

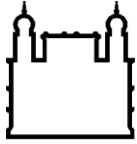
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**NANOPARTÍCULAS CONTENDO O ANÁLOGO DA MEXILETINA,
JME-173: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA EM MODELO DE INFLAMAÇÃO
PULMONAR INDUZIDA POR LPS**

DIEGO DE SÁ COUTINHO

Rio de Janeiro
2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DIEGO DE SÁ COUTINHO

Nanopartículas contendo o análogo da mexiletina, JME-173: Desenvolvimento, caracterização e avaliação farmacológica em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Imunologia e Farmacologia.

Orientadores: Prof. Dr. Marco Aurélio Martins
Prof. Dr^a. Andressa Bernardi

RIO DE JANEIRO

2017

Coutinho, Diego de Sá.

Nanopartículas contendo o análogo da mexiletina, JME-173: desenvolvimento, caracterização e avaliação farmacológica em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS / Diego de Sá Coutinho. - Rio de Janeiro, 2017.

124 f.

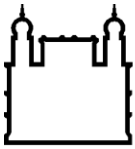
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Marco Aurélio Martins.

Co-orientadora: Andressa Bernardi.

Bibliografia: f. 86-107

1. Doenças Inflamatórias pulmonares. 2. Anestésico Local. 3. Mexiletina. 4. JME-173. 5. Nanotecnologia. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DIEGO DE SÁ COUTINHO

**NANOPARTÍCULAS CONTENDO O ANÁLOGO DA MEXILETINA,
JME-173: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR
INDUZIDA POR LPS**

**ORIENTADORES: Prof. Dr. Marco Aurélio Martins
Prof. Dr^a. Andressa Bernardi**

Aprovada em: 25/10/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Hugo Caire C. F. Neto (FIOCRUZ) – Presidente
Prof. Dra. Bartira Rossi Bergmann (UFRJ)
Prof. Dr. Helvécio Vinicius Rocha (FIOCRUZ)
Prof. Dra. Adriana Ribeiro Silva (FIOCRUZ)
Prof. Dr. Jorge Carlos S. da Costa (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 25 de outubro de 2017

Aos meus pais,

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos últimos 4 anos de trabalho que resultaram nesta tese, diversas pessoas e instituições me ajudaram, ensinaram e apoiaram. Agora que alcanço meus objetivos, não poderia deixar de reconhecê-las.

Como não poderia deixar de ser, agradeço primeiramente a Deus, que me manteve perseverante nos meus propósitos principalmente diante das adversidades e cuja luz sempre me guiou e guiará durante toda a vida.

Ao meu pai, Santiago Martins Coutinho Filho, pelo esforço, suor e sacrifício para dar toda a educação que tenho hoje, sempre me estimulando a estudar, para que eu pudesse alcançar meus objetivos. À minha mãe Dalva Maria de Sá Coutinho, melhor exemplo de mulher e mãe. Obrigado por ser sempre presente em minha vida, torcendo e ajudando para que eu possa realizar meus sonhos. Farei o máximo para deixá-la cada vez mais orgulhosa de mim. Vocês dois me ensinaram muito mais do que as escolas podem ensinar. Amo vocês extremamente!

Ao meu irmão Thiago de Sá Coutinho, a quem amo tanto, por todo amor e por estar sempre presente em todas as etapas de minha vida. Sou muito feliz por ter crescido ao seu lado.

Agradeço a minha paixão e noiva, Raghda Ferreira de Almeida, com quem eu sei que passarei por muitos momentos de felicidade como este. Você é a pessoa que Deus escolheu para ser minha eterna companheira. Obrigado por todo amor e companheirismo ao longo desses 8 anos e por entender os momentos de ausência durante a realização deste trabalho. Te amo muito.

Agradeço de modo especial ao meu orientador, Dr. Marco Aurélio Martins, pela orientação sempre presente, assim como pelas correções e sugestões, que me ajudaram a moldar o pensamento científico que tenho hoje. Você é o grande exemplo que eu venho tentando seguir ao longo dos anos. Sou extremamente grato por toda a oportunidade, além do crescimento pessoal e profissional que você me proporciona desde a iniciação científica até os dias atuais.

