limitar a alteração estrutural. A resposta imune peritoneal à lesão, ou infecção, envolve, entre outras células, macrófagos mesoteliais e residentes que funcionam de forma coordenada para recrutar células inflamatórias, incluindo células mononucleadas, fagócitos, linfócitos e neutrófilos.

As células podem produzir um grande número de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, para estabelecer uma rede complexa que retroalimenta e resulta em inflamação aguda ou crônica, que leva à deterioração da membrana. Muitos desses mediadores inflamatórios, como TNF- β , IL-1, IL-8, Fator Transformador de Crescimento β (TGF- β) e Fator de Crescimento Fibroblástico 2 (FGF-2), podem ter um papel na fibrose peritoneal por estimulação de fibroblastos residentes, proliferação e depósitos de matriz extracelular, induzindo

transformação epitelial da célula mesotelial mesenquimal, que aumenta ainda mais o número de fibroblastos peritoneais.

Além disso, ainda segundo Trevisani, a IL-8, FGF-2 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) podem induzir um aumento no número de capilares na membrana peritoneal, e provavelmente aumenta a permeabilidade dos vasos, causando um aumento de transporte de pequenos solutos, que produz uma falha na ultrafiltração, mesmo na ausência de infecção ou hemoperitônio. Acredita-se que pacientes com fibrose podem ter inflamação crônica de baixo grau que promove uma alteração estrutural progressiva da membrana peritoneal. Além da glicose, os produtos formados por condensação entre grupos amino reativos à glicose e às proteínas podem promover inflamação peritoneal através de um mecanismo dependente da leptina. Nesse contexto, os adipócitos que são expostos à glicose produzem leptina, que, por sua vez, promove a produção de TGF- β por células mesoteliais.

Mesmo na ausência de DP, ainda segundo Trevisani, os pacientes com IRC podem apresentar inflamação no peritônio, causada pela uremia em si, mas os pacientes têm como fator adicional os danos causados pela solução empregada na terapia. As soluções de DP, seja pela glicose, seja pela presença de produtos dos resultados da esterilização da glicose por calor (caramelização), ou ainda pelos produtos de sua degradação, têm ação direta no peritônio. A glicose aumenta o fator de síntese TGF- β , Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo (CTGF), dependendo da dose e do tempo. Os produtos de glicação avançada (AGE) também desempenham um papel importante. Estes promovem a expressão de vários fatores de crescimento, entre outros, o VEGF, aumentando permeabilidade vascular e angiogênese. Além disso, diminuem a expressão proteica de junções estreitas como ZO-1, occludina e claudina-1. Além disso, o pH e o tampão lactato também são agentes diretos.

Quando ocorre infecção bacteriana aguda, existe aumento rápido de células no efluente peritoneal, neutrófilos e monócitos, e destruição progressiva de células mesoteliais. Os níveis de IL-1, IL-6 e TGF- β aumentam desde o primeiro dia. Atividade inflamatória pró de citocinas e fatores de crescimento esclerosantes permanece alto até 6 semanas depois de remissão do episódio de peritonite.

Macrófagos residentes aumentam acentuadamente com uma peritonite bacteriana e são capazes de gerar liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 e TNF- α .

As células mesoteliais são as células biologicamente ativas contra a exposição a líquidos hipertônico e podem aumentar a produção de peróxido de hidrogênio. Eles são altamente sensíveis ao pH da solução de DP, que é ácido, estimulando a produção de TGF- β .

Receptores de AGE (RAGE) servem para remover, mas o ligante RAGE serve para ativar a via de fatores como Fator Nuclear kappa B (NF-kB) e multiplicar, em cascata, a atividade mitogênica da proteinoquinase, desencadeando processos de fibrose.

A exposição do mesotélio a soluções estéreis de diálise peritoneal leva à transformação epitélio mesenquimal das células mesoteliais. Foi demonstrado transição de células mesoteliais do epitélio às células do tipo fibroblasto progressivamente e contínua, perda de marcadores como ICAM 1 e alteração de citoqueratina e células mesoteliais da camada “tipo paralelepípedo” ao tipo de fibroblasto nessa camada. Além disso, esta transformação está associada a estímulos e distúrbios angiogênicos no transporte e de ultrafiltração. Tanto a angiogênese quanto fibrose estão ligadas às citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. A maioria das mudanças observadas no tecido peritoneal dos pacientes consiste em aumento do submesotélio associado ao espessamento com fibrose peritoneal e angiogênese.

Os fibroblastos representam uma população dinâmica de células que pode mostrar diversidade fenotípica. Entre os vários fenótipos, os miofibroblastos são os mais importantes. O termo miofibroblasto define uma célula com características intermediárias entre um fibroblasto e uma célula muscular lisa e é caracterizada pela expressão da actina do músculo alfa-liso (alfa-SMA). Os miofibroblastos foram relatados como importantes protagonistas de quase todas as situações de reparo e fibrose em várias patologias. Devido à sua capacidade de sintetizar matriz extracelular, fatores de crescimento, citocinas e participação na resposta inflamatória, bem como por suas propriedades contráteis, destaca-se o papel do fibroblasto, sendo o fenótipo mais importante o 34.

A transformação de uma célula epitelial em uma célula mesenquimal é um complexo de estágios. O processo requer alterações na arquitetura,

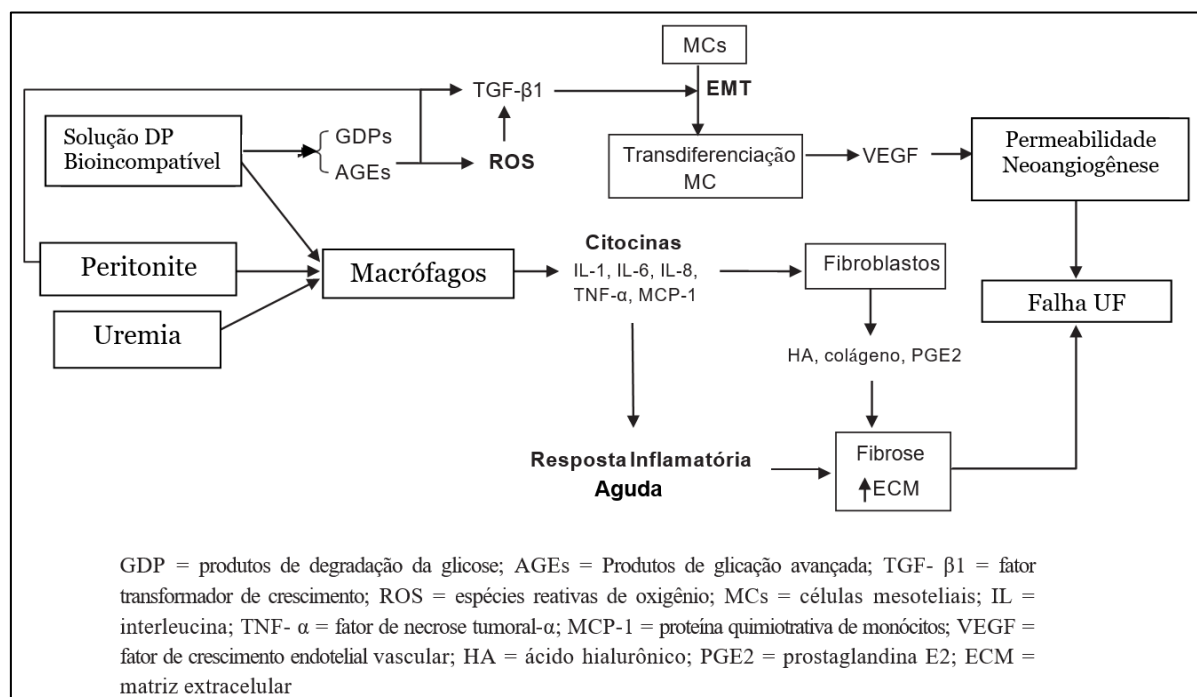
reprogramação celular e profunda reprogramação molecular com novas instruções bioquímicas. Começa com a dissociação de junções intercelulares, como Caderina-E, claudinas, ocludinas, occludens-1, desmoplaquina, e com a perda de microvilosidades e polaridade apical-basal. Então, as células adotam uma polaridade reversa como resultado da reorganização do citoesqueleto, adquirem expressão de alfa-SMA e aumentam a capacidade migratória.

A morfologia do peritônio normal é simples, com uma única camada de células mesoteliais que cobre uma região submesotelial composto de tecido conjuntivo com poucos fibroblastos e alguns vasos. No peritônio, miofibroblastos normais não estão presentes, enquanto fibroblastos residentes mostram intensa expressão de CD34, um antígeno que é característico das células-tronco da medula óssea. Fibroblastos peritoneais não expressam marcadores de fibrócitos, o que sugere que são simplesmente células residuais do mesênquima embrionário que permaneceram no tecido peritoneal após organogênese. Em pacientes com fibrose peritoneal, há muitas anormalidades estruturais da membrana peritoneal, incluindo perda de células mesoteliais monocamada, aumento do número de fibroblastos e fibrose submesotelial.

Os miofibroblastos podem se originar de fibroblastos residentes ativados, a partir de células (fibrócitos circulantes) e de células mesoteliais através de uma transição epitelial para mesenquimal (EMT). Miofibroblastos peritoneais expressam VEGF, matriz extracelular (ECM) e ciclooxygenase-2 (COX-2), o que indica que essas células estão envolvidas em alterações estruturais peritoneais que são induzidas por DP. A capacidade de degradar a membrana basal e invadir o estroma fibrótico depende da regulação positiva da expressão de metaloproteinases da matriz (MMP). Outros marcadores moleculares envolvidos na transformação mesenquimal incluem regulação citoqueratinas descendentes, e regulação vimentina ascendente, N-caderina e o fator de transcrição, e aumento da produção de componentes da matriz extracelular.

Ditsawanon e Aramwit (2015) propuseram um esquema para mostrar o processo fisiopatológico da PE, expresso na Figura 6.

Figura 6 – Processo fisiopatológico da PE



Fonte: Adaptado de Ditsawanon e Aramwit (2015).

Como os mecanismos envolvidos na PE não estão completamente elucidados, a busca por melhor entendimento fisiopatológico continua. Ossorio *et al.* (2018) publicaram um artigo sobre a quimiocina humana CCL18, que está envolvida em distúrbios fibróticos progressivos. Ela está presente no efluente de pacientes tratado com DP, e níveis elevados são capazes de prever o desenvolvimento de fibrose; pacientes com DP com baixos níveis sustentados de CCL18 peritoneal têm menor risco de desenvolver disfunção da membrana peritoneal. Verificou-se que as concentrações peritoneais de CCL18 aumentam durante o curso da peritonite bacteriana infecciosa em paralelo com o aumento da infiltração de macrófagos. Os níveis da CCL18 no efluente também foram elevados na peritonite eosinofílica, e os eosinófilos expressam CCL18.

Recentemente, foi evidenciada a participação da IL-17, que é produzida por células imunes infiltradas no peritônio lesado. A mesma pode contribuir para alterações adicionais, incluindo angiogênese, diferenciação celular e fibrose. (MARCHANT *et al.*, 2020).

2.2.4 Modelos Experimentais

Os estudos experimentais sobre fibrose peritoneal, conforme veremos abaixo, são feitos usando-se diversas substâncias para induzir o surgimento da fibrose e para modificar a sua evolução, incluindo modificação da composição das soluções usadas, ou utilizando alguma substância que possa diminuir a fibrose.

Ishii *et al.* (2001) desenvolveram um modelo de estudo em camundongos, usando injeção intraperitoneal de gluconato de clorexidina 0,1% e etanol 15% dissolvidos em solução salina, na dose de 0,3 ml diariamente, usando solução salina tamponada no grupo controle. Os animais foram acompanhados por até 56 dias. Todos os animais do grupo que usou clorexidina e álcool desenvolveram esclerose peritoneal encapsulante. Este estudo validou para camundongos um modelo desenvolvido por Suga *et al.* (1995), que estudaram PE em ratos, incluindo uso de pirfenidona, com o objetivo de prevenir fibrose. Todos estes estudos usaram injeção intraperitoneal diária, após punção da parede feita com agulha, evitando-se o uso de cateter implantado no peritônio, o qual, por si só, pode induzir à reação inflamatória, conforme demonstrado por Flessner *et al.* (2007).

Baroni *et al.* (2012) utilizaram o modelo de infusão de solução de diálise através da punção diária do peritônio, com o objetivo de avaliar a influência da SV na fibrose induzida por solução de DP. Utilizando o mesmo modelo, Schuinski *et al.* (2013) estudaram a influência do captopril na fibrose induzida por solução de DP.

Yeniçerioglu *et al.* (2010) estudaram o efeito da atorvastatina em ratos Wistar albinos não urêmicos. Foram randomizados em três grupos: *sham* (solução salina intraperitoneal), solução de diálise peritoneal (DP) a 3,86% e tratamento (TT) (solução DP 3,86%, mais atorvastatina adicionada à água potável na dose de 80 mg/mL). Teve como principais achados uma inflamação mais intensa, fibrose e proliferação vascular grupo DP do que no grupo *sham* e que pareceu diminuir significativamente quando a atorvastatina foi usada em conjunto com a DP. Além disso, o peritônio foi significativamente mais espesso no grupo DP quando comparado aos grupos *sham* e TT. A atividade do dialisato da glutatona redutase e TGF- β foi significativamente menor no grupo TT do que no grupo DP, enquanto o nível de IL-6 no dialisado foi maior no grupo TT. No entanto, conforme anotado pelos próprios autores, este estudo tem como limitações falta de quantificação do fármaco

ingerida por cada rato e uso de fármaco em maior dose em comparação à prática clínica.

O uso do modelo de injeção diária de solução tem a vantagem de evitar que o material implantado exerça influência no processo inflamatório. O uso de solução de DP aproxima o modelo animal ao que ocorre na DP em humanos. Pawlaczyk *et al.* (2015) publicaram uma revisão dos diversos modelos de estudo, incluindo os modelos de punção diária e o uso de cateteres implantados. O modelo agudo de diálise peritoneal foi realizado inicialmente em coelhos e posteriormente em ratos. Nestes animais, a cavidade abdominal é perfurada e a solução de DP é infundida por via intraperitoneal. Os autores acreditam que, apesar de sua simplicidade técnica, experimentos de DP aguda fornecem vasta informação sobre a função do peritônio como a membrana de diálise.

Para estudar o efeito da SV na ação de transição epitélio mesenquimal, Chang *et al.* (2014) realizaram um estudo composto de duas partes: *in vitro*, com células mesoteliais peritoneais humanas (HPMCs) que foram expostas a glicose 5,6 mM (NG) ou glicose 100 mM (HG) com ou sem SV (1 mM); e *in vivo*, em ratos Sprague-Dawley à solução de DP a 4,25% ou SSI por 4 semanas. Os animais foram tratados com 5mg/kg/dia de SV por via intraperitoneal. A expressão da proteína E-caderina foi significativamente menor, enquanto a expressão proteica de caracol, α -SMA e fibronectina foi significativamente maior em HPMCs estimuladas por HG em comparação com NG.

A administração de fármacos em experimentos com animais pode ser feita de várias formas. O uso de via oral, com diluição do SV em água de beber, é o método que oferece menos risco e menor desconforto aos animais. No entanto, é difícil, neste modelo, precisar a quantidade de SV ingerido. A gavagem oferece a vantagem neste aspecto. Trata-se de meio consagrado, no entanto sujeito a riscos. Além das complicações oriundas por erro no procedimento, como trauma mecânico, intubação de traqueia, outros riscos ocorrem, como refluxo gastresofágico e aspiração, lesão de nasofaringe e nasal posterior, com risco de morte (EICHENBAUM *et al.*, 2011; DAMSCH *et al.*, 2011).

2.3 NANOTECNOLOGIA

Nanotecnologia é o estudo de manipulação da matéria em escala atômica e molecular e inclui o desenvolvimento de materiais que está associada a diversas áreas como a medicina, eletrônica, ciência da computação, física, química, biologia e engenharia dos materiais entre outras. A atuação nessas áreas tem como princípio básico a construção de estruturas e novos materiais a partir dos átomos onde o objetivo principal não é chegar a um controle individual dos átomos, mas elaborar estruturas estáveis com eles. No entanto, a definição nanotecnológica mais simples é dada matematicamente sendo, para isso, considerado um nanômetro (nm) correspondente a um metro dividido por um bilhão ($1\text{ nm}=10^{-9}\text{m}$) (BRASIL, 2020).

Na medicina, a nanotecnologia é uma ferramenta para alavancar os avanços em múltiplos campos, nos quais a mesma pode ter aplicação. Entre as diversas aplicações da nanotecnologia podemos destacar:

1. A utilização de técnicas de diagnóstico usando a radiomarcagem para aplicações no diagnóstico por imagem;
2. Emprego de nanopartículas magnéticas como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética e na terapêutica do câncer por hipertermia magnética;
3. O uso de nanomateriais ouro para fototermia;
4. Utilização de nanotubos de carbono e grafeno em biossensores.

Em nanotecnologia, qualquer que seja qual for o material, para o seu desenvolvimento e posterior utilização, as características do mesmo, como estabilidade, dispersão de tamanho, morfologia, carga superficial e toxicidade devem ser bem definidas (CANCINO, 2014).

Para a indústria farmacêutica a nanotecnologia se tornou uma ferramenta fundamental, pois um dos maiores desafios é desenvolver fármacos com o máximo de seu efeito terapêutico e com redução de seus efeitos adversos (KINGSLEY et al., 2006), pois aproximadamente 40% das substâncias descobertas são deixadas de lado, principalmente por apresentarem baixa solubilidade e biodisponibilidade (VILLANOVA; OREFICE; CUNHA, 2010). Com o uso da nanotecnologia é possível o desenvolvimento de fármacos mais seguros e eficazes, com maior biocompatibilidade e aproveitamento de todo seu potencial de ação (FIGUEIRAS; COIMBRA; VEIGA, 2012).

As nanopartículas são uma das mais importantes tecnologias dentre os sistemas de liberação de fármacos, uma vez que possuem estabilidade coloidal, atravessam barreiras fisiológicas, têm a capacidade de se ligar a sítios específicos e são de fácil produção (LANDFESTER; MUSYANOVYCH; MAILANDER, 2010).

Uma diversidade de tipos de nanocarreadores estão relatados na literatura e possuem diferentes aplicações, como as nanocápsulas, que são compostas por um envoltório polimérico que está organizado em torno de um núcleo oleoso, onde o SV pode estar tanto disperso nesse núcleo como adsorvido na camada polimérica (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Nanopartículas que são formadas por polímeros sintéticos são transportadores apropriados para diversos fármacos, estas partículas conferem alta estabilidade ao princípio ativo, também proporcionam uma maior taxa de absorção, reduzindo a irritação, o que é interessante a uma grande gama de ativos (MIHRANYAN; FERRAZ; STRØMME, 2012). Apesar disso, conforme Kumari, Yadav e Yadav (2010), as nanopartículas apresentam um empecilho à sua utilização, pois muitas vezes elas são rapidamente removidas do organismo pelo sistema fagocitário mononuclear. Devido a isso, estratégias de modificação de superfície estão sendo estudadas, para que estas partículas não sejam identificadas e possam permanecer no organismo por mais tempo, possibilitando uma maior duração da sua ação.

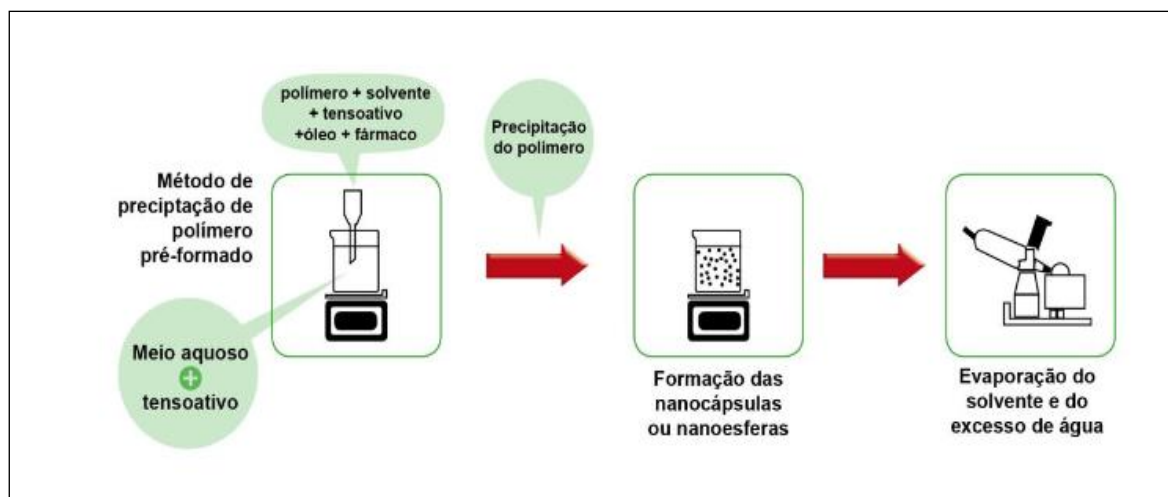
Um marco significativo no uso da nanotecnologia em farmácia ocorreu a partir do trabalho de Fessi, que desenvolveu nanocápsulas poliméricas, utilizando o método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI, 1989). Com esta técnica se obtém nanocápsulas, que são compostas por um núcleo cercado por membrana impermeável à água cercado por polímero.

A obtenção de nanocápsulas por esta técnica é relativamente simples, exigindo uso de equipamentos de baixa tecnologia e de custo acessível. O método descrito por Fessi consiste basicamente no seguinte:

1. Criação de uma fase orgânica onde se encontram o SV a ser encapsulado, o polímero e dois emulsificantes, como ésteres de ácidos graxos e triglicerídeos de cadeia média, e um solvente orgânico, como acetona;
2. Criação de uma fase aquosa: com um surfactante e tendo água como solvente.

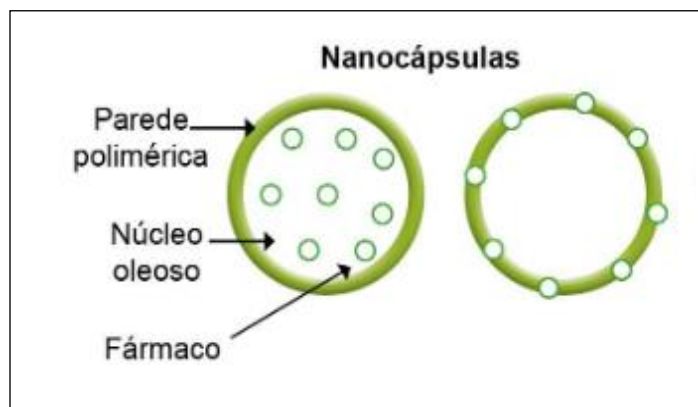
Após o preparo das soluções, a fase orgânica é instilada sobre a fase aquosa, a qual é mantida aquecida e sob agitação. As nanocápsulas se formam e a solução após preparada é submetida à rotoevaporação, para retirar o solvente orgânico e o excesso d'água. A representação esquemática do processo e da nanocápsulas obtidas são mostradas nas Figuras 7 e 8.

Figura 7 – Representação esquemática do método de obtenção de nanocápsulas.



Fonte: Schaffazick (2003) citada por Almeida (2012)

Figura 8 – Representação esquemática das nanocápsulas



Fonte: Schaffazick (2003) citada por Almeida (2012)

Como é facilmente perceptível, a tecnologia é simples e de baixo custo, embora o procedimento seja relativamente lento e trabalhoso. A formação das nanocápsulas neste modelo, acontece de modo espontâneo, com baixa energia envolvida, sendo a explicação para a formação das nanopartículas a ocorrência do fenômeno de Marangoni, conforme exposto por Fessi. Resumidamente o que ocorre é

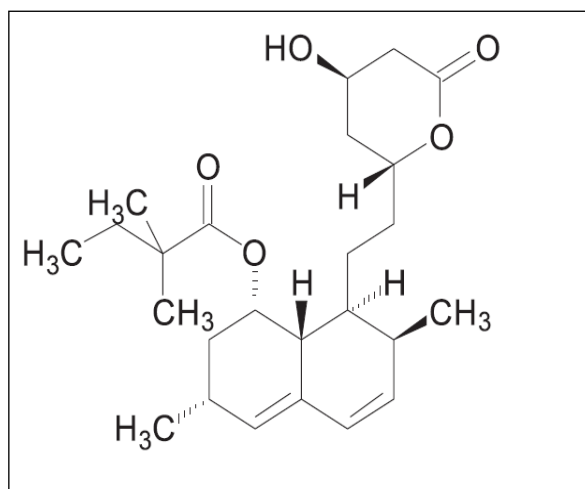
explicado em termos de turbulência interfacial ou agitação espontânea da interface entre duas fases líquidas desequilibradas, envolvendo fluxo, processos de difusão e superfície. A solução passa a ser governada pelo fenômeno de Marangoni, em que o movimento em uma interface é causado por variações longitudinais da tensão interfacial. Existe transferência de soluto para fora da fase de maior viscosidade, gradientes de concentração elevados perto da interface e tensão interfacial sensível à concentração do soluto. A difusão rápida da acetona da fase orgânica para a fase aquosa levou à formação de nanogotículas de óleo, sendo o resultado da diminuição da tensão interfacial e migração do polímero insolúvel para a interface óleo/água, onde é depositado, formando a membrana da nanocápsula.

2.4 ESTATINAS

As estatinas são fármacos inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa a etapa inicial e limitante da velocidade da biossíntese do colesterol. Elas foram isoladas de um fungo, *Penicillium citrinum*, em 1976, por Endo *et al.* A primeira estatina aprovada para uso em humanos foi a lovastatina, que foi isolada do *Aspergillus terreus*. A SV é um derivado quimicamente modificado da lovastatina. O mecanismo de ação das estatinas como hipolipemiante se deve ao fato de possuírem uma porção semelhante ao ácido mevalônico, e assim reduzem a formação de mevolanato, ao inibirem uma etapa inicial e limitante da biossíntese do colesterol (MAHLEY, 2006).

A SV (SV) (Figura 9) é um metabólico fúngico e contém um anel hexaidronaftaleno e duas cadeias laterais, sendo um éster dimetilbutirato, e a outra contém um hidroxiácido, que forma um análogo de seis membros do composto intermediário na reação da HMG-CoA redutase. É um inibidor competitivo reversível do substrato natural da HMG-CoA redutase. Ela é pró-fármaco de lactona, que é modificado no fígado (MAHLEY, 2006). Apresenta-se como um pó branco, cristalino e não higroscópico com $\log P = 4.4$ e temperatura de transição de vidro de 25°C. Sua Massa Molar é de 418.56g/mol. É praticamente insolúvel em água (30 µg/mL) e 0,1 M HCl (60 µg/mL) (MURTAZA, 2012).

Figura 9 – Estrutura da SV



Fonte: Murtaza (2012).

Normalmente, acredita-se que os compostos com solubilidade aquosa muito baixa exibirão absorção controlada por dissolução e, portanto, apresentarão absorção, distribuição e chegada ao órgão alvo reduzidas. A meia-vida biológica e biodisponibilidade da SV são 3 h e 5%, indicando metabolismo extenso de primeira passagem no fígado, respectivamente. É bem absorvido a partir do trato gastrointestinal, portanto, é vital aumentar a sua solubilidade em solução aquosa, a taxa de dissolução e biodisponibilidade a partir de suas formulações sólidas orais. Vários procedimentos podem ser bem-sucedidos para melhorar a solubilidade da SV por sua melhoria da biodisponibilidade: inclusão de formação de complexos, dispersão sólida, solubilização por surfactantes e técnicas de redução de partículas (MURTAZA, 2012). É um SV que oferece boa segurança. Foram notificados alguns casos de sobre dosagem; a dose máxima tomada foi de 3,6 g. Todos os doentes recuperaram sem sequelas (INFOMED, 2020).

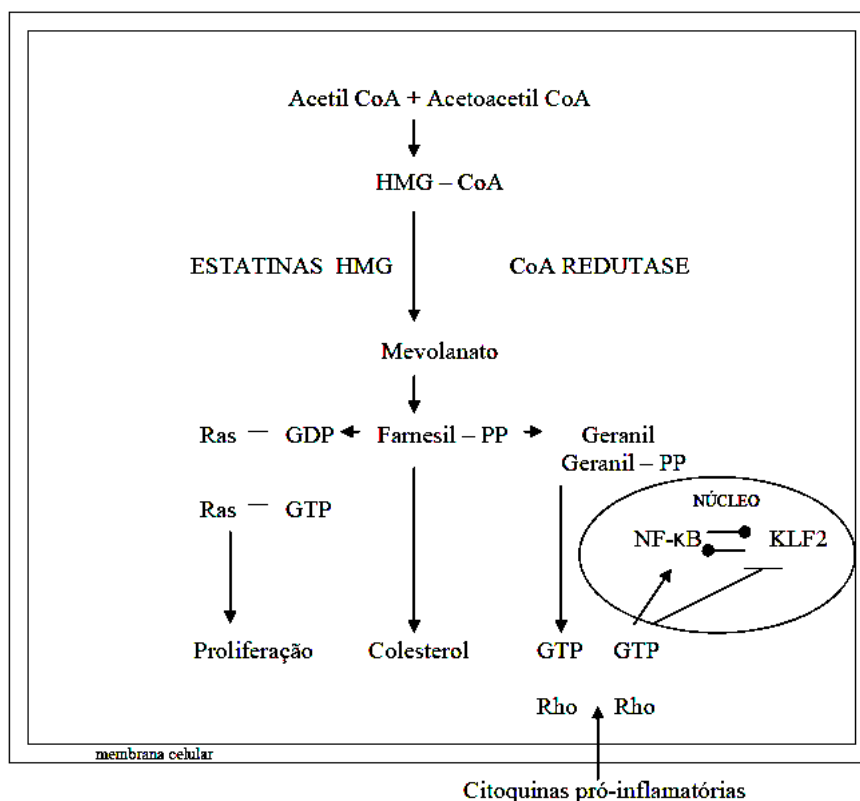
O uso de estatinas na prevenção de risco cardiovascular é bem estabelecido. A sua prescrição depende da análise do risco cardiovascular de cada paciente. Nos pacientes com elevado risco, ou seja, quando a chance de evento em 10 anos for maior que 20%, o uso de estatinas deve ser indicado, além das mudanças de estilo de vida. Alguns fatores de risco adicionais favorecem o uso de estatinas, sendo eles: história de pré-eclâmpsia, menopausa precoce, presença de doença reumática, infecção por vírus HIV, forte história familiar de doença cardiovascular, ancestrais do sul da Ásia, níveis persistentemente elevados de triglicerídeos, níveis elevados de

Proteína C Reativa, ou de lipoproteína ou apo lipoproteína B, e DRC (MICHOS *et al.*, 2019).

Além da ação hipolipemiante, foram descritas ações pleiotrópicas das estatinas. Elas diminuem a expressão do fator tecidual, reduzem a ativação da protrombina, bem como a geração de fator Va, que é a forma ativada do fator V, o qual é um cofator essencial para a ativação da protrombina. Aumentam o ritmo de inativação do fator Va e induzem ativadores de plasminogênio *tissue-type* (t-PA), reduzindo, assim, a coagulação e favorecendo o processo fibrinolítico. Estas ações podem contribuir para a redução de eventos cardiovasculares nos pacientes em uso de estatinas. As estatinas, ao inibirem a síntese de mevolanato, também inibem a síntese de isoprenóides, como farnesil-pirofosfato (FPP) e geranil-pirofosfato (GPP). A adição de farnesil ou geranilgeranil aos resíduos de cisteína das proteínas, chamada prenilação, leva à formação de proteínas isopreniladas ou geranilgeranilpreniladas (BIASUCCI; BIASILLO; STEFANELLI, 2010).

Muitos dos efeitos anti-inflamatórios das estatinas dependem da inibição da prenilação de proteínas específicas, como as Rho e Ras, que agem via fator nuclear – κ B (NF- κ B), o qual é envolvido nos processos: inflamatório, de proliferação e de apoptose, e é implicado na aterogênese. Além disso, a via Rho- Rho quinase é um regulador negativo da sintetase endotelial do óxido nítrico (eNOS). Nos quadros inflamatórios, existe consequente redução da disponibilidade de óxido nítrico. Assim, o tratamento com estatina resulta no aumento da atividade da eNOS, pela redução da prenilação da Rho. As estatinas também reduzem a concentração da calveolina-1, que é o parceiro inibidor da calmodulina e aumenta a afinidade da ligação da eNOS pela calmodulina. Regulação negativa da via NF- κ B também leva um aumento na atividade da eNOS. Baseado em revisão de literatura, foi proposto um esquema para explicar a ação anti-inflamatória das estatinas, conforme Figura 10 (BIASUCCI; BIASILLO; STEFANELLI, 2010).

Figura 10 – Mecanismo anti-inflamatório das estatinas



Fonte: Adaptado de Biasucci, Biasillo e Stefanelli (2010)

Desde então, os estudos sobre efeitos anti-inflamatórios da SV prosseguem, com o objetivo de melhor entender a ação da mesma na inflamação.

Basraon *et al.* (2015) estudaram o efeito da SV na membrana fetal humana exposta à lipopolissacarídeos (LPS). As membranas foram expostas ao LPS e foram alocadas em grupo controle, que não recebeu SV, e grupos que receberam o SV na dose 125mg/mL antes da exposição ao LPS, pós exposição ao LPS, ou simultaneamente. As amostras foram mantidas incubadas por 24 horas. Foram mensurados por ELISA as seguintes citocinas: IL-1b, IL-6, IL-10, e TNF- α ; receptores sIL-1R2, sIL-6R, sTNFR1 e R2; Matriz Metaloproteinases (MMP) (1, 2, 7, 9, e 10); inibidor tecidual da metaloproteinase-2 (TIMP-2). O grupo que recebeu pré tratamento com SV teve redução IL-6, TNF- α , e MMP-9. O grupo que usou SV pós teve redução de IL-1b e TNF- α , o grupo que fez uso simultâneo não teve qualquer redução. O uso de SV nos grupos pré e pós tratamento reduziu a relação TNF- α /sTNFR1 ou R2 e IL-1b/sIL-1R2. O grupo pré ainda teve uma redução na relação MMP-9/TIMP-2. Os autores concluíram que o uso de SV reduz a resposta fetal inflamatória.

O efeito da SV em células endoteliais humanas do cordão umbilical foi

estudado por Hot *et al.* (2013) tratadas com IL-17 isoladamente, ou combinadas com TNF- α , com ou sem adição de mevolanato. O experimento mostrou que a SV reduziu a produção de IL-6, IL-8, RANTES mRNA, CX3CL-1 e CCL20, induzidos por IL-17, e restaurou o nível de IL-33 reduzido pela IL-17. Reduziu, ainda, a agregação plaquetária ao normal, bem como aumentou a expressão de CD39 e trombomodulina, que foram reduzidas pela IL-17 combinada ao TNF- α . Todos os efeitos foram revertidos pela adição de mevolanato.

Yang *et al.* (2016) realizaram estudo em macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de ratos, comparando grupo que usou SV (10mol/L) com grupo sem uso de SV, divididos em um subgrupo que usou troglitazona (50mol/L) e um que não usou. Foi mensurado o conteúdo de colesterol e de LDL oxidada (oxLDL) nos macrófagos, e mensurados o conteúdo de IL-6 e TNF- α nos macrófagos, bem como a expressão de mRNA de IL-6 e TNF- α . Foi demonstrado que os macrófagos expostos à ox-LDL tiveram aumento do conteúdo de colesterol e se tornaram células espumosas, efeito este significativamente atenuado pelo uso da SV. No entanto, no grupo que usou troglitazona este efeito foi parcialmente revertido.

Kim *et al.* (2017), num estudo *in vitro*, mostraram que a presença de SV reduz a expressão de IL-6 e IL-8, bem como reduz expressão de espécies reativas de oxigênio em células isoladas de intestino estimuladas por TNF- α . O mesmo grupo, usando modelo de ulceração intestinal *in vivo*, com uso de lesão induzida por anti-inflamatórios, demonstrou que o uso de SV reduziu expressão de espécies reativas de oxigênio, bem como a quantidade de ulcerações intestinais.

Jang e colaboradores (2018) realizaram um experimento em ratos, em modelo de cirrose hepática, usando células mesenquimais de medula óssea, com uso associado ou não com SV na dose de 10mg/kg/dia. A cirrose foi induzida com uso de tiocinamida. Foi demonstrado que o uso associado de ambas teve forte efeito protetivo.

Estudo em ratos, submetidos à dieta aterogênica, mostrou que a SV, usada na dose de 10mg/kg/dia, administrada intraperitoneal, reduziu calcificação na aorta, reduziu expressão de TNF- α , a translocação de NF- κ B induzida pelo TNF- α , bem como expressão do receptor TNFR-1 (LIN *et al.*, 2015).

Acikgoz *et al.* (2013) realizaram experimento em ratos para avaliar a ação da eritropoietina (EPO) comparado à SV, em modelo de fibrose renal induzida por ligadura ureteral. Um grupo recebeu EPO 1000 U/kg intraperitoneal todos os dias, e outro grupo recebeu SV 2 mg/kg por gavagem duas vezes por dia, o controle do grupo usou

carboximetilcelulose 1 mL/kg por gavagem duas vezes ao dia. O material foi colhido para análise no 14º dia do experimento. Foi realizada imuno-histoquímica e avaliação da fibrose por método por extensão de coloração de fibronectina e tricrômico de Masson. A Expressão de TNF- β foi significativamente menor no Grupo EPO e SV do que no controle, enquanto que não foi encontrada diferença significativa entre o Grupo SV e Grupo EPO. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas expressões NF-kB e fator básico de crescimento do fibroblasto (bFGF), quer entre grupo SV e controle ou entre SV e EPO. Entretanto, as expressões NF-kB e bFGF foram significativamente menores no grupo EPO do que no SV. A fibrose foi significativamente menor nos grupos SV e EPO que no controle, sem semelhante quando comparada entre os grupos SV e EPO. O estudo concluiu que EPO e SV diminuíram a fibrose em ratos com obstrução ureteral. Reduziram a Transição epitelial para mesenquimal (EMT) inibindo eficazmente a expressão de TGF- β e também reduziram significativamente as expressões de NF-kB e bFGF. O TGF- β é o regulador principal para induzir EMT e também regula fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGF-B) e bFGF, que são outros importantes fatores de crescimento na indução EMT.

Chu *et al.* (2018), tendo em consideração que interações celulares entre células endoteliais (CE) e células musculares lisas vasculares (VSMC) / macrófagos parecem ser muito alterados em condições inflamatórias, realizaram um estudo com o objetivo de investigar os efeitos da SV nas funções VSMC / macrófago, que são induzidas por EC ativada por TNF- α no sistema de cultura *in vitro*. Foram isoladas CE da aorta de ratos Sprague Dawley. As CE foram pré-tratadas com ou sem SV (2 mM) por 30 minutos, seguidos de estimulação com TNF- α (10 ng/mL). O experimento mostrou que a SV reduziu a proliferação celular, apoptose, e reduziu a expressão de IL-6 e VEGF.

Podemos dizer que a SV exerce suas ações anti-inflamatórias através de variados mecanismos, não totalmente esclarecidos, e que o uso da SV pode ser útil em múltiplas doenças além da aterosclerose.

Estudos em humanos também procuram estudar as ações da SV na inflamação. A circulação extracorpórea (CEC) é usada na maioria dos casos de coração aberto. Entretanto, a CEC inevitavelmente causa inflamação sistêmica e lesão de isquemia-reperfusão, que pode afetar negativamente a função cardíaca pós-operatória e o prognóstico a longo prazo do paciente. Hua *et al.* (2017) realizaram estudo em 130 pacientes com valvulopatia submetidos à cirurgia com CEC. Um grupo recebeu SV 20mg e outro recebeu placebo. As medidas incluíram índices inflamatórios TNF- α , IL-6,

L-8 no pré e pós-operatório, e índices de comprometimento do músculo cardíaco, troponina cardíaca sérica Isoenzima da banda miocárdica T (cTnT) e creatina quinase (CK-MB) 6, 12, 24 e 72 H no pré e pós-operatório. O estudo mostrou que a SV melhora significativamente a mecânica perioperatória, a ventilação e função cardíaca. A SV reduz significativamente os níveis de indicadores de lesão (CK-MB e cTnT), bem como reduziu de modo significativo os níveis de IL-6, IL-8 e TNF- α (HUA *et al.*, 2017).

2.4.1 SV e Nanotecnologia

Conforme já relatado, SV tem baixa biodisponibilidade, assim sendo, se busca melhorar a sua ação através da nanotecnologia (MURTAZA, 2012).

Nesta revisão, são relatadas várias maneiras de se obter melhora na biodisponibilidade da SV. Murtaza (2012) apresentou uma revisão dos métodos usados para melhorar a biodisponibilidade da SV, que estão descritos a seguir.

1. Técnicas de formação de complexos de inclusão: é uma das técnicas mais precisamente empregadas para o aumento da biodisponibilidade com poucos fármacos solúveis. Os complexos de inclusão são preparados por adição da(s) molécula(s) não polares (substância hóspede) em outra(s) molécula(s) (hospedeiro). As ciclodextrinas são os oligossacarídeos cíclicos e são frequentemente empregados como moléculas hospedeiras. Varshosaz *et al.* (2011) apresentaram um estudo para aumentar a taxa de dissolução de SV usando método de cristalização induzida por anti-solvente. Neste método, uma solução SV preparada em ebulição foi adicionado diclorometano à água fria (5°C), o não-solvente. Após a sedimentação, colmatar o solvente (acetato de isopropil) foi colocado. Finalmente, os cristais foram reunidos e secos por 12 horas a 50 ° C em um forno. Nenhuma alteração no medicamento após o processo de cristalização foi observada como evidente no FTIR (Fourier transform spectroscopy de infravermelho) e DSC (diferencial calorimetria de varredura). O XRPD (pós análise por difratometria de raios-X) exibiu menor redução na altura dos picos característicos. O tamanho de partícula de agregados esféricos foi de cerca de 37 microns. A eficiência de dissolução de SV até 60 min aumentado para cerca de 2 vezes em solução tampão fosfato com dodecilsulfato de sódio a 0,5% (pH 7) usando o método da pá rotativa. Os cristais obtidos exibiram melhor solubilidade do que o do pó não tratado, provavelmente por razões de mudança para a forma

amorfa. Sua taxa de dissolução aos 60 minutos ainda era 4 vezes de pó não tratado quando armazenado por 30 dias a 25 °C e 84% de umidade relativa.

2. Dispersão sólida: é uma montagem de produtos sólidos consistindo em não menos que dois constituintes diferentes, normalmente um meio hidrofílico e um fármaco hidrofóbico. Os mais usados transportadores hidrofílicos para dispersões sólidas incluem polivinilpirrolidona (PVP), polietileno glicóis (PEG) e Plasdona-S630 (PS630). Surfactantes como Tween-80®, docusato de sódio, myrj-52, plurônico-F68 e lauril sulfato de sódio também são comumente inseridos na dispersão sólida. Zhang *et al.* (2010) desenvolveram células mesocelulares esféricas espuma (MCF) carregada com SV através de um procedimento envolvendo uma combinação de equilíbrio de adsorção e evaporação do solvente, destinado a ser administrado por via oral, capaz de aumentar a taxa de dissolução e melhorar a aptidão para carregar fármacos. MCF esférico tendo um sistema de poros 3-D incessante foi produzido usando um surfactante (polímero tribloco Plurônio® 123) e um co-surfactante (brometo de cetiltrimetilamônio). Com base na taxa de liberação do medicamento e no medicamento eficiência de carregamento, o MCF esférico e fibras SBA-15 foram comparados. A avaliação físico-química revelou a incorporação bem-sucedida de SV no MCF. Os resultados indicaram que o MCF possui uma alta eficiência de carregamento de medicamentos até 37,5%, e superior ao do SBA-15 fibroso, com um diâmetro de poro de 6,5 nm. Silva *et al.* (2010) prepararam as dispersões sólidas de SV com polietileno glicol (PEG 4000) usando diferentes razões SV:transportador pelo método de fusão. Misturas físicas (MP) nas mesmas proporções também foram preparadas para comparação. Os produtos foram investigados por XRPD, DSC e espectroscopia de infravermelho e estudos de solubilidade. Amostras de dispersões sólidas foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para avaliar a estabilidade. Os resultados demonstraram a presença de SV e PEG cristalina. Uma possível diminuição do tamanho dos cristalitos também foi observada. Os termogramas e cromatogramas obtidos não mostraram incompatibilidade entre componentes de dispersões sólidas e misturas físicas. Um ótimo efeito na solubilidade e na taxa de liberação de SV foi encontrado nas dispersões sólidas SV com PEG 4000 em todas as porcentagens. Dispersões sólidas de SV com PEG causaram um aumento significativo da solubilidade do medicamento com quase 100% de aumento. O aprimoramento da liberação de medicamentos nas dispersões sólidas podem ser o resultado da

redução no tamanho de cristalito, bem como na tensão superficial, diminuindo a influência do polímero, causando um aprimoramento em molhabilidade e dispersibilidade de SV.