Agradeço com enorme carinho também a minha orientadora, Dra Andressa Bernardi, cuja participação constante tem sido fundamental para o meu aprendizado pessoal e científico. Obrigado por sempre acreditar em meu potencial e estimular o meu crescimento profissional. Te admiro muito e agradeço por tudo que tenho aprendido ao longo desses anos.

Agradeço também a minha família pelo orgulho que sentem de mim, em especial a minha avó Cirene Moraes, por todo amor que a mim dedicou enquanto esteve presente, meu

avô Santiago Martins por sempre se preocupar com o andamento do meu projeto e minha tia Alzira Caetano por ser a melhor tia do mundo.

Agradeço a todos do laboratório de inflamação que de forma direta ou indireta me ajudaram no desenvolvimento deste projeto ou me ensinaram algo valioso durante o caminho. Em especial a Dra Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins, por todo o incentivo e carinho ao longo dos anos e ao Dr. Vínicius de Frias Carvalho, por todas as dicas profissionais e conversas amigáveis. Agradeço também a Osirene de Gois (Dadá), fundamental para o bom andamento do laboratório, ao Gabriel Soares, Octávio Vicente, Cristiano Gomes, Ana Carol e Bia Torres, por toda ajuda ao longo do percurso, a Amanda Cotias pela amizade de longa data e por ter me possibilitado conhecer o laboratório, ao Yago Amigo e Dany Bianchi, pelas ajudas e constantes conversas, científicas ou não. Além disso, gostaria de agradecer a Maria Talita Pacheco e Hyago Gomes pela alegria e companheirismo incomparável, estando sempre presentes nos experimentos, desde os mais fáceis até os mais complexos.

Agradeço também toda a colaboração realizada com o laboratório da Faculdade de Farmácia da UFRGS, principalmente a Dra Sílvia Guterres, Dra Adriana Pohlmann e ao Dr Manoel Ortiz, por me receberem tão bem e por todo o ensinamento que obtive no preparo e caracterização das formulações utilizadas em meu trabalho. Sem vocês, nada disso seria possível.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da FIOCRUZ, incluindo a coordenação, professores e secretaria, os quais foram importantes na minha formação acadêmica.

A toda a banca, inclusive revisores e suplentes, por terem aceitado o convite de ler e avaliar o meu trabalho.

Agradeço ainda as instituições de amparo à pesquisa que financiaram meu trabalho: Capes, Faperj, CNPq e FIOCRUZ.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

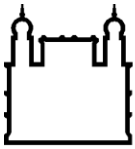
NANOPARTÍCULAS CONTENDO O ANÁLOGO DA MEXILETINA, JME-173: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Diego de Sá Coutinho