3. Solubilização por tensoativo: tensoativos são moléculas com características partes polares e não polares. Um grande número de surfactantes contém uma parte de hidrocarboneto ligada a um grupo. O grupo polar pode ser aniônico, catiônico, zwitteriônico ou não iônico. Quando pequenas moléculas polares são inseridas, podem provocar em uma diminuição da tensão superficial e aumentar na solubilidade do SV dentro de um solvente orgânico. Margulis-Goshen e Magdassi avaliaram um método para a preparação de nanopartículas de SV por evaporação do solvente de formação espontânea em microemulsões de óleo em água. Neste estudo, a congelação técnica foi aplicada para converter microemulsões contendo um solvente volátil e nanopartículas na forma de flocos secos. A eficiência de encapsulação de SV em nanopartículas foi avaliada pela dispersão dos flocos em água seguido de filtração através de filtro de tamanho de poro de 0,1 μm . O filtrado foi utilizado para avaliar a concentração de SV. Os resultados indicaram que > 95% do SV estava presente em partículas amorfas (tamanho <100 nm) após liofilização. Os estudos de dissolução mostraram um aumento notável na taxa de dissolução dos comprimidos contendo flocos de nanopartículas SV, em comparação com os comprimidos convencionais. A difração de raios-X mostrou que o material era originalmente amorfo, mas um lento processo de cristalização ocorreu quando a formulação foi armazenada em temperatura ambiente.
4. Diminuição no tamanho das partículas, resultando no aumento da solubilidade do medicamento. A redução de tamanho envolve procedimentos de moagem bem estabelecidos, típico na preparação da formulação e pode ser realizado geralmente por micronização e nanosuspensão. Às vezes, técnicas de cristalização também podem ser usadas para redução do tamanho de partícula.
5. Redução do tamanho das partículas: também pode ser alcançada por nanosuspensão. O particulado aumenta a área com a diminuição das partículas, resultando no aumento da solubilidade. A nanosuspensão também pode ser alcançada por precipitação. No método de precipitação, o SV é dissolvido em um solvente, e a solução resultante é depois adicionada ao não solvente para precipitar os cristais. É uma técnica simples e econômica. As nanopartículas exibem uma proporção superfície-volume maior que o material a granel, e, assim, a dose e

frequência de administração pode diminuir, o que aumenta a adesão do paciente. Patil *et al.* (2011) prepararam SV e Eudragit® L100 dissolvidos em metanol em concentração definida, seguido pela filtração da solução obtida através de uma membrana com tamanho de poro de 0,45 µm para a remoção de possíveis contaminações por partículas. Em seguida, a técnica de nanoprecipitação controlada foi empregada para preparar nanopartículas de SV envolvendo a adição de 5 mL de solução SV na mistura previamente preparada de água destilada e poloxâmero com agitação mecânica contínua, seguida pela precipitação imediata. A taxa de agitação e a concentração do polímero foram variadas para observar seu efeito nas propriedades dos produtos. As nanopartículas obtidas foram filtradas e secas usando rotoevaporador sob vácuo a 50°C por 3 ± 4 h.

Mas os métodos para aumentar a biodisponibilidade da SV não se resumem aos acima referidos, de modo que muitas tentativas, usando métodos variados, foram desenvolvidas. Com este objetivo, Gambhire, Bhalekarb e Shrivastava (2011), desenvolveram nanopartículas sólidas de SV (SLN), que foram preparadas por pré-emulsão, seguida pelo método de ultrassonicação. Resumidamente, fase lipídica consistia em SV (0,5 g), Compritol® 888 ATO (2,4 g) e Span 60 (3,6%) mantidos a 70°C. A fase aquosa foi preparada dissolvendo o poloxâmero 188 (2%, p/v) em água destilada (suficiente para produzir 50 mL de preparação) e aquecidos à mesma temperatura que a fase oleosa. A fase aquosa quente foi adicionada à fase oleosa e a homogeneização foi realizada a 70°C, a 35.000 rpm por 3 min. A emulsão obtida foi ultrassonicada por 19 min para reduzir ainda mais o tamanho usando das partículas. O método resultou em produção consistente de nanopartículas SLNs, com tamanho médio de 245 nm e % de aprisionamento de 72,52%. O percentual cumulativo de liberação de SV em 48 h da SLN foi significativamente retardado (37,08%) comparado ao da dispersão de medicamento puro (97,2%). Isto é devido ao aprisionamento de fármacos na matriz lipídica do SLN. A biodisponibilidade relativa da SV e do hidroxiácido SV do SLN aumentou em ~ 164% e ~ 207%, respectivamente, em comparação com a suspensão de SV de referência. Assim, o estudo estabeleceu que a biodisponibilidade oral da SV pode ser melhorada pela administração como SLN, presumivelmente após a digestão dos lipídios constituintes e a co-absorção pelo transporte linfático (GAMBHIRE; BHALEKARB; SHRIVASTAVA, 2011).

Também interessados em melhorar a biodisponibilidade oral da SV com o uso de nanopartículas, Zhang *et al.* (2010) criaram nanopartículas lipídicas compostas de

HS-15 ou Tween® 20 e ácido oleico. As nanopartículas foram preparadas por evaporação do solvente. Resumidamente, o surfactante, óleo, lecitina e SV foram dissolvidos em diclorometano e gotejados em água destilada sob agitação, usando-se as proporções SV:HS-15:M812:S-75 (5:28:14:20) ou SV:Tween® 20:OA:S-75 (5:40:20:20). A mistura foi emulsionada por sonicação, e o solvente orgânico foi removido sob pressão reduzida. Para aumentar a biodisponibilidade oral da SV, duas formulações de nanopartículas com diferentes componentes foram preparadas por emulsificação e tecnologia de evaporação de solventes: formulação I eram constituídos por SV: HS- 15: M812: S-75 (5: 28: 14: 20) para avaliar o efeito do HS-15 na melhora da biodisponibilidade oral de SV; formulação II composta de SV: Tween® 20: OA: S-75 (5: 40: 20: 20) para investigar o efeito de Tween® 20, porque há relatos de que esta formulação poderia inibir a atividade da enzima do sistema CYP3A. A análise da morfologia das nanopartículas por microscopia mostrou que elas eram partículas nanométricas esféricas ou hemisféricas com tamanho de partícula de 39,4 nm (Formulação I) e 78,1nm (Formulação II), resultado que estava de acordo com os dados medidos por espalhamento de luz a laser com o diâmetro médio de 48,9 nm (Formulação I) e 68,3nm (Formulação II). O potencial zeta das duas formulações estava em torno de -30 mV, e a carga de fármacos foi de 7,46% (Formulação I) e 5,88% (Formulação II), com eficiência de encapsulamento 97,2 e 99,2%, respectivamente. Os resultados indicaram que as propriedades físico-químicas, exceto o tamanho de partícula, não foram significativamente influenciadas pelos ingredientes das formulações. Foi estudada a biodisponibilidade oral da SV após sua incorporação nas nanopartículas lipídicas, que foi melhorada em 3,37 vezes para a Formulação I, e 2,55 vezes para Formulação II em comparação com o de SV livre em ratos. Concluíram que as nanopartículas podem ser um sistema de liberação promissor para melhorar a biodisponibilidade oral da SV (ZHANG *et al.*, 2010).

Shinde e More (2011) estudaram a formulação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação. Usaram ácido polilático co-glicólico (PLGA) como polímero lipofílico, SV e F-68 pleurônico como surfactante estabilizador, e avaliado com diferentes parâmetros: tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, liberação de fármacos *in vitro*, estudo de transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, e estudo colorimétrico. As nanopartículas de PLGA foram preparadas por nanoprecipitação – método de deposição de solventes. A SV foi dissolvida em acetona. O F68 foi dissolvido em 40 mL de água. O PLGA foi solubilizado em acetona 20 ml e

adicionada solução de SV em várias concentrações. A fase orgânica foi vertida na solução aquosa gota a gota, no estabilizador, contendo água sob agitação a 3000 RPM por 2 horas, formando, assim, uma suspensão coloidal. O solvente orgânico foi então evaporado usando um rotoevaporador. O resultante foi submetido à liofilização. Eles concluíram que a quantidade de estabilizador usado afeta as propriedades das nanopartículas. Se a concentração do estabilizador é muito baixa, a agregação do polímero ocorrerá, porém, se houver muito estabilizador, a incorporação de medicamentos pode ser reduzida como resultado da interação entre a fármaco e o estabilizador. O efeito da concentração do polímero de aumentar a concentração faz com que a emulsão tenha gotículas maiores, se a proporção SV: PLGA aumentou de 1: 1 para 1: 2, o tamanho das partículas aumentou significativamente e a encapsulação também aumentou, mas depois, mais aumento da proporção fármaco: polímero mostrou redução da eficiência de encapsulação de fármacos. Estudo de liberação de fármacos *in vitro* das diversas formulações utilizadas mostraram uma liberação entre 74,46 a 89,65% em 24h, com uma cinética de primeira ordem. Concluíram que nanopartículas de PLGA podem ser eficazes para sustentar a liberação de fármacos.

Com o objetivo de avaliar se nanopartículas (NP) de SV com tetraciclina (TC) (SIM / TC – PLGA NP) aumentassem a quantidade de SV que atingia o osso, exercendo, assim, um melhor efeito curativo na osteoporose, Wang *et al.* (2015) desenvolveram um estudo um modelo animal. O PLGA é um polímero sintético hidrofóbico com boa biodegradabilidade e biocompatibilidade. Produz um subproduto biocompatível que pode ser eliminado pelas vias metabólicas normais e tem sido amplamente utilizado em tratamentos clínicos. O TC – PLGA foi sintetizado por uma reação de esterificação entre o hidroxil do TC e o carboxil do PLGA. As NP de PLGA enxertados em TC (TC-PLGA NP) foram preparadas usando o método de emulsificação de solventes. Obtiveram NP com os tamanhos aproximadamente 220 nm, independentemente de terem ou não SV. O enxerto de TC não teve efeito significativo no tamanho das partículas, e o índice de polidispersão dessas partículas foi de aproximadamente 0,3. As NP em branco e carregadas com SV eram todas partículas esféricas ou do tipo esférica e eram uniformes em tamanho e forma. A eficiência de encapsulação com SV foi maior que 75%, e não houve alterações após o enxerto de TC. Os comportamentos de liberação de fármacos *in vitro* das NP carregadas com SV mostraram 80% de liberação em 75 horas, não havendo diferença pela presença ou não da TC. Uma avaliação celular *in vitro* indicou que as NP tinham uma excelente

capacidade de captação celular e mostraram grande biocompatibilidade com as células MC3T3-E1, reduzindo, assim, os efeitos citotóxicos da SV. O ensaio de mineralização celular mostrou que NP carregados com SV induziam diferenciação osteogênica e formação de nódulos mineralizados nas células MC3T3-E1, atingindo o mesmo efeito que a SV. O uso de NP de TC-PLGA carregados com SV no tratamento da osteoporose foi testado através de análises farmacodinâmicas em animais, realizadas em ratas ooforectomizadas, e os resultados sugeriram que as NP de TC-PLGA carregadas com SV podem melhorar os efeitos curativos do SV na recuperação de minerais ósseos. Concluíram que NP de direcionamento ósseo, que foram baseados na conjugação de copolímeros de TC a PLGA, têm a capacidade de serem direcionadas ao osso, e que NP podem ser desenvolvidos como um sistema de administração de medicamentos hidrofóbicos, que melhorem os efeitos curativos dos medicamentos, que reduzam as doses administradas e reduzam os efeitos colaterais em outros órgãos.

Wang *et al.* (2014) criaram nanopartículas catiônicas projetadas para a liberação controlada de SV usando novo copolímero de bis poli (ácido láctico co-glicólico) – fenil-alanina polietilenoglicol) com amônio quaternário dietiltriamina (BPPD), usando dietilamina quaternária de amônia, polietilenoglicol e PLGA. O método de precipitação foi usado na fabricação das nanopartículas. Resumidamente, BPPD e SV/BPPD foram dissolvidos em dimetilformamida (DMF), água destilada foi adicionada às soluções BPPD e SIM / BPPD para precipitar a nanopartículas. O tamanho médio e potencial zeta da SV / BPPD 217,6 nm e +1,2 mV, respectivamente. A eficiência de encapsulamento na SV / BPPD de $46,0 \pm 4,5\%$. A quantidade cumulativa de SV liberada foi de, aproximadamente, 60% nos primeiros 2 dias.

Fattahi *et al.* (2016) prepararam nanopartículas de SV usando expansão rápida supercrítica (RESS) com trifluormetano. O dispositivo usado para o processo RESS pode ser dividido em três componentes principais: Unidade de pré-extração, Unidade de extração e Unidade de expansão. A primeira parte consiste em uma bomba de alta pressão alternada e um pré-aquecedor. Na unidade de extração, dois recipientes de aço inoxidável (com volumes de 200 mL e 300 mL) são usados em série para garantir que a condição de equilíbrio seja alcançada. Os vasos são colocados em um banho de água de controle de temperatura altamente preciso com apenas 0,1 K de incerteza para manter a temperatura constante desejada. Para maximizar a transferência de massa, o trifluormetano supercrítico pré-aquecido entra em cada vaso a partir do fundo e sai pelo topo. A solução supercrítica resultante é transferida para a unidade de expansão

através de um tubo pré-aquecido para evitar entupimentos. A célula de precipitação, o dispositivo de expansão e o dispositivo de coleta são as três partes da unidade de expansão. Para a produção de partículas, em cada execução, 2 g de SV são carregados nos vasos de extração que contêm esferas de vidro para aumentar a área da superfície de contato. Na entrada de cada vaso, um filtro de metal é usado para impedir a transferência de SV não dissolvida para a unidade de expansão. Cada execução dura 30 min, após 30 min iniciais dados ao sistema, o que permite que o sistema atinja uma condição estável. A aplicação do RESS na SV usando trifluormetano, como o fluido supercrítico, resultou na produção de SV em nanopartículas, com tamanho variando de 47 a 74 nm, e a análise por FTIR indicou que não houve alteração significativa em sua estrutura química. Investigou-se o efeito da temperatura de extração, pressão e distância de pulverização no tamanho das partículas, onde o aumento da temperatura de extração teve o maior efeito na redução do tamanho das partículas. O aumento do distanciamento por pulverização resultou em menor redução do tamanho das partículas, mas a modificação da pressão de extração não mostrou efeito estatisticamente significativo no tamanho das partículas de SV. A taxa de dissolução das nanopartículas mostrou um aumento enorme em comparação com a forma não processada, e, uma vez que a SV é um medicamento BCS Classe II, pode-se esperar um aumento na biodisponibilidade. Esta pesquisa mostra que o RESS pode ser um método muito bom para redução do tamanho de partículas e aprimoramento de dissolução de moléculas farmacêuticas. As condições ideais no espaço do projeto foram a pressão de extração de 10 MPa, a temperatura de extração de 50 ° C e a distância de pulverização de 7 cm.

Como se sabe que a absorção de SV é crítica, Mendes *et al.* (2016) realizaram pesquisa que teve como objetivo desenvolver uma forma de dosagem sólida inovadora para administração oral baseada em transportadores lipídicos nanoestruturados (CPN) para comprimidos, revestidos com agentes poliméricos convencionais. Dispersões CPN de olanzapina co-encapsulada com SV (Combo-CPN) foram produzidas por alta pressão homogeneização e avaliadas em termos de escalabilidade, procedimento de secagem, compressão e desempenho da liberação *in vitro*, citotoxicidade e permeabilidade intestinal. Os CPN foram preparados pela técnica de homogeneização a alta pressão a quente (HPH). Isto foi realizado a 80°C, uma temperatura acima do ponto de fusão do lipídeo sólido. Primeiramente, a fase lipídica derretida (7,5% p / V), contendo ácido oleico e tripalmitina (na proporção de 50:50), foi emulsificada em uma

solução aquosa de Tween1 80 (3% p / V) à mesma temperatura, usando um Ultra-Turrax® por 1 ou 3 min. Uma pré-emulsão foi obtida. Em segundo lugar, a pré-emulsão foi processada em um homogeneizador de alta pressão pré-aquecido (HPH), a uma pressão de 500 ou 1000 bar por 2,5 min à 12,5 min. Na formulação ideal carregada de fármaco Combo-CPN, a adição de ambos os medicamentos foi realizada na fase fundida lipídica inicial. CPN contendo 0,20% (p / p), em relação ao conteúdo lipídico, de corantes fluorescentes, vermelho do Nilo (NR) e Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), foram preparados usando as mesmas condições. Para a preparação de comprimidos à base de CPN comprimidos baseados no Combo-CPN, foi necessária a secagem prévia da dispersão de nanopartículas. Para isso, duas técnicas diferentes foram consideradas para os procedimentos de produção: congelamento e secagem ou secagem por pulverização. Diferentes revestimentos poliméricos foram utilizados: PVP K 30, um polímero sintético constituído essencialmente por grupos lineares de 1-vinil-2-pirrolidona, (C₆H₉NO) n; Eudragit® RL 30D, um copolímero de acrilato de etila, metila metacrilato e um baixo teor de éster do ácido metacrílico com grupos quaternários de amônio, empregados como liberação sustentada; e Sureteric®, um copolímero de álcool polivinílico com ácido acético e anidrido ftálico, C₁₂H₁₂O₆. Partículas revestidas com diferentes polímeros exibiram perfis de liberação de fármacos claramente distintos. Ao mesmo tempo, nanopartículas aumentam a permeabilidade intestinal do medicamento, sugerindo contribuir para melhorar a biodisponibilidade de medicamentos orais. Assim, o trabalho permitiu demonstrar a versatilidade na aplicação de CPN para administração oral em comprimidos.

Com o objetivo de comparar a ação terapêutica da SV isolada com aquela do poli (etileno glicol) -b-poli (gama-benzil l-glutamato) carregado com SV (PEG-b-PBLG50) na lesão de isquemia / reperfusão intestinal, Fei Tong *et al.* (2017) realizaram um experimento *in vivo* usando ratos Sprague Dawley. Os animais receberam 20 mg/kg de SV ou compostos de SV / PEG-b-PBLG50 (SV / P) e depois foram submetidos a 45 min de isquemia e 1 h de reperfusão. Foram coletados sangue e intestino delgado, níveis séricos de interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), TNF- α e óxido nítrico (NO) foram verificados atividade da superóxido dismutase, conteúdo de mieloperoxidase, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico sintetase endotelial, proteína fagócito oxidase de 47 kDa (p47phox), BMP4, COMP-2 e proteína cinase ativada por mitogênio p38. As expressões de p38MAPK foram medidas nos tecidos intestinais. SV e SV / P reduziram o dano oxidativo intestinal, restringiram o dano

inflamatório e reduziram as expressões de BMP4 e COX-2, mas o SV / P teve um maior efeito. Isto pode ser explicado pela concentração sustentada de SV no grupo SV / P, pois, após uma única injeção subcutânea no grupo SV na dose de 20 mg / kg, atingiu rapidamente a Cmax de 163,56 ng / mL em 2 h e diminuiu para os valores basais dentro de 10 h de administração, enquanto a concentração plasmática, após uma única injeção subcutânea no grupo SV / P, na dose de 20 mg / kg, atingiu Cmax de 41,25 ng / mL em 2 h, mas diminuiu para os valores basais dentro de 4 dias após a administração.

Além da utilização da SV em processos inflamatórios, novos campos se abrem para o seu emprego. Figueiredo *et al.* (2019) estudaram que o uso associado de SV com nanopartículas de prata sintetizadas por *Fusarium oxysporum* (AgNPbio) contra cepas bacterianas de referência e multirresistentes (*Staphylococcus aureus* meticilino resistente MRSA - e *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido - ESBL), e mostraram que o uso associado de SV e AgNPbio exibiu um efeito sinérgico da combinação SV-AgNPbio na atividade antibacteriana contra cepas de MRSA, e a combinação SV e AgNPbio demonstrou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* ESBL.

2.4.2 Poli (ϵ -caprolactona)

A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster um alifático linear semicristalino, com temperatura de transição vítrea (Tg) de -60°C e temperatura de fusão cristalina (Tm) variando de 59 a 64°C dependendo da natureza cristalina da PCL. É solúvel em clorofórmio, tolueno e insolúvel em etanol e éter. Tem boas propriedades mecânicas e é amplamente compatível com muitos tipos de polímeros, sendo muito aplicado em suturas reabsorvíveis, e, recentemente, em substitutos de enxerto ósseo. A PCL é um dos polímeros mais biodegradáveis e hidrofóbicos disponíveis comercialmente. Possui diversas características que tornam seu uso atraente em sistemas de liberação de fármacos: biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta cristalinidade e permeabilidade a diversas moléculas pequenas e integridade do polímero durante a produção. (ELZEIN *et al.*, 2004; SÁ, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga (Hermle Z326K, Wehingen, Alemanha);
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência (SHIMADZU, modelo Nexera X2 System®, Quioto, Japão);

Módulos:

- DGU-20A5RA - degaseificador
 - LC-30AD - bomba
 - SIL-30AC - autosampler/amostrador
 - SPD-M20A - detector DAD
 - CTO-20A - forno
 - CBM-20 - módulo integrador
 - Software Labsolutions versão 5.73
 - Coluna C18 Shim-pack XR-ODS III, 200X2 mm, tamanho de partícula 2.2 µm, com pré-coluna C18.
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
 - Difrátômetro de raio-X (SHIMADZU, modelo XRD-6000, Quioto, Japão);
 - Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
 - Evaporador rotatório (FISATOM, modelo 801, Diadema, Brasil);
 - Liofilizador (LIOTOP, L202, São Paulo, Brasil);
 - Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
 - Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca);
 - pHmetro digital (HANNA, HI 2221, São Paulo, Brasil); Ultrafreezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos);
 - Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, NANO ZS 90, Malvern Reino Unido). Ultrafreezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos).

3.2 REAGENTES E SOLVENTES

3.2.1 SV

- SV – SIV (Mw 418,57 g.mol⁻¹, Lote DK40-1506061, Certificado por Galena®).

3.2.2 Polímero

- Poli (ϵ -caprolactona) (Mw 14.000 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil).

3.2.3 Água purificada

- Água purificada pelo processo de destilação (H₂O destilada), em equipamento tipo Pilsen (Fanem LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Água ultra purificada pelo sistema de ultra purificação em equipamento Milli-Q (Merck, Integral 5, Darmstadt, Alemanha).

3.2.4 Solventes e demais reagentes

- Acetona ((CH₃)₂CO) (Synth, Diadema, Brasil);
- Ácido Clorídrico (HCl) (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Ácido Fórmico (CH₂O₂) (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos);
- Clorofórmio deuterado (CDCl₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos);
- Hidróxido de Sódio (NaOH) (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil);
- Lactose Mono-Hidratada PA (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Metanol (CH₃OH) grau HPLC (Hexis Científica, Phillipsburg, Estados Unidos);
- Monooleato de sorbitano etoxilado 20 (polissorbato 80, Tween® 80, Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80®, OXITENO, Mauá, São Paulo);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil).

3.3 OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO SV

As suspensões de nanocápsulas obtidas a partir do polímero PCL contendo SV foram preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação) descrito por Fessi *et al.* (1989), cuja formulação encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Formulações das nanocápsulas poliméricas contendo SV, obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado

COMPOSIÇÃO	FORMULAÇÃO	
	NC-N	NC-SV
	(0 mg/mL)	(20 mg/mL)
FASE AQUOSA		
Tween 80® (g)	0,077	0,077
Água ultrapura (mL)	53	53
FASE ORGÂNICA		
SV (g)	–	0,2
PCL (g)	0,1	0,1
Span 80® (g)	0,077	0,077
TCM* (g)	0,3	0,3
Acetona (mL)	27	27

TCM – triglicerídeos de cadeia média

Fonte: O autor (2020)

Uma massa de 100 mg do polímero (PCL 14.000 MM) foi solvatada em acetona (27 mL) em presença de monooleato de sorbitato - Span® 80 (77 mg), SV (200 mg) e triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (TCC, 300 mg), assim, a fase orgânica. Em seguida, foi gotejado lentamente na fase aquosa contendo água (53 mL) e Tween 80® (polissorbato 80) (77 mg), previamente preparada e mantida sob agitação magnética vigorosa e temperatura de 40°C. A agitação magnética foi mantida por mais 10 minutos após o término do gotejamento e o solvente foi, então, eliminado por rotoevaporação, usando Rotoevaporador, atingindo um volume final de 10 mL e concentração estimada do SV de 20 mg.mL⁻¹.

Para fins comparativos, foi preparada uma suspensão de nanocápsulas sem a adição do SV (NC-0), como controle negativo e todas as formulações foram preparadas em triplicata.

3.3.1 Mistura física

A mistura física (MF) na proporção, em massa, de 1:1 (SV:PCL) (50% m/m), foi preparada para uma caracterização comparativa.

3.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO

Para avaliar a capacidade de retenção de nanopartículas para a SV, foi utilizado um método de quantificação indireta, como o usado por Clementino e Sonvicoa (2018). Esta abordagem consiste na determinação do SV não encapsulado ou precipitado, e sua subtração da quantidade total de SV quantificada na formulação, com o uso de cromatografia líquida de ultra alto desempenho com detector de matriz de fotodiodo (UHPLC-DAD).

Foi utilizado Cromatógrafo líquido de ultra eficiência: (SHIMADZU, modelo Nexera X2 System®, Quioto, Japão).

Foram as seguintes as condições do método:

- Fase móvel: acetonitrila:água pH 3,0 com ácido fosfórico (83:17, V/V).
- Fluxo 0,75 mL.min⁻¹. Temperatura 40 °C. Volume de injeção 3 µL.
- Comprimento de onda 237 nm.
- Tempo de corrida 2,1 min.
- Tempo de retenção da SV 1,7 min.

Foram preparadas três soluções contendo SV a serem testadas com uma concentração de 1 mg/mL, contendo acetonitrila e água 65:35, v/v (com pH 4.5 ajustados com 1.0 M H₃PO₄). Foi preparada uma solução padrão em triplicata, com concentração de 1, 2, 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, usando-se a mesma mistura de diluente: etanol: acetonitrila: água (55:30:15, v/v/v, pH* 4.5).

3.4.1 Limite de detecção e quantificação

A determinação de LOQ (limite de quantificação) e LOD (limite de detecção) para todos os analitos foram calculados considerando o desvio padrão da resposta e a média do declive de uma curva de calibração específica variando de 0,25 a 25 µg / ml, usando as seguintes fórmulas:

$$\text{LOQ} = 10\sigma / S \quad \text{LOD} = 3,3\sigma / S$$

onde σ é o desvio padrão da resposta e S a inclinação da curva de calibração.

3.4.2 Linearidade

As soluções de calibração padrão foram preparadas na faixa de 0,5–25 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Para acessar a linearidade na faixa de concentração, as amostras foram injetadas seis vezes por concentração e os valores de área de pico foram registrados para representar graficamente a resposta do detector em relação às concentrações de analitos. As soluções estoque de NC-SV, preparadas em um frasco volumétrico de 10 ml, usando acetonitrila: água 65:35, mistura v / v (pH 4,5, ajustado com H_3PO_4 1,0 M) a 1 mg / mL e 0,1 mg / mL, respectivamente. As soluções padrão utilizadas na validação do método foram preparadas diluindo a solução de trabalho na mesma mistura de diluente etanol: acetonitrila: água (55:30:15, v / v / v, pH * 4,5) para obter a seguinte faixa de concentração da curva de calibração: 0,5, 1, 2, 5, 10 e 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

3.4.3 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). Para avaliar a precisão do método, avaliamos o desvio padrão relativo (RSD) da recuperação da concentração usando os níveis de concentração mais baixo, central e mais alto da curva de calibração (0,5–2–25 $\mu\text{g} / \text{mL}$) em triplicado. A precisão inter-dia foi avaliada analisando as mesmas três concentrações em 3 dias diferentes. A recuperação média e RSD foram calculados usando seis injeções por amostra.

3.4.4 Robustez

A robustez de um método é definida como uma medida de sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas, mas deliberadas variações nos parâmetros do método. Em nosso método, a robustez foi realizada por mudanças significativas em três parâmetros cromatográficos principais: temperatura da coluna (2°C), taxa de fluxo da fase móvel (reduzida em 0,2 mL / min) e pH (0,3 unidades de pH).

3.4.5 Eficiência de encapsulação de nanopartículas

Para avaliar a capacidade de aprisionamento de SV nas NC nanopartículas, essa abordagem consiste na determinação dos fármacos não encapsulados ou precipitados e sua subtração da quantidade total de fármacos quantificados na formulação. Para quantificar a quantidade total de SV, 100 µL de nanoemulsão foram dispersos em 10 mL da solução de diluente padrão (ou seja, etanol: acetonitrila: água) e sonicados por 45 min para extrair quantitativamente os medicamentos das nanopartículas. As amostras foram filtradas (filtros de celulose regenerada 0,45 µm, Sartorius, Göttingen, Alemanha) e analisadas por UHPLC para conteúdo de SV. Para quantificar a quantidade de fármacos livres, inicialmente, as formulações foram centrifugadas a 1.500 g por 10 min para separar quaisquer cristais grandes ou aglomerados de nanopartículas. Os tubos da centrífuga foram lavados com o diluente do SV e analisados seguindo a mesma metodologia aplicada acima. Finalmente, 2 ml do sobrenadante da nanoemulsão obtido na etapa anterior foram ultrafiltrados a 4000 g por 10 min, e as amostras ultrafiltradas foram analisadas em HPLC para amostras não dissolvidas fármacos encapsulados. Todas as quantificações foram determinadas como concentração por UHPLC e expressas como porcentagem de massa de recuperação ($n = 3 \pm DP$).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

3.5.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em um potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação. Os resultados representam a média de três amostras diferentes.

3.5.2 Espectrometria de difração a laser

O tamanho de partícula e potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico, após o preparo de uma suspensão das nanocápsulas (1:500, V/V) em água ultrapura. As medidas, em triplicata, foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer.

3.5.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (*Field emission gun scanning electron microscopy* – FE-SEM)

A avaliação morfológica e de superfície foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo. As amostras foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

3.5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* – FTIR)

Os sistemas poliméricos foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige 21 (SHIMADZU, Quito, Japão), na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scan.min^{-1} . Os espectros obtidos serão avaliados frente aos espectros do SV puro e da formulação branco referente.

3.5.5 Difração de raios X (*X-ray diffraction* – DRX)

As nanopartículas foram examinadas em difratômetro de raios X Shimadzu XRD-6000, *scan* de 2°.min⁻¹ e 2θ de 5° a 80°, radiação K α de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV, em varredura contínua, velocidade de 2 graus/min, passo 0,02, DHL 10 mm, DS 1 grau, RS 0,3 mm, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

3.6 PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os perfis de liberação de SV de nanocápsulas poliméricas foram obtidos pela técnica de difusão por diálise. Cada amostra (solução a 30% de etanol-água de SV e NC-SV) foi colocada em um saco de diálise (tubo de membrana porosa molecular Spectra / Por®, MWCO 10.000, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, EUA) em uma concentração equivalente de 1 mg / mL e um volume

final de 3 mL. Este sistema foi então imerso em 500 mL de água com 30% de etanol a 37°C e sob agitação magnética contínua de 50 rpm. Alíquotas de 5 mL foram retiradas em intervalos de tempo predeterminados e substituídas pelo mesmo volume de meio fresco. A quantidade de SV liberada foi avaliada pelo método UHPLC descrito. O experimento foi realizado em triplicata a partir de três lotes independentes.

3.7 ESTUDO *IN VIVO*

O experimento foi submetido ao Comitê de ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sendo aprovado sob número 037/2018. (Anexo A). Os dados dos ratos do grupo *sham* são oriundos do experimento liberado sob número 025/2015.

3.7.1 Amostra

Foram utilizados 48 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, o número da amostra foi calculado no programa G. POWER 3.1.9.2, para uma força de 80%. O número de animais foi acrescido em 20%, com o intuito de se ter um N maior, e, caso existam perdas durante a fase experimental, que elas não interfiram nos resultados (Anexo B).

3.7.2 Ambiente de experimentação

O estudo foi realizado no laboratório de técnica operatória e cirurgia experimental da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Os animais com 90 dias e peso aproximado de 200g, oriundos do Biotério Central da UEPG. O experimento teve duração de 28 dias, todos os animais foram mantidos em gaiolas etiquetadas (Apêndice A), sendo o número máximo de cinco animais por gaiola, com ração comercial e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura e umidade controladas, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram marcados com caneta dermatográfica e as gaiolas foram etiquetadas. Foram preenchidas as planilhas de acompanhamento (Apêndice B).

3.7.3 Indução da fibrose

Para indução da fibrose, foi utilizado o modelo de injeção intraperitoneal com uso de solução de diálise, com glicose a 4,25%, tamponada com lactato. A infusão da solução de diálise foi por injeção intraperitoneal, com uso de agulha 25x7. A contenção dos animais para a realização dos procedimentos foi realizada conforme a seguinte técnica: o dedo indicador e o polegar foram posicionados abaixo do pescoço, atrás da mandíbula, puxando a pele do animal acima da região das orelhas, contendo o animal, com objetivo de evitar danos ao mesmo e ao experimentador. Os outros três dedos seguravam a pele, fazendo pressão em direção à palma da mão para conter o corpo (NEVES *et al.*, 2013).

Para a gavagem, foi utilizada sonda curvada, com o animal contido e com a cabeça imobilizada. Para a infusão da solução de diálise, o animal foi imobilizado do modo anteriormente descrito, sendo o mesmo posicionado com a sua face ventral voltada para cima. A injeção foi aplicada no quadrante posterior do abdome, do lado esquerdo do animal e do direito do operador. A solução foi injetada na cavidade peritoneal entre os órgãos abdominais.

3.7.4 Formulações contendo SV

A SV foi administrada por gavagem, com a utilização de sonda curvada de aço, com ponta bola, de 8 cm de extensão, diâmetro externo de 1,5 mm, produzida pela empresa D.L. Mico[®], utilizando-se seringa de insulina para infundir o SV.

Foram utilizadas duas formulações para o experimento:

1. SV convencional, preparada com sacarina sódica, aerosil e óleo de amêndoa doce¹.
2. SV em suspensões de nanocápsulas, obtidas a partir do polímero PCL, preparadas por meio de deposição interfacial do polímero pré-formado.

3.7.5 Grupos experimentais

Foram quatro grupos experimentais, divididos da seguinte forma:

¹ Preparado conforme Preparações Orais Líquidas (FERREIRA; SOUZA, 2007).

- Grupo *sham*: Composto por 12 animais, que durante 28 dias foram submetidos, diariamente, à punção peritoneal, contudo não foram infundidas quaisquer soluções.
- Grupo DP: Composto por 12 animais, que durante 28 dias foram submetidos, diariamente, à punção peritoneal e infundidos com solução de diálise peritoneal com uma concentração de glicose a 4,25%, a 35°C, tamponada com lactato, sendo utilizada uma dose de 10 mL por 100g de peso do animal, sendo este o grupo controle para diálise peritoneal.
- Grupo SV: Composto por 12 animais, que durante 28 dias foram submetidos, diariamente, à punção peritoneal e infundidos com solução de diálise peritoneal com uma concentração de glicose a 4,25%, a 35°, tamponada com lactato, sendo utilizada uma dose de 10 mL por 100g de peso do animal. Além disso, cada animal do grupo recebeu, diariamente, durante 28 dias, 4 mg/kg de SV por meio de gavagem.
- Grupo NC-SV: Composto por 12 animais, que durante 28 dias foram submetidos, diariamente, à punção peritoneal e infundidos com solução de diálise peritoneal com uma concentração de glicose a 4,25%, a 35°, tamponada com lactato, sendo utilizada uma dose de 10 ml por 100g de peso do animal. Além disso, o grupo recebeu SV em nanocápsulas na dose de 4 mg/kg de SV.

3.7.6 Coleta de Material

Para avaliação da espessura peritoneal, os animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 foram submetidos a procedimento para coleta de material no 29º dia, conforme descrição:

1. Indução anestésica – realizada com a administração de 150 mg/kg Intramuscular de cetamina e 20 mg/kg Intramuscular de xilazina;
2. Tricotomia da porção ventral da parede abdominal;
3. Fixação do rato em prancha própria para espécie, utilizando-se de esparadrapo;
4. Incisão mediana xifopúbica, com abertura e exploração da cavidade abdominal;
5. Retirada do baço, para análise do peritônio visceral;

6. Retirada da parede abdominal do quadrante superior direito, para análise histológica do peritônio parietal;
7. Para realização da eutanásia nos ratos, foi utilizado o método de deslocamento cervical após indução anestésica. Será preenchida a descrição da operação (Apêndice C).

3.7.7 Análise do material

Os materiais obtidos, fragmentos de parede abdominal e baços, foram encaminhados para análise histológica no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, sendo preenchido o formulário de encaminhamento (Apêndice D). O material foi preparado em blocos de parafina e cortado na espessura de cinco micrômetros. Foram utilizadas as colorações hematoxilina - eosina (HE) e Sirius Red.

O patologista analisou as amostras de modo cego.

Foi utilizado microscópio Scope.A1 (ZEISS, Alemanha) para mensuração de colágeno, e o escâner de lâminas Axio Scam.Z1 (ZEISS, Alemanha) para realização de IHQ e mensuração de espessura. Para captação das imagens, foi utilizado scanner de lâminas AxioScan da Zeiss®.

As imagens foram analisadas utilizando-se o aplicativo Image Plus® 4.5 para Windows® da MediaCybernetics. Foi medida a espessura do peritônio, tanto do parietal como do visceral. Em cada lâmina, foram escolhidos 10 campos histológicos, e em cada campo foram tomadas 10 medidas de espessura.

Foi mensurada de modo automatizado a quantidade de colágenos tipos I e III, usando-se para tal a coloração Sirius Red, sendo utilizado o mesmo programa acima referido.

Foi feita análise imuno-histoquímica. As amostras em parafina, com 4µm de espessura, foram hidratadas em soluções com concentração decrescente de álcool e foram incubadas em peróxido de hidrogênio 5% e metanol. Para identificação do antígeno, as amostras foram imersas em Immunno Retrivial® (Dako, Carpinteria, CA, USA). A seguir o material foi incubado numa solução diluída 1:100 de anticorpos monoclonais anti-TNF-α de coelhos (ab6671, Abcam®, Cambridge, UK) a 4º, em câmara úmida, por uma noite, e para IL-6 (ab9324, Abcam®, Cambridge, UK). Foi usada a diluição de 1/100, usando anticorpos monoclonais anti-IL6. A detecção foi

realizada com Advance, seguido por enzima Advance (Dako, código K406889), ambos por 30 minutos a 28-28° em câmara úmida. A reação foi realizada usando solução de cromógeno 3-3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical, St. Louis, USA, código D7679), seguido por coloração com solução de hematoxilina de Harris (Biotec), desidratação com etanol, e diafanização em xileno.

As lâminas foram observadas por meio do scanner digital de lâminas Axio Scan.Z1 e do programa ZEN 2.3 (Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Alemanha) quanto à presença / ausência de TNF- α e IL-6, que foi expresso em porcentagem por campo de grande aumento (HPF) nas amostras do peritônio.

Os dados estatísticos obtidos no estudo foram calculados usando o teste da análise da variância (ANOVA), utilizando o pós teste de TUCKEY, com um valor de p de 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

As nanocápsulas de PCL contendo SV (NC-SV) e as formulações preparadas como controle negativo (NC-0) foram obtidas com êxito pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação). Todas as formulações se tornaram opacas como leite no instante em que a fase orgânica foi adicionada na fase aquosa.

4.2 PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR UHPLC/DAD PARA A QUANTIFICAÇÃO DO SV

Antecedendo a análise da eficiência de encapsulação da SV nas nanocápsulas poliméricas, foram obtidos resultados para diferentes parâmetros analíticos de validação, conforme o discriminado a seguir.

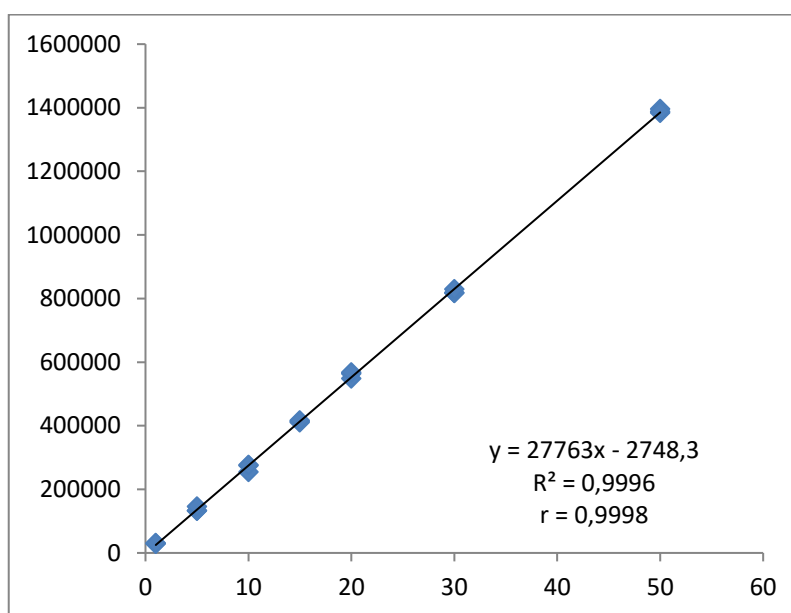
4.2.1 Linearidade e faixa de trabalho

O método analítico proposto mostrou-se linear, resultando nos seguintes dados:

- Faixa de concentração de 1,0 a 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- A equação linear obtida para o método foi $y = 27763x - 2748,3$ ($n = 3$, $r = 0,9998$);
- Limite de detecção 0,1564 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- Limite de quantificação 0,4740 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A Figura 11 demonstra a linearidade do método, com valor de “r” de 0,9998, o que se encontra próximo a 1. Isto representa que as variáveis área do pico e concentração são diretamente correlacionadas (BARBOSA *et al.*, 2020).

Figura 11 – Linearidade do método de UHPLC-DAD



Fonte: O autor (2020)

4.2.2 Precisão

Foi avaliada a precisão, resumida na Tabela 5, expressa como variação intra-dia, inter-dia e com diferentes analistas. Os valores referentes ao desvio padrão relativo foram inferiores a 5%. Quando o RSD é menor que 5%, fica demonstrado que o método analítico proposto é preciso (CARLETTO *et al.*, 2020).

Tabela 2 – Dados da repetitividade e precisão intermediária

	Concentração Teórica (µg.mL ⁻¹)	Concentração Experimental (µg.mL ⁻¹ , Média ± DP*)	RSD** (%)
Repetibilidade			
n = 6	15	15,16 ± 0,20	1,32
n = 3	3	3,08 ± 0,02	0,06
n = 3	18	18,32 ± 0,32	1,72
n = 3	35	35,67 ± 0,20	0,58
Precisão intermediária			
Intra-dia			
n = 6	15	15,16 ± 0,07	0,49
n = 3	3	3,08 ± 0,01	0,25
n = 3	18	18,30 ± 0,29	1,56
n = 3	35	35,61 ± 0,23	0,63
Inter-dia			
n = 6	15	15,14 ± 0,19	1,27
n = 3	3	3,09 ± 0,01	0,43
n = 3	18	18,27 ± 0,28	1,54
n = 3	35	35,48 ± 0,32	0,89
Diferentes analistas			
n = 6	15	15,11 ± 0,28	1,88
n = 3	3	3,08 ± 0,01	0,15
n = 3	18	18,41 ± 0,25	1,35
n = 3	35	35,48 ± 0,35	0,99

*DP: desvio padrão; ** RSD: desvio padrão relativo

Fonte: O autor (2020)

4.2.3 Exatidão

A exatidão do método por ensaios de recuperação foi determinada pela adição de quantidade conhecida de SV (10,0 µg) às soluções de 3,0; 18,0 e 35,0 µg.mL⁻¹, resultando nas concentrações teóricas finais de 13,0; 28,0 e 45,0 µg.mL⁻¹, respectivamente. A Tabela 6 resume os resultados obtidos. Novamente, o desvio padrão relativo foi inferior a 5% para os três níveis de concentração, o que indica que o método analítico proposto fornece resultados exatos.

Tabela 3 – Dados obtidos na análise de exatidão pelo método de recuperação

Concentração teórica final (µg.mL⁻¹)	Exatidão (% ± DP*)	RSD** (%)
13	100,84 ± 0,22	0,22
28	97,05 ± 0,97	1,00
45	98,66 ± 0,62	0,62

*DP: desvio padrão; ** RSD: desvio padrão relativo

Fonte: O autor (2020)

4.2.4 Robustez

Diferentes valores de RSD foram verificados quando das alterações propostas no estudo de robustez, conforme o descrito abaixo:

- a. Alterando o fluxo para 0,65 → RSD = 0,56 %;
- b. Alterando o fluxo para 0,85 → RSD = 3,03 %;
- c. Alterando o pH para 5,2 → RSD = 0,75 %;
- d. Alterando o pH para 5,8 → RSD = 0,72 %;
- e. Alterando a temperatura para 38 °C → RSD = 0,68 %;
- f. Alterando a temperatura para 42 °C → RSD = 0,71%.