Estudos anteriores sugerem que análogos não anestésicos de lidocaína seriam uma forma alternativa de obter-se os efeitos antiasmáticos sem os efeitos adversos do anestésico local (AL). O composto JME-173, análogo não anestésico do AL mexiletina, foi planejado para agir como anti-inflamatório e broncodilatador de uso oral. Entretanto, apesar de ativo na asma experimental após nebulização, seu efeito por via oral foi pouco significativo. O presente projeto visou o desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas contendo JME-173 e a avaliação de seu potencial efeito farmacológico na inflamação pulmonar induzida por LPS. As formulações de nanocápsulas foram preparadas pela técnica de deposição interfacial de polímeros biodegradáveis pré-formados. A análise fatorial indicou que as formulações preparadas com o polímero Eudragit® S-100 apresentaram melhor diâmetro e melhor índice de polidispersão, se comparadas ao polímero PCL. As nanocápsulas de Eudragit® S-100, contendo JME-173, apresentaram diâmetro médio de 120-180 nm, potencial zeta de -39,9 mV e baixo índice de polidispersão. O teor médio do composto na formulação foi de 95%, com 97% de eficiência de encapsulação. Visando a avaliação farmacológica das formulações, camundongos A/J machos foram tratados, 4 h antes da instilação com LPS, com JME-173 livre ou nanoencapsulado (8-50 mg/Kg, v.o.), sendo as análises realizadas 18 h após a provocação. Os resultados mostraram que o tratamento com JME-173 nanoencapsulado (8 e 25 mg/kg), diferente da forma livre, reduziu o influxo leucocitário no lavado broncoalveolar, a atividade de mieloperoxidase e os níveis de KC, IL-1 β , MCP-1 e RANTES no pulmão de camundongos desafiados com LPS. O tratamento com a formulação de JME-173 aboliu também a elastância pulmonar aumentada nos animais desafiados. Visando aumentar o tempo de estabilidade das nanocápsulas de JME-173 em suspensão, que se mostrou pouco satisfatório, o preparo das nanocápsulas foi acrescido de uma etapa de secagem da suspensão. A secagem foi realizada através da técnica de *spray dryer*, e resultou em nanocápsulas sob a forma de pó, que após redispersão em salina, evidenciou as mesmas características físico-químicas da suspensão original. Ademais, o tratamento com nanocápsulas de JME-173 (25 mg/kg), imediatamente após redispersão, aboliu o acúmulo de leucócitos no lavado broncoalveolar e tecido, a produção de citocinas inflamatórias e a hiper-reatividade das vias aéreas observados nos animais estimulados com LPS. Em conjunto, os resultados indicam que a nanoencapsulação de JME-173, na presença do polímero de Eudragit® S-100, aumentou significativamente a atividade anti-inflamatória do composto. Os achados sugerem ainda que a nanoformulação de JME-173 pode ser estocada sob a forma de pó seco e administrada por via oral imediatamente após redispersão em salina. Esses achados sublinham o potencial anti-inflamatório do composto JME-173 administrado oralmente, enfatizando o seu valor no contexto do desenvolvimento de novas formas de tratamento para condições clínicas onde haja inflamação pulmonar mediada por neutrófilos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Diego de Sá Coutinho