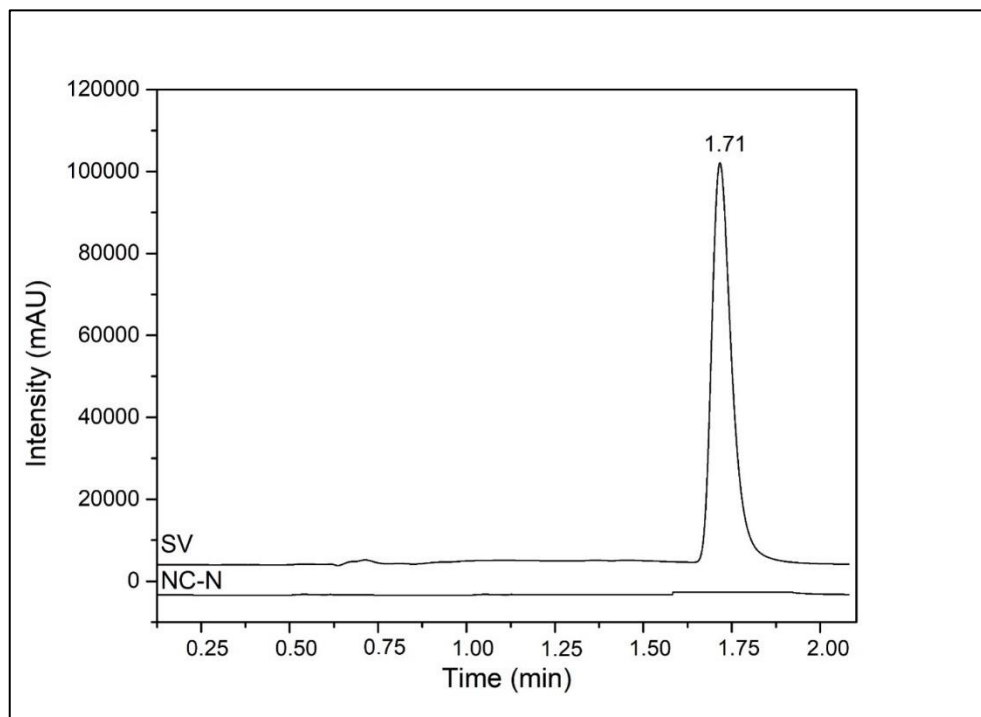
A análise estatística por meio do teste de Tukey não revelou diferença significativa entre os resultados, quando comparados com as condições analíticas padronizadas. Assim, o método provou ser robusto para o SV analisado, sob as condições avaliadas.

4.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível determinar a concentração de SV nanoencapsulada e, na sequência, calcular a eficiência de encapsulação. A

eficiência de encapsulação obtida foi elevada, com valor médio de 99,87%. O cromatograma obtido está na Figura 12, demonstrando o tempo de retenção de 1,71 min para a SV. A nanocápsula sem SV não revelou pico neste tempo de retenção.

Figura 12 – Cromatograma da NC-SV e NC-N



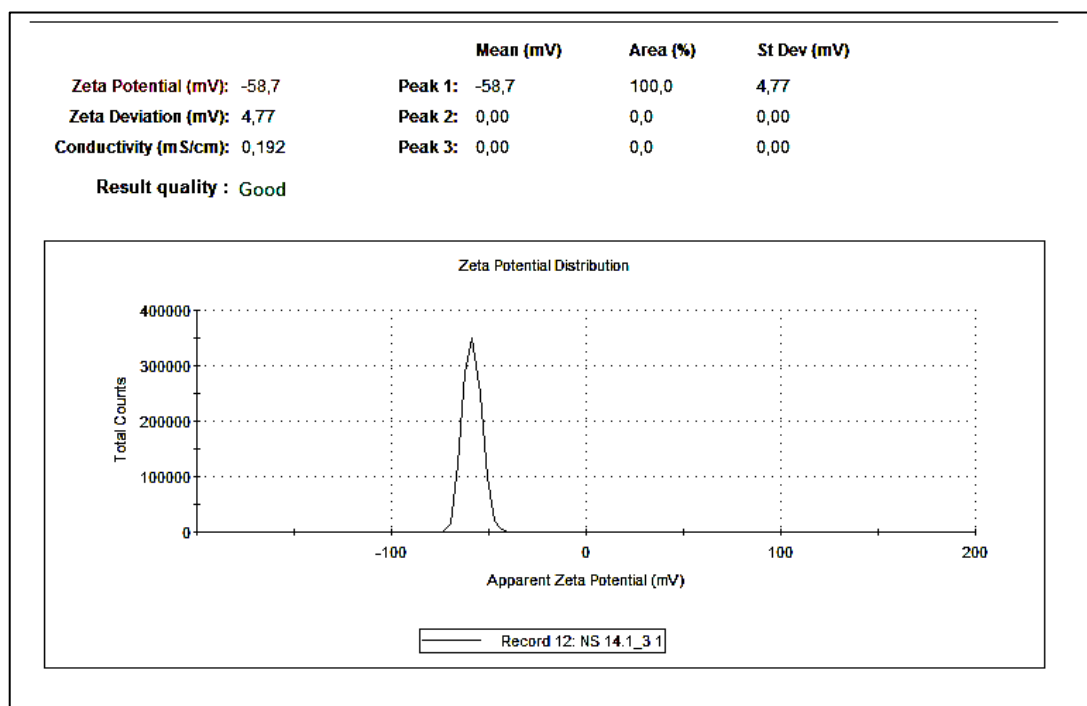
Fonte: O autor (2020)

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

4.4.1 Espectrometria de difração a laser

As NC-SV mostraram tamanho médio de 332nm, apresentando Índice de Polidispersão (PDI) de 0.290, com potencial zeta de $-58,7\text{mV}$, conforme Figura 13. As mensurações feitas por FE-SEM confirmaram estes resultados.

Figura 13 – Tamanho médio e potencial zeta da formulação NC-SV

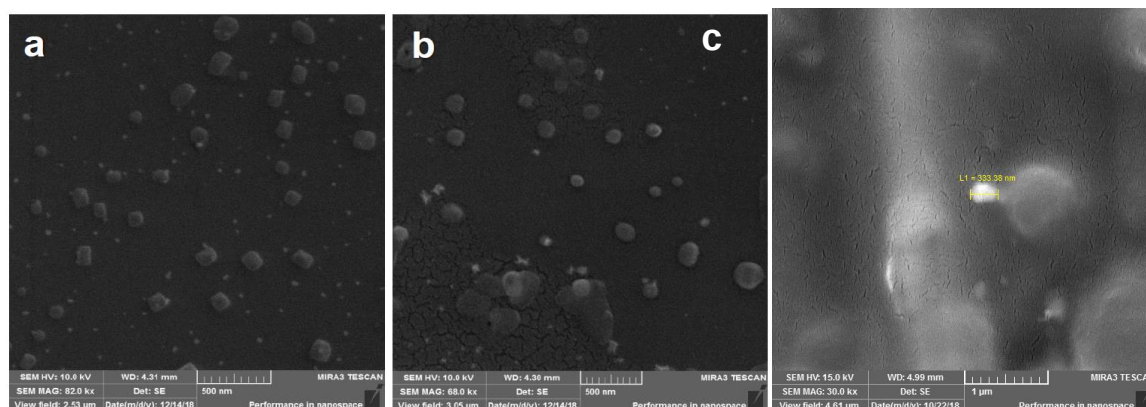


Fonte: O autor (2020)

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM)

As fotomicrografias obtidas por FE-SEM para a formulação NC-SV e NC-0 (sem SV) mostraram formato esférico, com superfície lisa e distribuição uniforme, sem a presença de poros, conforme visualizado na Figura 14.

Figura 14 – Fotomicrografia das formulações NC-SV e NC-0 observadas por FE-SEM; (a) NC-SV (aumento de 68 kx) e (b) NC-0 (aumento de 83 kx) (c) NC-SV (aumento 30kx) com mensuração de tamanho de partículas

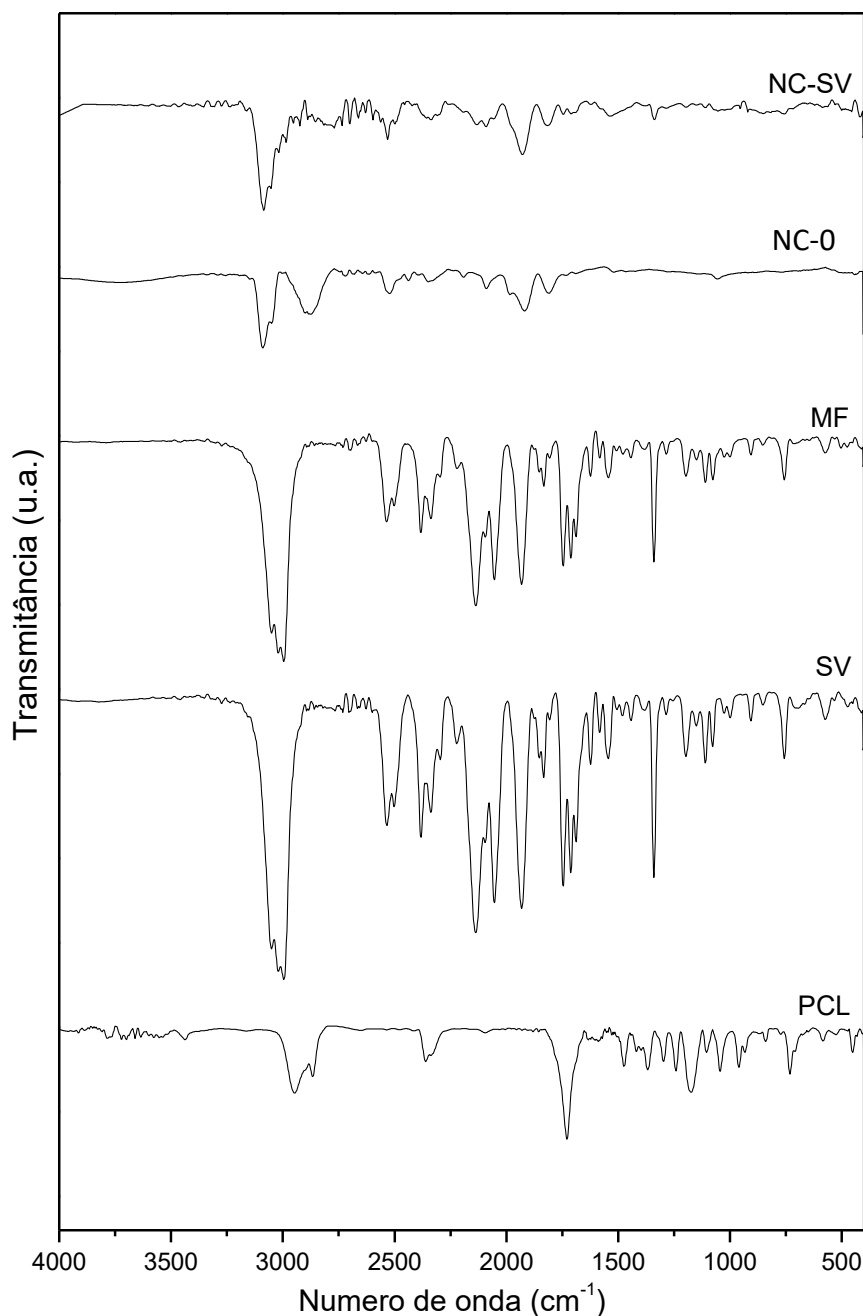


Fonte: O autor (2020)

4.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A Figura 15 mostra os espectros de FTIR obtidos para o polímero puro, para o SV puro, para a mistura física e para as formulações de nanocápsulas poliméricas.

Figura 15 – Espectroscopia FTIR das formulações

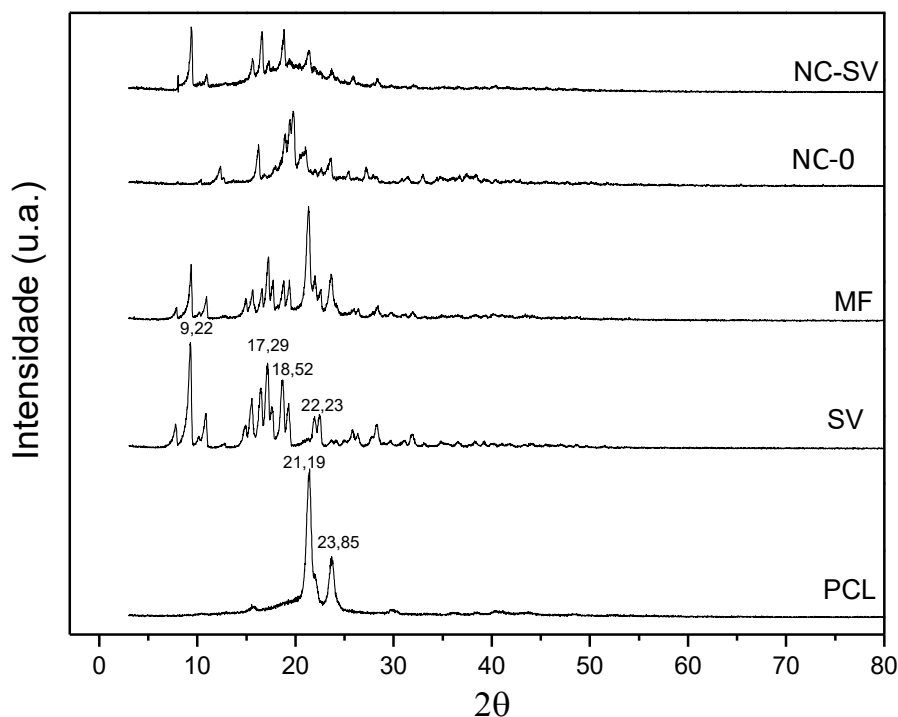


NC-SV – nanocápsulas de SV; NC-0 – nanocápsulas sem SV;
MF – mistura física dos componentes; SV – SV pura; PCL - policaprolactona
Fonte: O autor (2020)

O espectro de FTIR do polímero PCL apresenta bandas características do poliéster alifático, com uma intensa banda de absorção a 1720 cm^{-1} atribuída às ligações éster. Observam-se também valores em 2945 cm^{-1} e 2865 cm^{-1} correspondentes à vibração da ligação CH_2 assimétrica e simétrica, respectivamente. O espectro do SV puro mostrou bandas características em 3012 cm^{-1} ($\text{C}=\text{CH}$) $1698,9\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O}$ aromático), $1466,7\text{ cm}^{-1}$ (anel de benzeno). O espectro da mistura física mostrou as mesmas características reveladas pelos materiais de partida. A formulação NC-SV apresentou o mesmo padrão, obviamente em intensidade menor, dada a concentração do SV usada na preparação, e também por estar profundamente na nanocápsula. Na formulação NC-N (sem SV), o padrão foi diferente, justamente pela ausência do SV.

4.4.4 Difração de raios X (DRX)

Figura 16 – Difratoograma a 2θ das formulações



NC-SV – nanocápsulas contendo SV; NC-0 – nanocápsulas sem SV; MF – mistura física dos componentes; SV – SV pura; PCL – policaprolactona
 Fonte: O autor (2020)

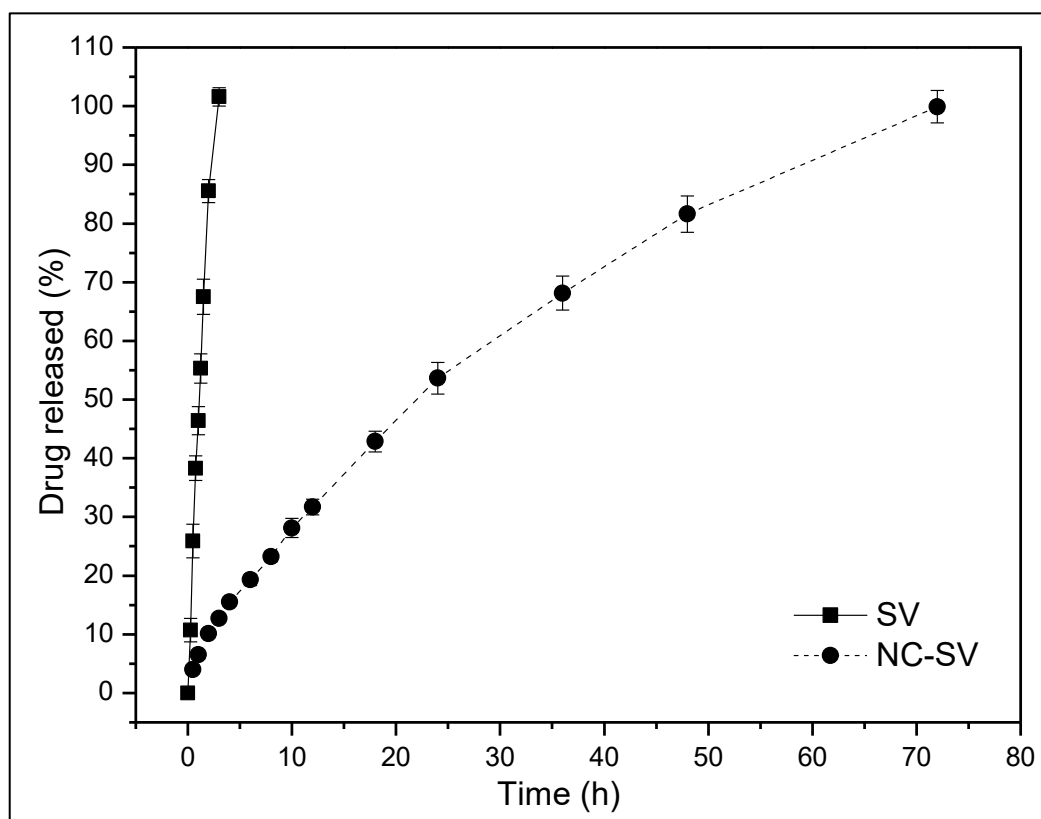
O difratograma da SV, visto na Figura 16, detectou picos intensos a 2θ , equivalente a $9,22^\circ$; $17,29^\circ$; $18,52^\circ$; $22,23^\circ$. Estes picos evidenciam a natureza

cristalina do SV e sua estrutura atômica organizada. O PCL mostrou dois picos cristalinos de reflexão em $21,19^\circ$ e $23,85^\circ$. Na mistura física, ocorre uma superposição dos picos de PCL e SV. Do mesmo modo se observa nas NC-SV.

4.5 PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O perfil de liberação do SV puro (SV) e da NC-SV estão mostrados na Figura 17, considerando-se o teste de dissolução por diálise realizado. A SV mostrou um perfil de liberação com difusão rápida ao meio etanol-água, e atingiu uma média de liberação de 80% depois de 148 min. As NC-SV tiveram uma liberação de 80% da SV aos 2.880 min, ou seja, em 48 h. Assim, as NC-SV mostraram um padrão de liberação prolongada, sem apresentarem liberação imediata (*burst effect*), de modo diverso do SV puro. No presente estudo, uma típica estrutura polimérica envolvendo um núcleo lipofílico foi planejada para impedir a liberação imediata e para obter liberação prolongada, permitindo ação prolongada do SV e evitando múltiplas administrações diárias da SV.

Figura 17 – Perfil de Liberação *in vitro* da SV livre e da formulação NC-SV em solução aquosa contendo 30% de etanol.



Fonte: O autor (2020)

4.6 ESTUDO *IN VIVO*

Do grupo inicial de 48 animais, houve perdas por motivos variáveis: óbito por perfuração intestinal, óbito por possível perfuração de esôfago. Também foi descartado um animal que apresentou abscesso região cervical (para o qual não se encontrou relação aos procedimentos adotados), e dois animais apresentaram lesão de parede abdominal, nos locais das punções, com formação de fibrose extensa e aderência de alças no local.

Ao final, restaram 10 animais no grupo sham, 9 animais no grupo DP, 8 animais no grupo SV e 12 animais no grupo NC-SV.

4.6.1 Avaliação da Espessura do Peritônio Parietal e Colágeno

Os resultados da análise histológica estão resumidos na Tabela 4. Em resumo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para a espessura peritoneal quando os grupos experimentais foram comparados.

No entanto, um aumento significativo no colágeno do tipo III, associado à inflamação, foi alcançado no grupo SV ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo *sham* e DP. Por sua vez, o efeito do NC-SV em relação ao colágeno tipo III foi estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) ao grupo Sham. A nanoformulação também revelou diferença estatística no colágeno tipo III quando comparado ao grupo SV ($p < 0,05$). A mesma significância estatística foi obtida para o colágeno tipo I usual, considerando os grupos estudados, devido à sua complementaridade no colágeno total, que chega a 100%. Os resultados também estão expressos nas Figuras 18 e 19.

Tabela 4 – Espessura do peritônio e Colágenos I e III

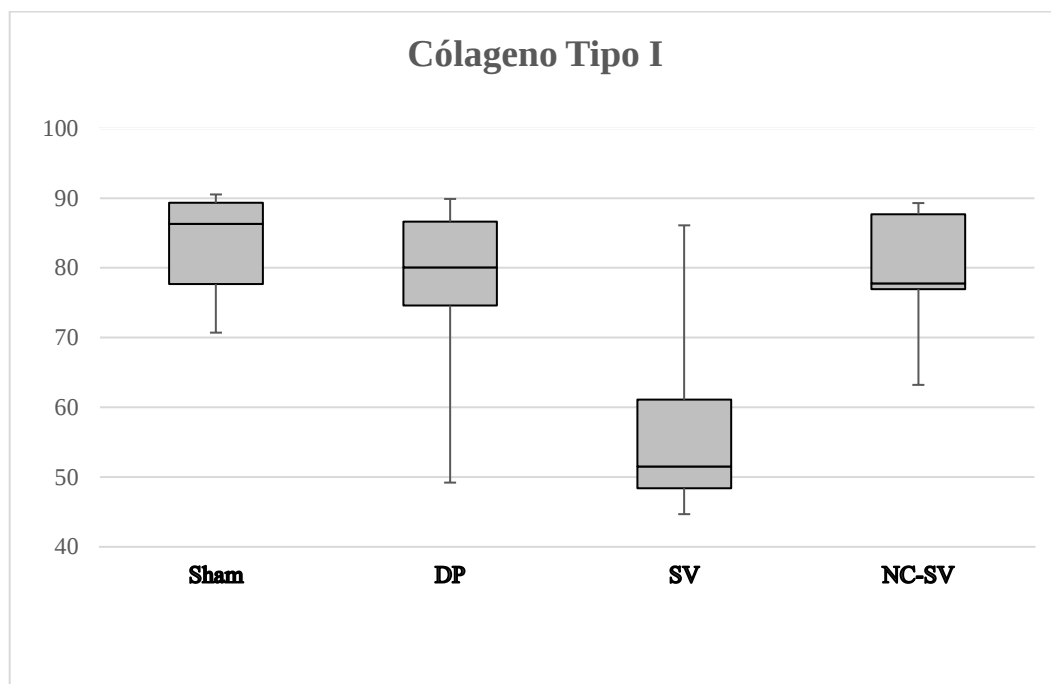
Parâmetros	Grupos Experimentais			
	SHAM	PD	SV	NC-SV
Espessura* (μm)	19.1 $\pm$ 6.0	20.1 $\pm$ 4.9	19.2 $\pm$ 6.1	25.5 $\pm$ 9.1
Colágeno tipo I* (%)	82.9 $\pm$ 7.8	77,2 $\pm$ 12.4	56.8 $\pm$ 13.6	79.6 $\pm$ 8.1
Colágeno tipo III* (%)	17.1 $\pm$ 7.8	22,8 $\pm$ 12.4	43.2 $\pm$ 13.6	20.4 $\pm$ 8.1
Colágeno relação tipo I : III	4.85 : 1	3,38 : 1	1.31 : 1	3.96 : 1
Aumento na expressão colágeno tipo III**	–	$\uparrow$ 1,33 vezes (+33%)	$\uparrow$ 2.53 vezes (+153%)	$\uparrow$ 1.19 vezes (+19%)

* Valores são representados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Diferenças significativas ocorre na relação Colágeno I : III no Grupo SV quando comparado aos demais

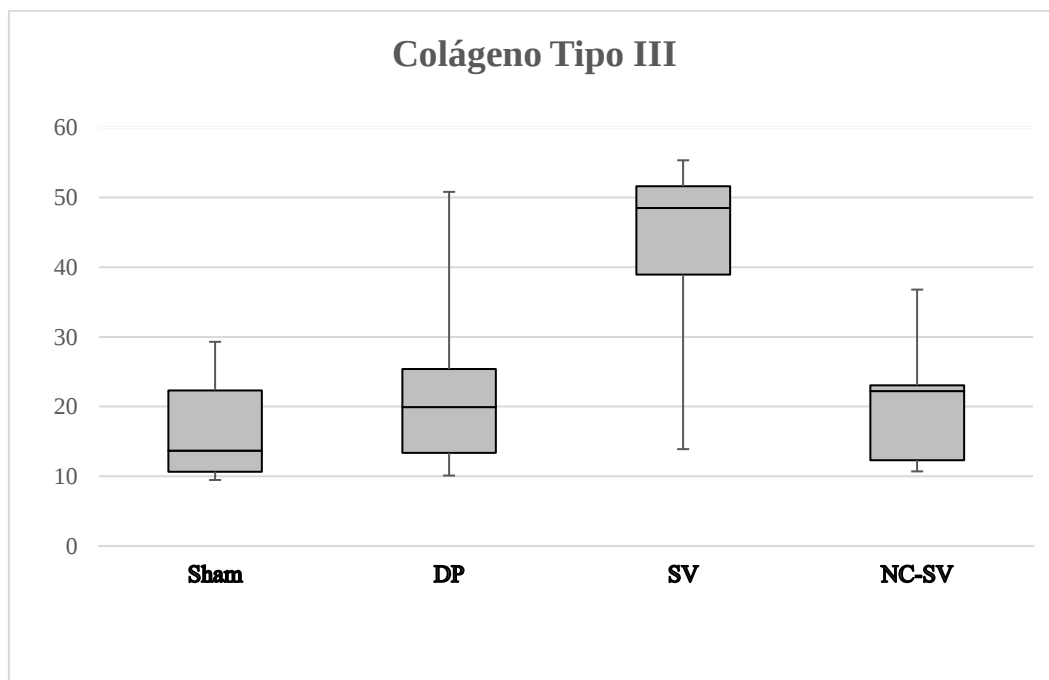
Fonte: O autor (2020)

Figura 18 - Expressão de Colágeno Tipo I nos grupos experimentais. Rebuscar.



Fonte: O autor (2020)

Figura 19 – Expressão de Colágeno Tipo III nos grupos experimentais

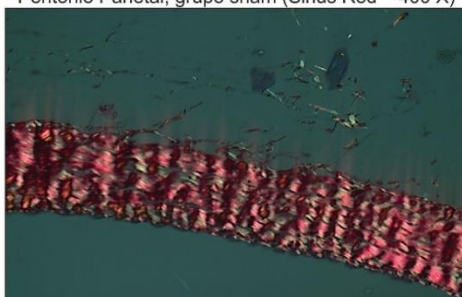


Fonte: O autor (2020)

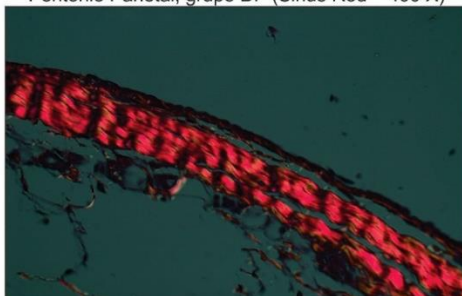
Figura 21 – Fotomicrografia de corte histológico. Peritônio Parietal. (Sirius Red – 400 X)
Verde – colágeno III Vermelho – colágeno I



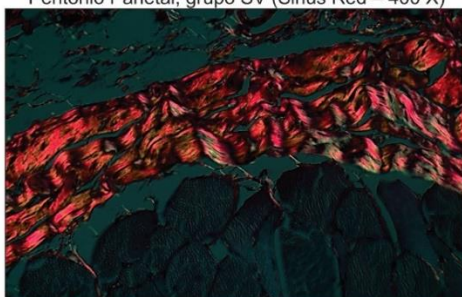
Fotomicrografia de corte histológico
Peritônio Parietal, grupo sham (Sirius Red – 400 X)



Fotomicrografia de corte histológico
Peritônio Parietal, grupo DP (Sirius Red – 400 X)



Fotomicrografia de corte histológico
Peritônio Parietal, grupo SV (Sirius Red – 400 X)



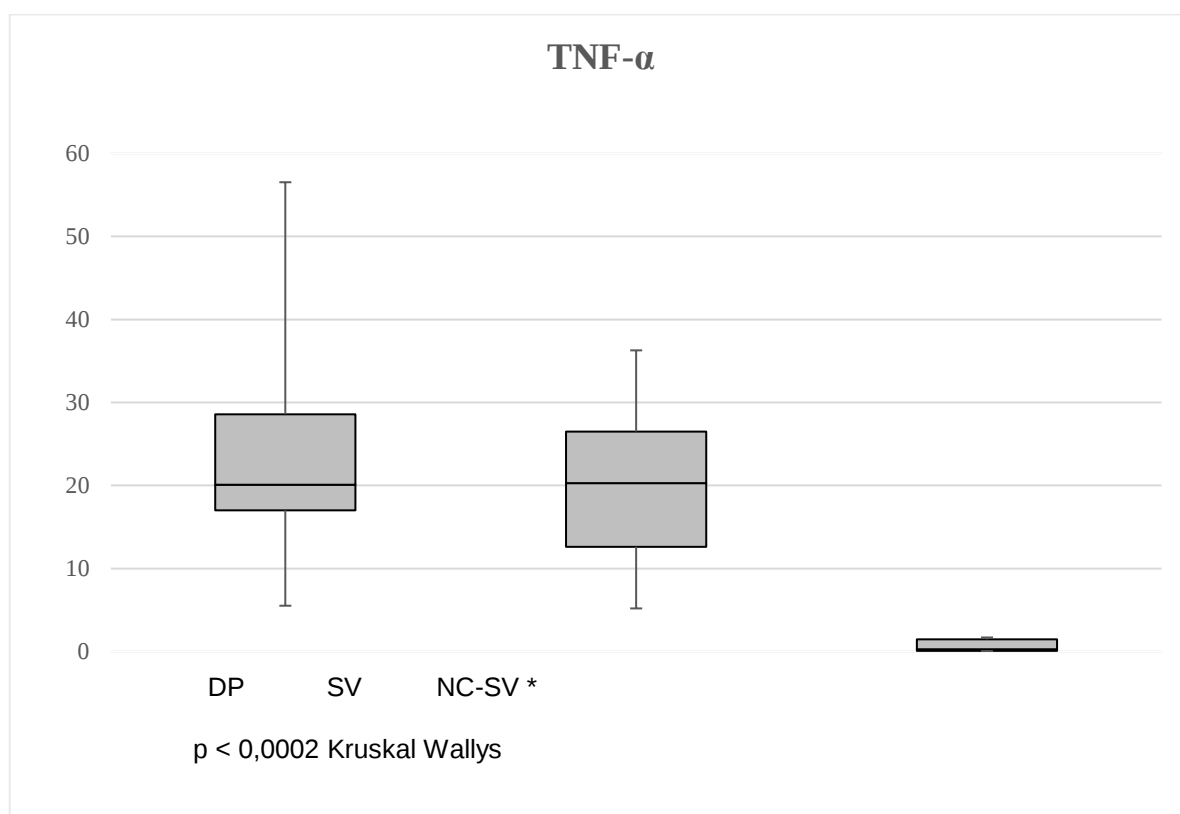
Fotomicrografia de corte histológico
Peritônio Parietal, grupo NC-SV (Sirius Red – 400 X)

Fonte: O autor (2020)

4.6.2 Avaliação da Expressão de TNF- α

A expressão tecidual de TNF- α , demonstrada na Figura 22, foi de $23,5 \pm 14,5\%$, $20,3 \pm 11,1\%$ e $0,79 \pm 0,76\%$ para os grupos DP, SV e NC-SV, respectivamente. Não foi observada diferença estatística entre os grupos DP e SV. No entanto, uma diminuição estatisticamente significativa na expressão de TNF- α nos tecidos foi alcançada quando o grupo NC-SV foi comparado com os grupos DP ($p < 0,0002$) e SV ($p < 0,0002$).

Figura 22 – Expressão de TNF- α nos grupos experimentais



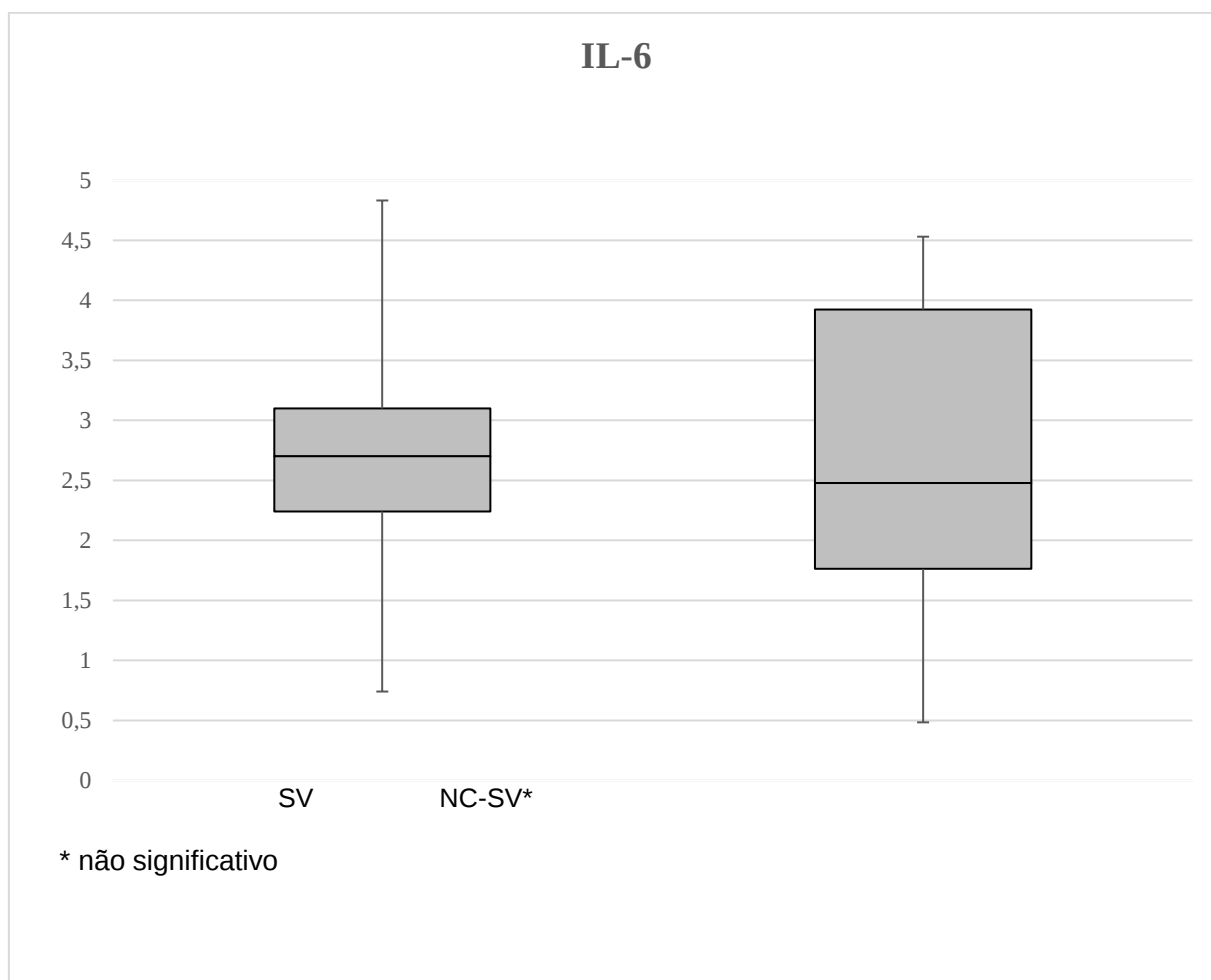
Fonte: O autor (2020)

As imagens imuno-histoquímica para a expressão do TNF- α no tecido peritoneal de ratos são apresentadas nas Figura 24. Os estudos de IHQ de TNF- α indicaram que a expressão da proteína TNF- α (% / campo de grande aumento - HPF) foi significativamente maior no corte peritoneal obtido dos grupos DP e SV. O tratamento de nanoformulação contendo SV (grupo NC-SV) evitou o aumento da expressão de TNF- α no tecido peritoneal

4.6.3 Avaliação da Expressão de IL-6.

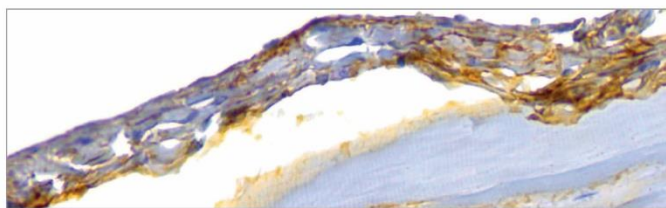
Com relação à IL-6, a expressão tecidual foi de $3,14 \pm 1,35\%$, $2,72 \pm 1,28\%$ e $2,62 \pm 1,32\%$ (HPF) para os grupos DP, VS e NC-SV, respectivamente. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos pareados, conforme visto na Figura 23. As imagens imuno-histoquímica para a expressão da IL-6 no tecido peritoneal de ratos são apresentadas na Figura 24.

Figura 23 – Expressão de IL-6 nos grupos experimentais



Fonte: O autor (2020)

Figura 24 – Fotomicrografia de imuno-histoquímica de TNF- α e IL-6 nos grupos experimentais estudados



Fotomicrografia IHQ TNF- α Grupo DP



Fotomicrografia IHQ TNF- α Grupo SV



Fotomicrografia IHQ TNF- α Grupo NC-SV



Fotomicrografia IHQ IL-6 Grupo SV



Fotomicrografia IHQ IL-6 Grupo NC-SV

Fonte: O autor (2020)

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, as nanocápsulas carregadas com SV foram obtidas com sucesso como nanossuspensões pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Esta formulação apresentou aspecto final azulado opalescente devido ao efeito Tyndall típico de coloides (RUDNIK *et al.*, 2020; CAMARGO *et al.*, 2020).

O tamanho médio de partícula e o valor PDI foram semelhantes aos previamente registrados por espectroscopia de correlação de fótons para outras nanocápsulas poliméricas (MATTIAZZI *et al.*, 2019).

Valores de PDI próximos de zero são considerados monodispersos e maiores que 0,5 indicam dispersão heterogênea (RUDNIK *et al.*, 2020). O potencial Zeta também foi adequado, uma vez que foi superior a $| 30 \text{ mV} |$, o que geralmente é considerado como tendo força repulsiva suficiente para alcançar uma melhor estabilidade coloidal física (CAMARGO *et al.*, 2020).

As micrografias eletrônicas confirmaram a forma esférica e a superfície lisa, que são típicas de nanocápsulas poliméricas obtidas usando PCL como polímero (GOMES *et al.*, 2019).

Assim, a nanoformulação contendo SV apresentou todas as características necessárias em termos de tamanho, carga superficial e morfologia para seu uso por via oral, intraperitoneal e intravenosa.

O resultado do FTIR mostrou que não houve ligações químicas entre SV e polímero, do mesmo modo que constatado por outros autores (GOMES *et al.*, 2019; ELZEIN *et al.*, 2004; SÁ, 2014).

O resultado da DRX da SV isolada mostrou padrão semelhante ao esperado para o SV (FERREIRA, 2017). O mesmo ocorreu com a PCL, que apresentou o padrão esperado (CAVALCANTE; RODRIGUES; TAVARES, 2015). A mistura física da PCL com o SV apresentou sobreposições dos padrões de DRX das espécies isoladas. As NC-SV preservaram a cristalinidade. Isto desempenha um papel importante em meio fisiológico, visto que a fase cristalina é menos acessível às moléculas de água, podendo causar impactos no perfil de difusão do SV no corpo do indivíduo, dessa forma, quanto mais amorfo o sistema, mais rápida será a difusão do SV no meio (FERREIRA, 2017).

No entanto, é também essencial investigar a eficiência do encapsulamento para descobrir a quantidade total de SV aprisionado na nanoformulação coloidal

após sua preparação, possibilitando usar a quantidade do SV correspondente em estudos em animais. As nanocápsulas de PCL carregadas com SV (NC-SV) tiveram uma eficiência de encapsulação próxima a 100%. Esses altos valores de eficiência de encapsulação são principalmente devido à baixa solubilidade aquosa de SV, que fornece um alto aprisionamento do SV nas formulações contendo óleo ou lipídeo.

Estes resultados são melhores que os obtidos por Gambhire, Bhalekar e Shrivastava (2011), que desenvolveram nanopartículas sólidas de SV que foram preparadas por pré-emulsão seguida pelo método de ultrassonicação. O método resultou em produção consistente de nanopartículas com tamanho médio de 245 nm e % de aprisionamento de 72,52%. Os resultados obtidos neste estudo também foram superiores que os obtidos por Zhang *et al.* (2010), que criaram nanopartículas lipídicas preparadas por evaporação do solvente. Ele utilizou dois tipos de surfactante – Tween® (Formulação 1) ou HS-15 (Formulação 2), lecitina e SV dissolvidos em diclorometano e gotejados em água destilada sob agitação. O potencial zeta das duas formulações estava em torno de -30 mV, e a carga de fármacos foi de 7,46% (Formulação I) e 5,88% (Formulação II) com eficiência de encapsulamento 97,2 e 99,2%, respectivamente.

Shinde e More (2011) estudaram a formulação de nanopartículas de SV pelo método de nanoprecipitação. Usaram ácido polilático co-glicólico (PLGA) como polímero lipofílico, F-68 como surfactante estabilizador, em concentrações variáveis, obtendo eficiência do aprisionamento entre 87,03% e 97,18%, e o tamanho das partículas variando entre 376nm a 409nm.

Fathi *et al.* (2018) prepararam NP de SV através da técnica de evaporação de emulsificação e solvente, seguida de ultrassonicação, usando ácido esteárico, ácido oleico e lecitina dissolvidas em clorofórmio como fase orgânica, e o surfactante PluronicF-68 na fase aquosa. Obteve NP esféricas, com menos de 200 nm, e carga de superfície negativa (potencial zeta de -35-40 mV). A eficiência de encapsulação variou de 54,58% a 75,77%, sendo menor com aumento da concentração do surfactante.

A próxima etapa foi investigar a liberação do SV *in vitro* para confirmar se a nanoformulação poderia fornecer um padrão de liberação controlada. Uma estrutura típica de núcleo oleoso envolto por um envoltório polimérico foi estrategicamente planejada para esse fim, de forma a evitar a liberação imediata de SV e obter uma resposta prolongada. Essa abordagem foi fundamental para evitar a administração

de doses múltiplas por dia aos ratos e garantir um efeito farmacológico mais duradouro do que o SV convencional.

Nossa nanoformulação contendo SV provou uma liberação prolongada do SV durante 48 horas sem nenhuma explosão inicial relevante. A preservação da cristalinidade, anteriormente discutida, pode ter colaborado para este perfil de liberação. No estudo de Fathi *et al.* (2018), os padrões de liberação do SV demonstraram uma rápida liberação inicial (*burst*), seguida por liberação sustentada a uma taxa constante ao longo de 24 h. A rápida liberação inicial no estudo de Fathi foi atribuída à rápida liberação do SV aprisionado próximo à superfície das nanopartículas. A liberação prolongada do SV após a liberação inicial pode estar relacionada à natureza lipofílica da SV, que tem alta afinidade ao núcleo das nanocápsulas. O SV no núcleo das nanopartículas tem um caminho de difusão mais longo para alcançar a superfície, em comparação com o SV aprisionado próximo à superfície. Padrões mais rápidos de liberação do SV foram observados com o aumento das concentrações de ácido oleico e da concentração de surfactante. Esta liberação aumentada do SV a partir dos NP pode ser atribuída à diminuição significativa no tamanho das partículas e, portanto, ao aumento da área de superfície específica e, subsequentemente, à taxa de liberação do medicamento.

Portanto, a formulação NC-SV pode fornecer um padrão de liberação controlada para SV e pode garantir uma melhor farmacocinética, uma vez que este nanocarreador também pode evitar o metabolismo extenso de SV pelo sistema citocromo-3A no intestino e no fígado (ZHANG *et al.*, 2010).

Os resultados em relação à espessura do peritônio e à fibrose podem eventualmente ser explicados pela baixa dose de SV usada. A DL50 oral da SV em camundongos é de aproximadamente 3,8 g/kg e, em ratos, é de aproximadamente 5 g/kg², e estudos experimentais podem usar doses maiores de SV, como o estudo de Anbinder *et al.* (2007), que administrou 25 mg/kg e não ocasionou óbitos. Estudo anterior usando SV na dose de 4 mg/kg não mostrou melhora nos parâmetros de espessura e fibrose, no entanto, o número de animais foi baixo, o que limitou a conclusão do estudo (BARONI *et al.*, 2012).

Em estudo de Yeniçerioglu *et al.* (2010) a atorvastatina diminuiu a espessura do peritônio de ratos, indicando que houve menos fibrose nos animais avaliados. No

² Informações sobre identificação do medicamento, ver Vytorin: Solução Oral (2020).

entanto, os níveis de IL-6 foram significativamente maiores no grupo tratado, os níveis de TNF- α não foram diferentes, mas houve queda nos níveis de TGF- β , todos estes mensurados no efluente da solução de DP infundida no peritônio. Em geral, ratos Wistar usualmente bebem 20-50mL de água ao dia (10 mL/100 g de peso/dia) (CLAASSEN, 1995). Assim, altas doses de atorvastatina atingindo quantidades acima de 1,6g por dia foram usadas para alcançar mudanças morfológicas na espessura do peritônio de ratos. Nesse sentido, supomos que a baixa dose de SV utilizada foi responsável pela ausência de efeitos na espessura peritoneal de ratos Wistar nos grupos SV e NC-SV.

Quando o tipo de colágeno foi avaliado, o grupo NC-SV mostrou uma expressão de colágeno tipo III estatisticamente semelhante ao sham e ao DP. Portanto, a nanoformulação foi capaz de reduzir o colágeno tipo III associado à inflamação aos níveis de controle. O colágeno tipo III é secretado por fibroblastos e outros tipos de células mesenquimais, tornando-se um elemento importante em várias doenças associadas à inflamação, como fibrose renal (KARSDAL, 2019). Consequentemente, a baixa expressão do colágeno tipo III fornece fortes evidências de que a inflamação foi significativamente suprimida pela nanoformulação, o que não foi tão notável com o uso de SV livre, embora o efeito anti-inflamatório da SV seja bem conhecido por inibir a formação de isoprenóides intracelulares e melhorar a biodisponibilidade do NO (MICHOS *et al.*, 2019).