Prior studies have suggested that non-anesthetic analogs of lidocaine might be a means of achieving the anti-asthmatic effects of lidocaine without the local anesthetic (LA) effect, which has been associated to adverse effects. JME-173, a non-anesthetic analogue of the LA mexiletine was designed to act as an oral anti-inflammatory and bronchodilator agent. However, although active in experimental asthma when nebulized, its oral effect was very poor. The aim of this study was the development and physical-chemical characterization of nanocapsules containing JME-173 and the evaluation of its potential pharmacological effect on LPS-induced lung inflammation. The nanocapsule formulations were prepared by interfacial deposition of preformed biodegradable polymers method. The factorial analysis indicated that formulations prepared with the Eudragit® S-100 polymer had a better diameter and polydispersity index, compared to the PCL polymer. Eudragit® S-100 nanocapsules, containing JME-173, had an average diameter of 120-180 nm, zeta potential of -39.9 mV and a low polydispersity index. The average content of JME-173 in formulation was 95%, with 97% encapsulation efficiency. Aiming at the pharmacological evaluation of formulations, male A / J mice were treated 4 h before LPS instillation, with free or nanoencapsulated JME-173 (8-50 mg / kg, orally) and 18 h after challenge, were performed the analysis. Results showed that treatment with nanocapsules containing JME-173 (8 and 25 mg / kg), but not free JME-173, reduced leukocyte influx in bronchoalveolar lavage, myeloperoxidase activity, and levels of KC, IL-1 β , MCP-1 and RANTES in the lung of mice challenged with LPS. Treatment with JME-173 formulation also abolished LPS-induced augmentation in lung elastance response. Aiming at to improve the stability of JME-173 loaded nanocapsules suspension, which was proved to be quite limited, we modified the nanocapsule preparation method to add a drying step, based on the *spray drier* technique. This procedure led to the achievement of powder nanocapsules of JME-173, which after redispersion in saline showed the same physicochemical characteristics of original suspension. In addition, treatment with JME-173 loaded nanocapsules (25 mg/kg, oral) abolished LPS-induced accumulation of leukocytes in bronchoalveolar lavage and tissue, inflammatory cytokines, and airway hyper-reactivity. Taken together, the results indicate that nanoencapsulation of JME-173, with Eudragit® S-100 polymer, significantly improved the compound's anti-inflammatory activity. The findings also suggest that JME-173 nanoformulation can be stored as dry powder without losing anti-inflammatory activity following oral administration immediately after redispersion. These findings highlight the anti-inflammatory potential of orally administered JME-173, emphasizing its putative value in drug development for clinical conditions where there is lung inflammation mediated by neutrophils.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AHR - *Airway hyperresponsiveness* (Hiper-reatividade das vias aéreas)
AP1 - *Activator protein 1* (Proteína ativadora 1)
BAL - *Bronchoalveolar lavage* (Lavado bronco alveolar)
BCA - *Bicinchoninic acid* (Ácido bicinchrônico)
BSA - *Bovine serum albumin* (Albumina do soro bovino)
cAMP - *Cyclic adenosine monophosphate* (Adenosina monofosfato cíclica)
Cecal - Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA - Comissão de Uso de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
DLS - *Dynamic light scattering* (Espalhamento de luz dinâmico)
DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica
DS - *Drug score*
ECP - *Eosinophil cationic protein* (Proteína catiônica de eosinófilos)
EDN - *Eosinophil derived neurotoxin* (Neurotoxina derivada de eosinófilos)
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima)
EPO - *Eosinophil peroxidase* (Peroxidase de eosinófilos)
GRE - *Glucocorticoid response element* (Elementos de resposta a glicocorticoides)
HCL - *Hydrogen chloride* (Ácido clorídrico)
HTAB - *Hexadecyltrimethylammonium bromide* (Brometo de hexadeciltrimetilamônio)
IgE - Imunoglobulina do tipo E
IL - Interleucina
KC/CXCL1 - *Keratinocyte chemoattractant* (Quimioatrativo de queratinócitos)
LD - Laser diffraction (Difração de laser)
LPS - Lipopolissacarídeo
MBP - *Major basic protein* (Proteína básica principal)
MCP-1/CCL2 - *Monocyte chemoattractant protein-1* (Proteína quimiotática de monócitos 1)
MMP - *Matrix metalloproteinases* (Metaloproteinases da matriz)
MPO - Mieloperoxidase
NF- κ B - *Nuclear factor kappa B* (Fator nuclear kappa B)
PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
PCL - Poli épsilon caprolactona
PDE4 - *Phosphodiesterase* (Fosfodiesterase tipo 4)
PKA - Proteína cinase A
RANTES/CCL5 - *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted* (Fator regulador da ativação expressos e secretados por linfócitos T normais)
SDRA - Síndrome do desconforto respiratório agudo
SUS - Sistema Único de Saúde
TCM - Triglicerídeos de cadeia média
Th - *T Helper* (T auxiliar)
UTI - Unidade de terapia intensiva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Toxicidez e propriedades físico-químicas <i>in silico</i>	20
Tabela 3.1 Constituintes das formulações das nanocápsulas contendo JME-173	36
Tabela 4.1 Doseamento da concentração experimental de JME-173 presente na formulação de nanocápsulas (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente)..	54
Tabela 4.2 Eficiência de encapsulação do JME-173 na formulação (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente)	55
Tabela 4.3 Determinação de pH da formulação nanocápsulas contendo JME-173 (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente)	55
Tabela 4.4 Caracterização físico-química das nanopartículas contendo JME-173 (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente)	55
Tabela 4.5 Doseamento da concentração experimental de JME-173 presente na formulação seca de nanocápsulas	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Desenvolvimento da resposta inflamatória asmática	06
Figura 1.2 Aspectos fisiopatológicos da DPOC	09
Figura 1.3 Fisiopatologia da SDRA	12
Figura 1.4 Estrutura química da Lidocaína	16
Figura 1.5 Estrutura química da Mexiletina	19
Figura 1.6 Estrutura química do JME-173	21
Figura 1.7 Tamanhos relativos de nanopartículas em comparação com estruturas biológicas comuns e sua escala de comprimento associada	24
Figura 1.8 Exemplos de nanocarreadores.....	26
Figura 1.9 Estrutura das nanocápsulas poliméricas com núcleo oleoso.....	27
Figura 3.1 Organograma do estudo fatorial para preparação das nanocápsulas contendo JME-173	34
Figura 3.2 Organograma do estudo fatorial para preparação das formulações secas de nanocápsulas contendo JME-173	37
Figura 3.3 Protocolo experimental do modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS ..	41
Figura 4.1 Análise de peso dos animais submetidos ao tratamento contínuo com mexiletina ou JME-173	46
Figura 4.2 Número de células no sangue dos animais submetidos ao tratamento contínuo com mexiletina ou JME-173.....	47
Figura 4.3 Análise bioquímica do sangue dos animais submetidos ao tratamento contínuo com mexiletina ou JME-173.....	48
Figura 4.4 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de partículas da suspensão de nanocápsulas revestidas com PCL na proporção de JME-173 em triglicerídeos de cadeia média de 1:2 (A); 1:1 (B) e 2:1 (C), através de difratometria a laser.....	50