O que não fica muito claro é o motivo pelo qual o grupo DP não foi significativamente diferente do sham. Uma possível explicação é oriunda da diferente manipulação entre estes grupos, visto que o grupo sham não foi submetido à gavagem. Sabe-se que dano na mucosa do esôfago causada por gavagem pode alterar as células do epitélio intestinal. A gavagem, danificando o epitélio esofágico, causa redução das células T $\gamma\delta$, as quais, por sua vez, têm importante papel regulador na manutenção da função da barreira do epitélio intestinal e da renovação celular do mesmo. A redução das células T $\gamma\delta$ pode causar também uma redução das células CD3+. Este estudo fornece evidências iniciais da importância da integridade esofágica e das populações celulares do intestino e que o uso de gavagem prolongada e repetida pode ser acompanhado de complicações imunológicas (KINDER *et al.*, 2014).

Mais recentemente, foi descoberto que não apenas essas células T $\gamma\delta$ fornecem fatores de crescimento epitelial essenciais, que são cruciais para manter a

homeostase do tecido e o retorno oportuno à condição de estado estacionário após o dano, mas também agem rapidamente para compartimentar e limitar a exposição patogênica microbiana ao compartimento imune sistêmico (NIELSEN *et al.*, 2017). Podemos, então, ter por hipótese que os animais submetidos à gavagem repetida possam ter tido uma reação inflamatória mais intensa.

De todo modo, no grupo NC-SV, que também foi submetido à gavagem, o padrão de proporção entre colágeno Tipo I e III foi semelhante ao sham. Isto poderia ser explicado pela ação anti-inflamatória mais intensa desta formulação. Esses resultados confirmam que a nanotecnologia pode evitar a condição inflamatória gerada pela infusão da DS, principalmente por levar a uma liberação controlada de SV, melhorando a biodisponibilidade do SV e prolongando seu efeito anti-inflamatório no tecido peritoneal.

Considerando os resultados promissores obtidos para o grupo NC-SV durante a análise do colágeno, a investigação foi aprofundada para verificar quais citocinas inflamatórias foram inibidas. A nanoformulação diminuiu expressivamente a expressão do nível de TNF- α no tecido peritoneal de ratos, o que não foi observado para SV livre. O TNF- α desempenha um papel fundamental em muitas doenças inflamatórias. É produzido por macrófagos, células *natural killer*, neutrófilos e várias células não hematopoiéticas. Embora o TNF- α tenha sido inicialmente identificado por sua citotoxicidade contra certas linhagens celulares, sua função primária (associada à IL-1) é iniciar a cascata de fatores associados à resposta inflamatória. Portanto, parece que a nanoformulação foi capaz de melhorar a quantidade do SV no tecido peritoneal e garantir o efeito anti-inflamatório adequado da SV em baixa dose contra o estado inflamatório proporcionado pelo procedimento de DP.

Alguns relatórios anteriores demonstraram a maior permeabilidade intestinal e o aumento da biodisponibilidade quando os nanossistemas foram usados como abordagens tecnológicas para SV. A melhora no perfil farmacocinético/dinâmico do fármaco foi observada no estudo de Fathi *et al.* (2018), que avaliou a ação das NP de SV nos níveis de lipídios em ratos, usando SV convencional ou NP, na dose de 5mg/kg. A queda no nível sérico dos lipídios foi significativamente maior do grupo NP. As NP podem proteger o medicamento da degradação enzimática, reduzindo a exposição do medicamento às bactérias intestinais, bem como protegendo o medicamento da degradação enzimática durante o processo de absorção e, assim, permitindo uma maior permanência no tempo gastrointestinal e uma vida média de

eliminação de 35,04 horas, resultado muito melhor quando comparado ao da formulação convencional, que foi de 10,20 horas (FATHI *et al.*, 2018).

Melhora na permeabilidade intestinal também foi demonstrada por Mendes *et al.* (2016), que produziram nanopartículas lipídicas por *spray drying*. Uma queda significativa das citocinas inflamatórias, incluindo IL6 e TNF- α , foi observada por Fei Tong *et al.* (2017), usando um modelo de isquemia intestinal em ratos, sendo que a dose utilizada foi de 20mg/kg.

Nesse sentido, o efeito anti-inflamatório proporcionado pelo NC-SV pode estar associado à diminuição da expressão do colágeno tipo III e à redução significativa da expressão do TNF- α quando o modelo experimental de rato de fibrose peritoneal induzida pela infusão de solução de DP foi usado.

Considerando que, em estudos prévios, a SV foi capaz de reduzir a expressão de IL-6 em células musculares lisas e macrófagos (CHU *et al.*, 2018), a expressão de IL-6 foi também estudada. Kishimoto (2010) propôs que a IL-6 é uma citocina multifuncional envolvida na proliferação e diferenciação celular, mantendo a homeostase imunológica, a função dos macrófagos e outras funções essenciais. IL-6, agindo por meio do transdutor de sinal de fatores de transcrição latente e ativador da transcrição-3 (STAT3) e STAT1, também desempenha papéis essenciais no controle da infiltração de leucócitos durante a inflamação aguda (FIELDING *et al.*, 2008).

No presente estudo, nenhuma alteração significativa na expressão de IL-6 no tecido foi encontrada para SV puro e nanoformulação carregada com SV. A possível razão pode ser que a IL-6 é um mediador pró-inflamatório agudo e o modelo animal envolveu o uso crônico e duradouro de solução de diálise a 4,25%. Em geral, a detecção da IL-6 ocorre em estudos realizados durante poucos dias (CHU *et al.*, 2018), mas esse estímulo inflamatório foi mantido por quase um mês no presente estudo.

As interações celulares entre células endoteliais e células musculares lisas vasculares (VSMC) / macrófagos parecem ser muito alteradas em condições inflamatórias, e as citocinas têm papel nestas alterações. Para estudar isto, Chu *et al.* (2018) utilizaram um modelo que utilizou células isoladas de aorta de ratos. Foram estudados os efeitos de SV nas funções VSMC / macrófago, que são induzidas por células endoteliais ativadas por TNF- α no sistema de cocultura in vitro. Os resultados mostraram que, em condições sem contato, a SV poderia reduzir

a proliferação, apoptose e TNF- α , IL-6 e secreção do fator de crescimento vascular endotelial tanto na VSMC quanto nos macrófagos, que é induzido pela CE ativada por TNF- α . É uma hipótese que a SV regula as interações e os fatores solúveis entre EC e VSMC / macrófagos podem ser obtidos. Isso pode ser um potencial mecanismo anti-aterosclerose da SV.

Em humanos, a ação da SV em nanoformulação foi estudada em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea. O uso da SV resultou na melhoria da função cardíaca e redução nos marcadores de injúria miocárdica. Também reduz de modo significativo os níveis de IL6, IL8 e TNF- α , bem como reduz a autofagia dos miócitos cardíacos no pós-operatório (HUA *et al.*, 2017).

Estes estudos mostram a efetividade do uso da nanotecnologia na melhora do desempenho da SV em diversas situações experimentais, que podem ter impacto também no seu uso em humanos.

Entre as limitações do estudo, podemos considerar que não foram comparadas as expressões de TNF- α e IL-6 entre todos os grupos. Também não foram mensuradas as repercussões sistêmicas do quadro inflamatório peritoneal.

Podemos corroborar as considerações de Alston, Fan e Nakayama (2017), de que a PE é uma condição que resulta de vários processos patológicos que levam à aparência de aderência, fibrose, vasculopatia e à formação de tecido encapsulado na superfície peritoneal lesada. A PE pode representar um processo patológico exagerado; e que pesquisas na patogenia podem propiciar novas abordagens.

6 CONCLUSÃO

O estudo chegou às seguintes conclusões:

- O método de deposição interfacial do polímero pré-formado para obtenção de nanocápsulas poliméricas de (PCL) foi capaz de produzir nanocápsulas de SV;
- Foi alcançada uma alta eficiência de encapsulação;
- Os estudos morfológicos mostraram nanocápsulas de tamanho adequado com ótimo potencial Zeta;
- Os estudos espectroscópicos mostraram que o SV se manteve íntegro, sem reagir com demais componentes da formulação, e mantendo sua cristalinidade;
- O ensaio de dissolução *in vitro* obtido mostrou liberação prolongada;
- No estudo *in vivo*, a nanoformulação de SV diminuiu notavelmente o colágeno do tipo III, associado à inflamação e a expressão tecidual de TNF- α , mesmo em baixa dose.

Assim sendo, abordagem baseada em nanotecnologia é promissora para o tratamento de fibrose peritoneal ou mesmo esclerose peritoneal encapsulante.

REFERÊNCIAS

- ACIKGOZ, Y.; CAN, B.; BEK, K.; ACIKGOZ, A.; OZKAYA, O.; GENÇ, G.; SARIKAYA, S. The effect of simvastatin and erythropoietin on renal fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. **Renal Failure**, v. 36, p. 252-257, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/0886022X.2013.836936>. Acesso em: 11 jan. 2020.
- AKDIS, M.; AAB, A.; ALTUNBULAKLI, C.; AZKUR, K.; COSTA, R.A. *et al.* Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor b, and TNF-a: Receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 138, n. 4, p. 984-1010, out. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.033>. Acesso em: 11 jan. 2020.
- ALMEIDA, M. M. de. **Desenvolvimento, caracterização, avaliação da estabilidade e da penetração cutânea de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética**. 2012. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos) □ Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://doi:10.11606/T.9.2012.tde-01032013-102057>. Acesso em: 11 set. 2020.
- ALSTON, H.; FAN, S.; NAKAYAMA, M. Encapsulating Peritoneal Sclerosis. **Seminars in Nephrology**, v. 37, n. 1, p. 93-102, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.10.010>. Acesso em: 16 fev. 2020.
- ANBINDER A. L.; PRADO, F. A.; PRADO, M.A.; BALDUCI, I.; ROCHA, R.F. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. **Braz Oral Res.**, v. 21, n. 3, p. 247-52, 2007.
- ANDRADE, Fernanda Almeida. Metformina e o risco de acidose láctica na doença renal crônica: o que fazer? **Portal PEBMED**, 22 out. 2020. Disponível em: <https://pebmed.com.br/metformina-e-o-risco-de-acidose-lactica-na-doenca-renal-cronica-o-que-fazer/>. Acesso em: 5 nov. 2020.
- AYAR, Y.; ERSOY, A.; OCAKOGLU, G.; GULLULU, E.; KAGIZMANLI, H.; YILDIZ, A.; ORUC, A.; YAVUZ, M.; GULLULU, M.; DILEK, K. Encapsulating Peritoneal Sclerosis in Peritoneal Dialysis Patients After Kidney Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 50, Issue 1, p. 60-164, jan./feb. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041134517309788?via%3DiHub>. Acesso em: 11 jan. 2020.
- BARBOSA, F. M.; CAMARGO, G. A.; LYRA, A. M.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V. A simple and fast RP-UHPLC-PDA Method for determination of Isradipine from polymeric nanocapsules. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 13, n. 8, p. 225-9, aug. 2020. Disponível em: <https://doi:10.22159/ajpcr.2020.v13i8.38817>. Acesso em: 16 fev. 2020.
- BARONI, G.; SCHUINSKI, A. F. M.; BERTICELLI, P.T.; SILVA, M.A.A.; SBRISSIA, D.; GOUVEIA, S.; PECOITS FILHO, R.; MEYER, F. Influência da sinvastatina na fibrose peritoneal induzida em ratos pelo uso de solução de diálise peritoneal com

glicose a 4,25%. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 27, n. 4, p.350-356, apr. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502012000400012>. Acesso em: 11 jan. 2020.

BASRAON, S. K.; COSTANTINE, M. M.; SAADE, G.; MENON, R. The Effect of simvastatin on infection induced inflammatory response of human fetal membranes. **Am J Reprod Immunol**, v. 74, p. 54-61, 2015.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 93-108, mar. 2011.

BIASUCCI, L. M.; BIASILLO, G.; STEFANELLI, A. Inflammatory markers, cholesterol and statins: pathophysiological role and clinical importance. **Clin Chem Lab Med.**, v. 48, n. 12, p. 1685-91, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. **Vigitel Brasil 2018**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, 2019. 132 p.il. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste. **Nanotecnologia**. Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.cetene.gov.br/index.php/area-de-atuacao/nanotecnologia/>. Acesso em: 18 nov. 2020.

CAMARGO, G. A.; COSTA FILHO, A. R. C. da.; LYRA, A. M.; NOVATSKI, A.; NADAL, J. M.; LARA, L. S.; DIAS, D. T.; NASCIMENTO, E. A.; SILVA, U. R.; JACINTO, C.; FARAGO, P. V. Stability testing of tacrolimus-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles by physicochemical assays and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 110, sep. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103139>. Acesso em: 16 fev. 2020.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 521-6, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140086>. Acesso em: 18 nov. 2020.

CARLETTO, B.; LYRA, A. M.; KOGA, A. Y.; NOVATSKI, A.; MAINARDES, R. M.; LIPINSKI, L. C.; FARAGO, P. V. Development and validation of a fast and sensitive UHPLC-PDA Method for the quantification of ursolic acid in poly (l-lactic acid) nanocapsules. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 13, n. 9, ago. 2020, p. 161-5. Disponível em: <https://doi:10.22159/ajpcr.2020.v13i9.38993>. Acesso em: 16 fev. 2020.

CAVALCANTE, M.; RODRIGUES, E. J. R.; TAVARES, M. I. Avaliação da cristalinidade de blendas de polihidróxibutirato e policaprolactona. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 13., 2015, Natal. **Anais [...]**. Natal, 2015. Disponível em: <https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/Public/48/036/48036470.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2020.

CELL SIGNALING TECHNOLOGY. **Mechanisms of Fibrosis**. 2020. Disponível em: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-adhesion-ecm-cytoskeleton/mechanisms-of-fibrosis/pathways-fibrosis>. Acesso em: 11 jan. 2020.

CHANG, T. I.; TAE, I. K.; KANG, H-Y.; KIM, K. S.; LEE, S. H.; NAM, B. W.; PAENG, J. *et al.* The Effect of Statin on Epithelial-Mesenchymal Transition in Peritoneal Mesothelial Cells. **PLOS ONE**, v. 9, Issue 10, oct. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109628>. Acesso em: 11 jan. 2020.

CHU, F. M. D.; WANG, M. A.; MA, H.; JIAYONG, Z. Simvastatin Modulates Interaction Between Vascular Smooth Muscle Cell/Macrophage and TNF- α -Activated Endothelial Cell. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.71, Issue 5, p. 268-274, maio 2018. Disponível em: <http://10.1097/FJC.0000000000000567>. Acesso em: 11 jan. 2020.

CLAASSEN, V. **Neglected Factors in Pharmacology and Neuroscience Research**: Biopharmaceutics, Animal characteristics Maintenance, Testing conditions. Elsevier, 1995. 486 p.

CLEMENTINO, A.; SONVICOA, F. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous detection and quantification of simvastatin's isoforms and coenzyme Q10 in lecithin/chitosan nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 155, p. 33-41, 2018.

DAMSCH, S.; EICHENBAUM, G.; LOOSZOVA, A.; LAMMENS, L.; FEYEN, B.; VAN DEN BULCK, K.; KNIGHT, E.; KELLEY, M.; TONELLI, A. Unexpected nasal changes in rats related to reflux after gavage dosing. **Toxicol Pathol.**, v. 39, n. 2, p. 337-47, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0192623310388430>. Acesso em: 11 jan. 2020.

DAVENPORT, A. Late presentation of encapsulating peritoneal sclerosis following renal transplantation and the potential under-reporting of the incidence and prevalence of encapsulating peritoneal sclerosis. **Nephrology** (Carlton), v. 20, n. 7, p. 499-501, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26063486/>. Acesso em: 11 jan. 2020.

DITSAWANON, P.; ARAMWIT, P. Preserving the peritoneal membrane in long-term peritoneal dialysis patients. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, p. 508–516, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcpt.12318>. Acesso em: 11 jan. 2020.

EICHENBAUM, G.; DAMSCH, S.; LOOSZOVA, A.; VANDENBERGHE, J.; VAN DEN BULCK, K.; ROELS, K.; MEGENS, A.; KNIGHT, E. *et al.* Impact of gavage dosing procedure and gastric content on adverse respiratory effects and mortality in rat toxicity studies. **J. Appl. Toxicol.**, v. 31, p. 342-354, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jat.1592>. Acesso em: 11 jan. 2020.

ELZEIN, T.; NASSER-EDDINE, M.; DELAITE, C.; BISTAC, S.; DUMAS, P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 273, p. 381-387, 2004. Disponível em: https://www.academia.edu/5679238/FTIR_study_of_polycaprolactone_chain_organization_at_interfaces. Acesso em: 16 fev. 2020.

ERA-EDTA. **Registry**: ERA-EDTA Registry Annual Report 2017. Amsterdam UMC: Department of Medical Informatics, Amsterdam, the Netherlands, 2019. Disponível em: <https://era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2017.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2020.

ERA-EDTA. **Registry**: ERA-EDTA Registry Annual Report 2018. Amsterdam UMC: Department of Medical Informatics, Amsterdam, the Netherlands, 2020. Disponível em: <https://www.era-edta.org/registry/AnnRep2018.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2021.

FATHI, H. A.; ALLAM, A.; ELSABAHY, M.; FETHI, G.; EL-BADRY, M. Nanostructured lipid carriers for improved oral delivery and prolonged antihyperlipidemic effect of simvastatin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.162, n. 1, p. 236–245, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.064>. Acesso em: 6 jul. 2020.

FATTAHI, A.; KARIMI-SABET, J.; KESHAVARZ, A.; GOLZARY, A.; RAFIEE-TEHRANI, M.; DORKOOSH, F.A. Preparation and characterization of simvastatin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution (RESS) with trifluoromethane. **J. of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 469-478, 2016.

FERREIRA, A. de O.; SOUZA, G. F de. **Preparações Orais Líquidas**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

FERREIRA, K. do N. **Estudo da liberação controlada de sinvastatina utilizando nanofibras de PLA/PEG produzidas por fiação por sopro em solução**. 2017. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, 2017.

FESSI, H.; PUISIUEX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formulation by interfacial deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FIELDING, C. A.; MCLOUGHLIN, R. M.; MCLEOD, L.; COLMONT, C. S.; NAJDOVSKA, M.; GRAIL, D.; ERNST, M. *et al.* IL-6 Regulates Neutrophil Trafficking during Acute Inflammation via STAT31. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 3, p. 2189-2195, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2189>. Acesso em: 16 fev. 2020.

FIGUEIRAS, A. R. R.; COIMBRA, A. B.; VEIGA, F. J. B. Nanotecnologia na Saúde: Aplicação e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p.14-26, 2014.

FIGUEIREDO, E. P.; RIBEIRO, J. M.; NISHIO, E. K.; SCANDORIEIRO, S.; COSTA, A. F.; CARDOZO, V. F. *et al.* New Approach For Simvastatin As An Antibacterial:

Synergistic Effect With Bio-Synthesized Silver Nanoparticles Against Multidrug-Resistant Bacteria. **Int J Nanomedicine**, v. 14, p. 7975-85, oct. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S211756>. Acesso em: 16 fev. 2020.

FLESSNER, M. F.; CREDIT, K.; HENDERSON, K.; VANPELT, H. M.; POTTER, R.; HE, Z. *et al.* Peritoneal changes after exposure to sterile solutions by catheter. **J Am Soc Nephrol.**, v. 18, n. 8, p. 2294-302, 2007.

FRANCISCO, P. M. S. B. Prevalência simultânea de hipertensão e diabetes em idosos brasileiros: desigualdades individuais e contextuais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3829-3840, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/csc/v23n11/1413-8123-csc-23-11-3829.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2020.

GAMBHIRE, M. S.; BHALEKARB, M.; SHRIVASTAVA, B. Bioavailability assessment of simvastatin loaded solid lipid nanoparticles after oral administration. **Asian Journal of Pharmaceutical Scienc**, v. 6, n. 6, p. 251-258, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000300008>. Acesso em: 28 fev. 2020.

GANDHI, V. C.; HUMAYUN, H. M.; ING, T. S.; DAUGIRDAS, J. T.; JABLOKOW, V. R.; IWATSUKI, S.; GEIS, W. P.; HANO, J. E. Sclerotic thickening of the peritoneal membrane in maintenance peritoneal dialysis patients. **Arch Intern Med**, v. 140, n. 9, p. 1201-3, sep. 1980. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/article-abstract/600241>. Acesso em: 15 ago. 2020.

GOMES, M. L. S.; DA SILVA NASCIMENTO, N.; BORSATO, D. M.; PRETES, A. P.; NADAL, J. M.; NOVATSKI, A.; GOMES, R. Z.; FERNANDES, D.; FARAGO, P. V.; ZANIN, S. M. W. Long-lasting anti-platelet activity of cilostazol from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 94, p. 694–702, 2019.

HANCE, A.; CRYSTAL, R. Rigid control of synthesis of collagen Types I and III by cells in culture. **Nature** **268**, p. 152–154, jul. 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/268152a0>. Acesso em: 11 jan. 2020.

HOT, A.; LAVOCAT, F.; LENIEF, V.; MIOSSEC, P. Simvastatin inhibits the pro-inflammatory and pro-thrombotic effects of IL-17 and TNF- α on endothelial cells. **Ann Rheum Dis**, v. 72, p. 754-760, 2013.

HUA, P.; LIU, J.; TAO, J.; ZOU, R.; LIN, X.; ZHANG, D.; YANG, S. Efficacy and Mechanism of Preoperative Simvastatin Therapy on Myocardial Protection after Extracorporeal Circulation. **BioMed Research Internacional**, v. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/6082430>. Acesso em: 11 jan. 2020.

IDF DIABETES. **Atlas 2019**. Disponível em: https://www.diabetesatlas.org/en/resources/?qclid=Cj0KCQiAgebwBRDnARIsAE3eZjS6k_5TX0zh6yG5-4hy8LYAjRbAc4L41h51YWIJN2unviXzjU9UIAaAgDIEALw_wcB. Acesso em: 11 jan. 2020.

INFOMED. **Base de dados de medicamentos de uso humano**. 2020. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>. Acesso em: 13 set. 2020.

INKER, L. A.; ASTOR, B. C.; FOX, C. H.; ISAKOVA, T.; LASH, J. P.; PERALTA, C. A.; KURELLA TAMURA, M.; FELDMAN, H. I. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 63, n. 5, p. 713-735, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.01.416>. Acesso em: 12 jun. 2020.

ISHII, Y.; SAWADA, T.; SHIMIZU, A.; TOJIMBARA, T.; NAKAJIMA, I.; FUCHINOUE S. *et al.* An experimental sclerosing encapsulating peritonitis model in mice. **Nephrol Dial Transplant**, v. 16, n. 6, p. 1262-6, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbn/v35n4/v35n4a07.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2020.