Figura 4.5 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de partículas da suspensão de nanocápsulas revestidas com Eudragit® S-100 na proporção de JME-173 em triglicerídeos de cadeia média de 1:2 (A); 1:1 (B) e 2:1 (C), através de difratometria a laser	51
Figura 4.6 Avaliação do diâmetro médio e do índice de polidispersão de nanocápsulas contendo JME-173 (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente).....	53
Figura 4.7 Avaliação do potencial zeta de nanocápsulas contendo JME-173 (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente), através de mobilidade eletroforética.....	53
Figura 4.8 Detecção e curva de calibração de JME-173 livre obtido por HPLC	54
Figura 4.9 Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre o influxo de células inflamatórias no BAL de camundongos instilados com LPS	57
Figura 4.10 Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre a atividade de MPO no pulmão de camundongos instilados com LPS	58
Figura 4.11 Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos, 18 horas após a instilação com LPS ...	59
Figura 4.12 Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre a hiperreatividade das vias aéreas, 18 horas após provocação com LPS	60
Figura 4.13 Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre o influxo de células inflamatórias no BAL de camundongos instilados com LPS	61
Figura 4.14 Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre a atividade de MPO no pulmão de camundongos instilados com LPS	62
Figura 4.15 Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos, 18 horas após a instilação com LPS ...	63
Figura 4.16 Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre a hiperreatividade das vias aéreas, 18 horas após provocação com LPS	64

Figura 4.17 Avaliação da distribuição de tamanho, através de difratometria a laser, de formulações secas de JME-173 nanoencapsulado, contendo o adjuvante de secagem lactose em diferentes proporções	66
Figura 4.18 Avaliação da distribuição de tamanho, através de difratometria a laser, de formulações secas de JME-173 nanoencapsulado, contendo o adjuvante de secagem l-leucina em diferentes proporções	67
Figura 4.19 Efeito do tratamento oral com JME-173 25 mg/Kg nanoencapsulado sobre o influxo de células inflamatórias no BAL de camundongos instilados com LPS...	69
Figura 4.20 Efeito do tratamento oral com JME-173 (25 mg/Kg) nanoencapsulado sobre a atividade de MPO no pulmão de camundongos provocados com LPS	70
Figura 4.21 Efeito do tratamento oral com JME-173 25 mg/Kg nanoencapsulado sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos, 18 horas após a instilação com LPS	71
Figura 4.22 Efeito do tratamento oral com JME-173 25 mg/Kg nanoencapsulado sobre a hiper-reatividade das vias aéreas, 18 horas após a instilação com LPS	72
Figura 6.1 Efeito anti-inflamatório e broncorelaxador do tratamento com JME-173 nanoencapsulado, avaliado em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS..	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS PULMONARES	01
1.1.1. Aspectos gerais.....	01
1.1.2. Prevalência	02
1.1.3. Fisiopatologia das doenças inflamatórias pulmonares	03
1.1.3.1. Asma.....	03
1.1.3.2. DPOC	07
1.1.3.3. SDRA	10
1.1.4. Modelos experimentais.....	13
1.1.5. Terapias farmacológicas	14
1.2. ANESTÉSICOS LOCAIS NA TERAPIA CONTRA DOENÇAS INFLAMATÓRIAS PULMONARES	15
1.2.1. Lidocaína.....	15
1.2.2. Análogos não anestésicos da lidocaína.....	18
1.2.3. Análogos não anestésicos da mexiletina	19
1.3. NANOTECNOLOGIA	22
1.3.1. Aspectos gerais.....	22
1.3.2. Sistemas nanocarreadores.....	22
1.3.3. Nanocápsulas Poliméricas	27
1.3.4. Polímeros sintéticos.....	28
1.3.5. Nanotecnologia e Tecido Pulmonar	30
2. OBJETIVOS E METAS	32
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos específicos.....	32

3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Preparo e caracterização físico-química de nanocápsulas contendo JME-173	34
3.1.1. Estudo de desenvolvimento da formulação	34
3.1.2. Preparo das suspensões de nanocápsulas contendo JME-173	35
3.1.3. Estudo fatorial e preparo das formulações secas de nanocápsulas contendo JME-173.....	36
3.1.4. Caracterização físico-química das formulações	37
3.1.4.1. Análise do tamanho de partícula por difração de laser (LD).....	37
3.1.4.2. Análise do tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	38
3.1.4.3. Análise do potencial zeta.....	38
3.1.4.4. Quantificação de JME-173 na formulação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) - UV	38
3.1.4.5. Eficiência de encapsulação	39
3.1.4.6. pH das formulações	39
3.2. Animais.....	39
3.3. Avaliação de alterações de peso corporal e parâmetros bioquímicos e leucocitários sanguíneos, após tratamento repetitivo com JME-173 por 35 dias	40
3.3.1. Análise de peso.....	40
3.3.2. Contagem de células do sangue.....	40
3.3.3. Análises bioquímicas do sangue.....	40
3.4. Avaliação do efeito anti-inflamatório do JME-173 nanoencapsulado em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS	41
3.4.1. Modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS	41
3.4.2. Medidas de mecânica respiratória	41
3.4.3. Avaliação de células do lavado broncoalveolar	42
3.4.4. Quantificação de proteínas do tecido pulmonar	42

3.4.5. Quantificação de citocinas e quimiocinas do tecido pulmonar	43
3.4.6. Quantificação de Mieloperoxidase no tecido pulmonar	43
3.4.7. Análise Estatística	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Análise do peso corporal e parâmetros bioquímicos e leucocitários no sangue, após administração oral crônica de JME-173 livre.....	45
4.2. Desenvolvimento e caracterização da suspensão de nanocápsulas contendo JME-173	49
4.2.1. Estudo fatorial	49
4.2.2. Caracterização físico-química	52
4.3. Avaliação farmacológica da formulação de JME-173 nanoencapsulado.....	56
4.3.1. Efeito do tratamento com JME-173 (50 mg/Kg) nanoencapsulado sobre o infiltrado de células inflamatórias induzido por LPS no lavado bronchoalveolar	56
4.3.2. Efeito do tratamento com JME-173 (50 mg/Kg) nanoencapsulado sobre a atividade de MPO no pulmão.....	58
4.3.3. Efeito do tratamento com JME-173 (50 mg/Kg) nanoencapsulado sobre a produção de citocinas induzidas por LPS.....	59
4.3.4. Efeito comparativo do tratamento com JME-173 livre ou nanoencapsulado (50 mg/kg) sobre a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas induzida por provocação com LPS.....	60
4.3.5. Efeito do tratamento com JME-173 (8 e 25 mg/Kg) nanoencapsulado sobre o influxo de células inflamatórias no BAL.....	61
4.3.6. Efeito do tratamento com JME-173 (8 e 25 mg/Kg) nanoencapsulado sobre os níveis de MPO no tecido pulmonar	62
4.3.7. Efeito do tratamento com JME-173 (8 e 25 mg/Kg) nanoencapsulado sobre a produção de citocinas induzida por provocação com LPS	63
4.3.8. Efeito do tratamento com JME-173 (8 e 25 mg/Kg) nanoencapsulado sobre a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas induzida por provocação com LPS	64