JANG, Y. O.; KIM, S. H.; CHO, M-Y.; KIM, K. S.; PARK, K-S.; CHA, S-K. *et al.* Synergistic effects of simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, p. 264-271, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.067>. Acesso em: 11 jan. 2020.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KADOW, J. S.; FINGERHUT, C. J. P.; FERNANDES, V. B.; CORADAZZI, K. R. S.; SILVA, L. M. S.; PENACHIM, T. J. Peritonite encapsulante: tomografia computadorizada e correlação cirúrgica. **Radiol Bras.**, v. 47, n. 4, p. 262-264, jul./ago. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-3984.2013.1780>. Acesso em: 11 jan. 2020.

KAMALY, N.; XIAO, Z.; VALENCIA, P. M.; RADOVIC-MORENOB, A. F.; FAROKHZAD, O. C. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 7, p. 2971-3010, apr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c2cs15344k>. Acesso em: 11 jan. 2020.

KARSDAL, M. (Org.). **Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers**. 2.ed. Academic Press, 2019. 434 p.

KAWAGUCHI, Y.; KAWANISHI, H.; MUJAIS, S.; TOPLEY, N. Encapsulating peritoneal sclerosis: Definition, etiology, diagnosis, and treatment. International Society for Peritoneal Dialysis Ad Hoc Committee on Ultrafiltration Management in Peritoneal Dialysis. **Peritoneal dialysis international: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis**, v. 20, Suppl 4, S 43-55, fev. 2000.

KIDNEY INTERNATIONAL SUPPLEMENTS. Official Journal of the International Society of Nephrology. **KDIGO 2012 – Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease**, v. 3, Issue 1, p. 112-119, jan. 2013. 150p. Disponível em: <https://kdigo.org/wp->

content/uploads/2017/02/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf. Acesso em: 7 out. 2020.

KIM, E. K.; CHO, J. H.; JEONG, A. R.; KIM, E. J. Anti-inflammatory effects of Simvastatin in Nonsteroidal anti-inflammatory drugs-induced small bowel injury **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 69-77, 2017. Disponível em: http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/02_17/pdf/69_02_17_article.pdf. Acesso em: 11 jan. 2020.

KINDER, J. M.; THEN, J. E.; HANSEL, P. M.; MOLINERO, L. L.; BRUNS, H. A. Long-term repeated daily use of intragastric gavage hinders induction of oral tolerance to ovalbumin in mice. **Comparative medicine**, v.64, n.5, p.369–376, 2014.

KINGSLEY, J. D.; DOU, H.; MOREHEAD, J.; RABINOW, B.; GENDELMAN, H. E.; DESTACHE, C.J. Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v.1, p.340-350, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9032-4>. Acesso em: 11 jan. 2020.

KISHIMOTO, T. IL-6: from its discovery to clinical applications. **International Immunology**, v. 22, Issue 5, p. 347–352, May 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq030>. Acesso em: 16 fev. 2020.

KORTE, M. R.; SAMPIMON, D. E.; LINGSMA, H. F.; FIEREN, M. W.; LOOMAN, C. W.; ZIETSE, R. Risk factors associated with encapsulating peritoneal sclerosis in Dutch EPS study. **Perit Dial Int.**, v. 31, n.3, p. 269-78, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/50939620_Risk_factors_associated_with_encapsulating_peritoneal_sclerosis_in_Dutch_EPS_study. Acesso em: 7 out. 2020.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A.; MAILANDER, V. From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using the miniemulsion process. **J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.**, v. 48, p. 493-515, 2010.

LI, P. K. T.; SZETO, C. C.; PIRAINO, B.; BERNARDINI, J.; FIGUEREDO, A. E.; GUPTA, A. *et al.* Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2010 update. **Perit Dial Int.**, v. 30, n. 4, p. 393-423, 2010.

LIN, C-P.; HUANG, P-H.; LAI, C. F.; CHEN, J-W.; LIN, S-J.; CHEN, J-S. Simvastatin Attenuates Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and Artery Calcification in LDLR-/- Mice Fed with High Fat Diet via Down-regulation of Tumor Necrosis Factor- α and TNF Receptor 1. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, e0143686, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143686>. Acesso em: 11 jan. 2020.

LOUREIRO, J.; GÓNZALEZ-MATEO, G.; JIMENEZ-HEFFERNAN, J.; SELGAS, R.; LÓPEZ-CABRERA, M.; PERALTA, A. G. Are the Mesothelial-to-Mesenchymal Transition, Sclerotic Peritonitis Syndromes, and Encapsulating Peritoneal Sclerosis Part of the Same Process? **International Journal of Nephrology**, v. 2013, Article ID 263285, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/263285>. Acesso em: 11

jan. 2020.

MACHADO, N. O. Sclerosing Encapsulating Peritonitis: Review. **Sultan Qaboos Univ Med J**, v. 16, n. 2, p. 142-151. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27226904/>. Acesso em: 11 jan. 2020.

MAHELY, R. W.; BERSOT, T. P. Terapia farmacológica para a hipercolesterolemia e a dislipidemia. In: BRUNTUN, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2006. p. 851-6.

MALTA, D. C.; MACHADO, I. E.; PEREIRA, C. A.; FIGUEIREDO, A. W., AGUAR, L. K.; ALMEIDA, W. S.; SOUZA, M. F. M.; ROSENFELD, L. G.; SZWARCOWALD, C. L. Avaliação da função renal na população adulta brasileira, segundo critérios laboratoriais da Pesquisa Nacional de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rio de Janeiro, v. 22, supl. 2, 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2019000300407&tlng=pt. Acesso em: 7 out. 2020.

MARCHANT, V.; TEJERA-MUÑOZ, A.; MARQUEZ-EXPÓSITO, L.; RAYEGO-MATEOS, S.; RODRIGUES-DIEZ, R. R.; TEJEDOR, L.; SANTOS-SANCHEZ, L.; EGIDO, J.; ORTIZ, A. *et al.* IL-17A as a Potential Therapeutic Target for Patients on Peritoneal Dialysis. **Biomolecules**, v. 10, Issue 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom10101361>. Acesso em: 3 jul. 2020.

MATTIAZZI, J.; SARI, M. H. M.; BRUM, T. B.; ARAÚJO, P. C. O.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V.; NOGUEIRA, C. W.; CRUZ, L. 3,3' - Diindolylmethane nanoencapsulation improves its antinociceptive action: Physicochemical and behavioral studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 295-304, sep. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.063>. Acesso em: 16 fev. 2020.

MENDES, M.; SOARES, H. T.; ARNAUT, L. G.; SOUSA, J. J.; PAIS, A. A. C. C.; VITORINO, C.; CAN, M. Lipid nanoparticles improve intestinal absorption? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, p. 69–83, 2016. Disponível em: <https://daneshyari.com/article/preview/5550889.pdf>. Acesso em: 9 fev. 2020.

MICHOS, E. D.; McCEVOY, J. W.; BLUMENTHAL, R. S. Lipid Management for the Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 16, p. 1557-1567, oct. 2019.

MIHALACHE, O.; BUGĂ, C.; DORAN, H.; CATRINA, E.; BOBIRCĂ, F.; PĂTRAȘCU, T. Encapsulating Peritoneal Sclerosis – A rare and serious complication of peritoneal dialysis: Case series. **Journal of Medicine and Life**, v. 7, Special Issue 3, p. 8-12, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25870687/>. Acesso em: 23 abr. 2020.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STRØMME, M. Current Status and Future Prospects of Nanotechnology in Cosmetics. **Progress in Materials Science**, v. 57, p. 75–910, 2012.

MOINUDDIN, Z.; SUMMERS, A.; VAN DELLEN, D.; AUGUSTINE, T.; HERRICK, S.E. Encapsulating peritoneal sclerosis – a rare but devastating peritoneal disease. **Front. Physiol**, art. 470, v. 5, jan. 2015. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2014.00470/full>. Acesso em: 11 jan. 2020.

MURTAZA, G. Solubility enhancement of simvastatin: a review. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 4, p. 581-590, set. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/230643729_Solubility_enhancement_of_simvastatin_A_review. Acesso em: 5 mar. 2020.

NEVES, S. M. P. *et al.* **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. 216p. Disponível em: <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2020.

NIELSEN, M. N.; WITHERDEN, D. A.; HAVRAN, W. L. $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. **Nat Rev Immunol**, v.17, n.12, p.733-745, dez. 2017. Acesso em: <http://doi.org/10.1038/nri.2017.101>. Acesso em: 9 fev. 2020.

NITSCH, D.; DAVENPORT, A. Designing epidemiology studies to determine the incidence and prevalence of Encapsulating Peritoneal Sclerosis (EPS). **Peritoneal Dialysis International**, v. 35, n. 7, p. 678–682, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3747/pdi.2015.00186>. Acesso em: 11 jan. 2020.

OSSORIO, M.; MARTÍNEZ, V.; BAJO, M. A.; DEL PESO, G.; CASTRO, M. J.; ROMERO, S.; SELGAS, R.; BELLÓN, T. Prominent Levels of the Profibrotic Chemokine CCL18 during Peritonitis: In Vitro Downregulation by Vitamin D Receptor Agonists. **Biomed Res Int**, v. 2018, Article ID 6415892. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/6415892>. Acesso em: 11 jan. 2020.

PAWLACZYK, K.; BAUM, E.; SCHWERMER, K.; HOPPE, K.; LINDHOLM, B.; BREBOROWICZ, A. Animal models of peritoneal dialysis: thirty years of our own experience. **BioMed Research International**, v. 2015, Article ID 261813. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/261813>. Acesso em: 11 jan. 2020.

RIGBY, R. J.; HAWLEY, C. M. Sclerosing peritonitis: the experience in Australia. **Nephrol Dial Transplant**, v. 13, p. 154-159, 1998. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/13749374_Sclerosing_peritonitis_The_experience_in_Australia. Acesso em: 11 jan. 2020.

ROMÃO JUNIOR, J. E. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Braz. J. Nephrol**, v. 26, n. 3 suppl. 1, p. 1-3, set. 2004.

RUDNIK, L.; FARAGO, P. V.; BUDEL, J. M.; LYRA, A.; BARBOZA, F.M.; KLEI, T.; KANUNFRE, C. C.; NADAL, J. M.; BANDÉCA, M. C.; RAMAN, V.; NOVATSKI, A.; LOGUÉRCIO, A. D.; ZANIN, S. M. W. CO-Loaded Curcumin and Methotrexate Nanocapsules Enhance Cytotoxicity against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells.

Molecules, v. 25, n. 8, p. 1-19, apr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25081913>. Acesso em: 16 fev. 2020.

SÁ, L.T.M. **Sistemas de liberação de fármacos particulados baseados em poliésteres obtidos por Spray Drying para via inalatória**. 62f. Monografia (Especialização em Tecnologias Industriais Farmacêuticas) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/13449/1/6.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2020.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 726-737, oct. 2003.

SCHUINSKI, A. F. M.; BARONI, G.; PECOITS FILHO, R. F.; MEYER, F.; CERQUEIRA, M. L. W.; SILVA, M. A. A.; CARVALHO, V. Avaliação do uso do captopril na fibrose peritoneal induzida em ratos pelo uso de solução de glicose a 4,25%. **J.Bras.Nefrol.**, São Paulo, v. 35, n. 4, out./dez. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130046>. Acesso em: 11 jan. 2020.

SHINDE, A. J.; MORE, H. N. Design and evaluation of Polylactic-Co-Glycolic acid Nanoparticles containing simvastatin. **Int J. Drug Dev. & Res.**, v. 3, n. 2, p. 280-289, abr./jun. 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/261880332_Design_and_Evaluation_of_Polylactic-co-glycolic_acid_Nanoparticles_containing_Simvastatin. Acesso em: 10 fev. 2020.

SHROFF, R.; STEFANIDIS, C. J.; ASKITI, V.; EDEFONTI, A.; TESTA, S.; EKIM, M.; KAVAZ, A.; ARICETA, G.; BAKKALOGLU, S.; FISCHBACH, M.; KLAUS, G.; ZUROWSKA, A.; HOLTITA, T.; JANKAUSKIENE, A.; VONDRAK, K.; WALLE, J. V.; SCHMITT, C. P.; WATSON, A. R. Encapsulating peritoneal sclerosis in children on chronic PD: a survey from the European Paediatric Dialysis Working Group. **NDT - Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, Issue 7, p. 1908–1914, jul. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs603>. Acesso em: 11 jan. 2020.

SINGHAL, M.; KRISHNA, S.; LAL, A.; NARAYANASAMY, S.; BAL, A.; YADAV, T. D.; KOCHHAR, R.; SINHA, S. K.; KHANDELWAL, N.; SHEIKH, A.M. Encapsulating Peritoneal Sclerosis: The Abdominal Cocoon. **RadioGraphics**, v. 39, n. 1, p. 62-77, 2018. Disponível em: <https://pubs.rsna.org/doi/pdf/10.1148/rq.2019180108>. Acesso em: 11 jan. 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo**. São Paulo, 2020. Disponível em: <https://www.censo-sbn.org.br/censosAnteriores>. Acesso em: 18 abr. 2021.

SORUSHANOVA, A.; DELGADO, L. M.; WU, Z.; SHOLOGU, N.; KSHIRSAGAR, A.; RAGHUNATH, R.; MULLEN, A. M.; BAYON, Y.; PANDIT, A.; RAGHUNATH, M.; ZEUGOLIS, D. I. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. **Advanced Materials**, v. 31, n. 1, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>. Acesso em: 11 jan. 2020.

STANLEY, M. Peritoneal dialysis versus haemodialysis (adult). **Nephrology**, v.15, Suppl 24-31.e, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1440-1797.2010.01228.x>. Acesso em: 3 ago. 2020.

SUGA, H.; TERAOKA, S.; OTA, K.; KOMEMUSHI, S.; FURUTANI, S.; YAMAUCHI, S. *et al.* Preventive effect of pirfenidone against experimental sclerosing peritonitis in rats. **Exp Toxicol Pathol.**, v.47, n.4, p.287-91, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(11\)80261-7](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(11)80261-7). Acesso em: 11 jan. 2020.

TONG, F.; DONG, B.; CHAI, R.; TONG, K.; WANG, Y.; CHEN, S.; ZHOU, X.; LIU, J. Simvastatin nanoparticles attenuated intestinal ischemia/reperfusion injury by downregulating BMP4/COX-2 pathway in rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2477–2488, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S126063>. Acesso em: 16 fev. 2020.

TREVISANI, H. A. Fibrosis peritoneal. Peritoneal fibrosis. **Nefrologia, Dialisis y Trasplante**, Buenos Aires, v. 35, n. 2, p. 88-100, 2015. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/5642/564261418007.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2020.

TSENG, C-C.; CHEN, J-B.; WANG, I-K.; LIAO, S-C.; CHENG, B-C.; WU, A-B.; CHANG, Y-T.; HUNG, S-Y.; HUANG, C-C. Incidence and outcomes of encapsulating peritoneal sclerosis (EPS) and factors associated with severe EPS. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0190079>. Acesso em: 11 jan. 2020.

UPPONI, S.; BUTLER, A. J.; WATSON, C. J. E.; SHAW, A. S. Encapsulating peritoneal sclerosis Correlation of radiological findings at CT with underlying pathogenesis. **Clinical Radiology**, v. 69, p. 103-109, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crad.2013.09.004>. Acesso em: 11 jan. 2020.

USRDS. United States Renal Data System. **US Renal Data System 2019 Annual Data Report: epidemiology of kidney disease in the United States**. 2019. Disponível em <https://pt.scribd.com/document/450748540/USRDS-2019-ES-final>. Acesso em: 11 jan. 2020.

USRDS. United States Renal Data System. **US Renal Data System 2020 Annual Data Report: epidemiology of kidney disease in the United States**. 2020. Disponível em: <https://adr.usrds.org/2020/end-stage-renal-disease>. Acesso em: 19 abr. 2021.

VIDAL, E.; EDEFONTI, A.; PUTEO, F.; CHIMENZ, R.; GIANOGLIO, B.; LAVORATTI, G.; LEOZAPPA, G.; MARINGHINI, S.; MENCARELLI, F.; PECORARO, C.; RATSCH, I. M.; CANNAVÒ, R.; DE PALO, T.; TESTA, S.; MURER, L.; VERRINA, E. Encapsulating peritoneal sclerosis in paediatric peritoneal dialysis patients: the experience of the Italian Registry of Pediatric Chronic Dialysis. **NDT - Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, Issue 6, p. 1603-1609, jun. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ndt/gft061>. Acesso em: 11 jan. 2020.

VILLANOVA, J. C. O.; OREFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/po/v20n1/aop_pol_0497.pdf. Acesso em: 11 jan. 2020.

VYTORIN: solução oral. Responsável técnico Fernando C. Lemos. México: Merck Sharp & Dohme de México S.A., 2020. Disponível em: <https://www.farmadelivery.com.br/media/upload/pdf/BULAS/Vytorin.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2020. Bula de remédio.

WANG, C-Z.; FU, Y-C.; JIAN, S-C.; WANG, Y-H.; LIU, P-L.; HOA, M-L.; WANG, C-K. Synthesis and characterization of cationic polymeric nanoparticles as simvastatin carriers for enhancing the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 432, p. 190-199, out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.06.037> Get rights and content. Acesso em: 16 fev. 2020.

WANG, H.; LIU, J.; TAO, S.; CHAI, G.; WANG, J.; HU, F.; YUAN, H. Tetracycline-grafted PLGA nanoparticles as bone-targeting drug delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 5671-5685, set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S88798>. Acesso em: 16 fev. 2020.

WYNN, T. A.; RAMALINGAN, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nat Med**, v. 18, n. 7, p. 1028-40, 2012.

YANG, X.; YIN, M.; YU, L.; LU, M.; WANG, H.; TANG, F. Simvastatin inhibited oxLDL-induced proatherogenic effects through calpain-1-PPAR γ -CD36 pathway. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, n. 12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0295>. Acesso em: 11 jan. 2020.

YENIÇERIOĞLU, Y.; ÜZELCE, O.; AKAR, H.; KOLATAN, E.; YILMAZ, O.; YENISEY, Ç.; SARIOĞLU, S.; METEOĞLU, I. Effects of atorvastatin on development of peritoneal fibrosis in rats on peritoneal dialysis. **Renal Failure**, v. 32, n. 9, p. 1095–1102, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/0886022X.2010.508859>. Acesso em: 11 jan. 2020.

ZHANG, Z.; BUA, H.; GAOA, Z.; HUANGA, Y.; GAOA, F.; LI, Y. The characteristics and mechanism of simvastatin loaded lipid nanoparticles to increase oral bioavailability in rats **International Journal of Pharmaceutics**, v. 394, p. 147–153, 2010.

APÊNDICE A – IDENTIFICAÇÃO DE GAIOLA

IDENTIFICAÇÃO DE GAIOLA

GAIOLA 1	DATA	XX/XX/XX
GRUPO CONTROLE		
5 RATOS ACOMPANHAMENTO 21 DIAS		
SEM USO DE SINVASTATINA		
RATO 1	1 MARCA	
RATO 2	2 MARCAS	
RATO 3	3 MARCAS	
RATO 4	4 MARCAS	
RATO 5	5 MARCAS	
ALUNO - BARONI, GILBERTO		

GAIOLA		
3	DATA	XX/XX/XX
GRUPO CONTROLE		
5 RATOS ACOMPANHAMENTO 48 DIAS		
SEM USO DE SINVASTATINA		
	1	
RATO 1	MARCA	
RATO 2	2 MARCAS	
RATO 3	3 MARCAS	
RATO 4	4 MARCAS	
RATO 5	5 MARCAS	
ALUNO - BARONI, GILBERTO		

GAIOLA		
4	DATA	XX/XX/XX
GRUPO EXPERIMENTAL		
5 RATOS ACOMPANHAMENTO 48 DIAS		
USO DE SINVASTATINA		
	1	
RATO 1	MARCA	
RATO 2	2 MARCAS	
RATO 3	3 MARCAS	
RATO 4	4 MARCAS	
RATO 5	5 MARCAS	
ALUNO - BARONI, GILBERTO		

APÊNDICE B – PLANILHAS DE ACOMPANHAMENTO

dia	HORA	ESTATINA	HORA	PESO	INTERCORRÊNCIA	rubrica
1	S(O N()					
2	S(O N()					
3	S(O N()					
4	S(O N()					
5	S(O N()					
6	S(O N()					
7	S(O N()					
8	S(O N()					
9	S(O N()					
10	S(O N()					
11	S(O N()					
12	S(O N()					
13	S(O N()					
14	S(O N()					
15	S(O N()					
16	S(O N()					
17	S(O N()					
18	S(O N()					
19	S(O N()					
20	S(O N()					
21	S(O N()					
22	S(O N()					
23	S(O N()					
24	S(O N()					
25	S(O N()					
26	S(O N()					
27	S(O N()					
28	S(O N()					
29	S(O N()					
30	S(O N()					
31	S(O N()					
32	S(O N()					
33	S(O N()					
34	S(O N()					
35	S(O N()					
36	S(O N()					
37	S(O N()					
38	S(O N()					
39	S(O N()					
40	S(O N()					
41	S(O N()					
42	S(O N()					
43	S(O N()					
44	S(O N()					
45	S(O N()					
46	S(O N()					
47	S(O N()					
48	S(O N()					

APÊNDICE C – DESCRIÇÃO DA OPERAÇÃO

DESCRIÇÃO DE CIRURGIA

DATA	XX/XX/XX	
HORA INÍCIO		
RATO N		
GRUPO	EXP ()	CONTROL ()
GAIOLA N		
PESO		

ANESTESIA

DOSE	KETAMINA	
	XILASINSA	

CIRURGIÃO	
AUXILIAR	
TÉCNICO	

INTERCORRÊNCIAS

DESCRIÇÃO PROCEDIMENTO

HORA FIM	
----------	--

EUTANÁSIA

HORA	
------	--

DESCRIÇÃO

--

ASSINATURA

ASSINATURA

APÊNDICE D – FORMULÁRIO DE ENCAMINHAMENTO

CARTÃO DE IDENTIFICAÇÃO MATERIAL PARA PATOLOGIA
FEITO DE MODO CEGO

RATO NÚMERO

CAIOLA NÚMERO

MATERIAL

BAÇO

PERITÔNIO

DATA RETIRADA

DATA ENTREGA

FIXADOR

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo/ Process CEUA – 037/2018
Protocolo UEPG – 6116/2018Título – *Projeto de pesquisa “Desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanocápsulas poliméricas contendo sinvastatina na prevenção da fibrose peritonial”*

Interessado: Gilberto Baroni/Paulo Victor Farago

e-mail: pvfarago@gmail.com

Data de Entrada – 17/04/2018

Resultado: Aprovado

Considerações

A comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecidas pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 36 ratos heterogênicos para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 28 de setembro de 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Dra. *Dionísia Xavier Samparin*

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264

ANEXO B – CÁLCULO DO NÚMERO DA AMOSTRA