4.4. Desenvolvimento e caracterização de formulação de nanocápsulas secas contendo JME-173	65
4.4.1. Preparo e caracterização físico-química.....	65
4.5. Avaliação farmacológica da formulação seca de nanocápsulas contendo JME-173... ..	68
4.5.1. Efeito da formulação seca de nanocápsulas de JME-173 sobre o acúmulo de leucócitos no lavado broncoalveolar e no pulmão após provocação com LPS	68
4.5.2. Efeito do tratamento com JME-173 (25 mg/Kg) nanoencapsulado sob a forma de pó redisperso sobre os níveis de citocinas após provocação com LPS	71
4.5.3. Efeito do tratamento com JME-173 nanoencapsulado suspensão e pó redisperso sobre a hiper-reatividade das vias aéreas induzida por provocação com LPS	72
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO.....	84
7. REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS PULMONARES

1.1.1. Aspectos gerais

As doenças inflamatórias pulmonares são um dos problemas de saúde pública de maior relevância mundial atualmente. A asma, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) são exemplos de distúrbios inflamatórios pulmonares de enorme impacto sobre a vida dos pacientes, apresentando índices consideráveis de morbidade e mortalidade (1-3). Todas as doenças são caracterizadas por um perfil inflamatório crônico no pulmão e por limitação do fluxo de ar, mas a natureza da inflamação difere entre as doenças, resultando em diferentes patologias, manifestações clínicas e respostas à terapia. Em casos extremos, os pacientes compartilham traços de mais de uma das doenças simultaneamente (4-6).

A asma pode ser definida como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas desencadeada, principalmente, por exposição a alérgenos, resultando em obstrução do fluxo de ar, o qual é geralmente reversível espontaneamente ou com tratamento (7). De maneira diferente, a DPOC é descrita como uma doença pulmonar caracterizada por uma resposta inflamatória crônica nas vias aéreas e nos pulmões a partículas ou gases nocivos, levando a obstrução persistente do fluxo de ar, a qual é geralmente progressiva e irreversível ou apenas parcialmente reversível (8, 9). Já a SDRA é uma doença ocasionada, em 79% dos casos, por sepse grave, sendo caracterizada por hipoxemia aguda e infiltração bilateral no tórax, levando ao comprometimento da troca de gasosa (10).

Embora classificadas como enfermidades distintas, a DPOC e a SDRA são marcadas por inflamação pulmonar associada predominantemente à resposta imune inata. Em ambos os casos, os macrófagos e neutrófilos têm participação importante no desenvolvimento e no estabelecimento da doença (11, 12). De forma contrária, a asma é originalmente definida como uma doença inflamatória alérgica com participação de linfócitos Th2, produção de imunoglobulina do tipo E (IgE) por linfócitos B, além do envolvimento de outros leucócitos como eosinófilos, basófilos e mastócitos (1). No entanto, hoje em dia sabe-se que a imunidade inata e neutrófilos atuam ativamente em alguns fenótipos de asma, assim como a eosinofilia exacerbada pode estar presente em subgrupos de pacientes portadores de DPOC (13, 14).

1.1.2. Prevalência

Informações precisas sobre a prevalência das doenças inflamatórias pulmonares são cruciais para compreender os seus custos, juntamente com os rumos em relação à prevenção ou ao tratamento ao longo do tempo e em diferentes regiões (15). A asma é uma doença respiratória crônica que afeta 1-18% da população em diferentes países (16). As estimativas de análises mundiais sugerem que cerca de 235 a 334 milhões de indivíduos sofram com a doença, com projeções de que a asma atinja 400 milhões de pacientes em 2025 (7, 17). A asma atópica, associada às respostas alérgicas, é a forma mais comum da doença (17, 18). Sua prevalência está aumentando em muitos países, especialmente entre as crianças. Embora alguns países tenham registrado um declínio nas hospitalizações e nas mortes, a asma ainda impõe um custo extremamente elevado aos sistemas de cuidados de saúde e à sociedade através da perda de produtividade no local de trabalho e, especialmente na asma infantil, transtornos a família (16). Achados da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma demonstram que em 2011 houve cerca de 160.000 hospitalizações, no Brasil, em virtude de exacerbações de asma. Tal estudo indicou que a doença foi a quarta principal causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde (SUS), além de ter sido a terceira principal causa de hospitalizações em crianças e jovens adultos (19). Um estudo mais recente demonstra que, devido às políticas governamentais de controle da asma, o número absoluto de mortes relacionadas com a doença no país caiu de 2.286 em 1980 para 2.096 em 2014. A taxa bruta de mortalidade da asma caiu de 1,92 para 1,03 mortes por 100.000 habitantes, o que corresponde a uma redução de 46,2%, entre 1980 e 2014 (20).

Assim como a asma, a DPOC é uma doença incapacitante e de alta prevalência. Estima-se que a doença afete cerca de 210 milhões de pessoas no mundo inteiro (21). Devido a sua prevalência, a DPOC também está associada a um elevado custo socioeconômico, além de altos índices de mortalidade (22). Estudos demonstram que a doença leva à morte de pelo menos três milhões de pessoas no mundo inteiro anualmente (8, 23). De forma preocupante, com a crescente prevalência de tabagismo nos países em desenvolvimento e o envelhecimento das populações em países de alta renda, a prevalência de DPOC deverá aumentar nos próximos anos e, até 2030, pode haver mais de 4,5 milhões de mortes por ano de DPOC e condições relacionadas (8). No Brasil, estima-se que a DPOC acometa cerca de sete milhões de pessoas com 40 anos ou mais (24). Devido a sua elevada prevalência, a doença apresenta também altos custos ao sistema de saúde. Em 2011, cerca de 103 milhões de Reais do SUS foram utilizados devido a 142.635 internações relacionadas à DPOC. Esse custo foi superior ao de pacientes com infarto agudo do miocárdio e hipertensão arterial e foi equivalente ao de portadores de diabetes (25). No que diz respeito à mortalidade, nos últimos 20 anos vem

crescendo o número de óbitos por DPOC tanto em homens quanto mulheres brasileiras. Dados de 2013 indicam que a DPOC foi a terceira causa de morte entre as doenças crônicas não transmissíveis, com um aumento de 12% no número de óbitos entre 2005 e 2010, representando quase 40.000 óbitos anuais (25).

Em relação à SDRA, a averiguação de sua prevalência entre os países tem sido difícil, devido ao seu diagnóstico desafiador, levando assim a valores altamente heterogêneos (26). Além disso, as manifestações clínicas da doença estão inerentemente ligadas à disponibilidade de leitos em unidades de terapia intensiva (UTIs) e suporte ventilatório, os quais variam significativamente entre os países e regiões (15). Apesar dessas limitações, um estudo publicado em 2016 por Belanni e colaboradores, avaliou a prevalência de SDRA a nível global. Neste estudo, onde foram analisados 12.906 pacientes admitidos em 459 UTIs de 50 países, cerca de 10,4% preencheram os critérios de SDRA. O estudo revelou também uma alta mortalidade de aproximadamente 40% (27). No Brasil, um estudo recente realizado em pacientes internados na UTI do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, indicou que cerca de 15% apresentaram diagnóstico de SDRA. Nesses pacientes, a taxa de mortalidade foi de 66% (28). De maneira semelhante, a análise de prevalência realizada em pacientes que foram internados em UTIs no estado de São Paulo indica a incidência dessa síndrome em cerca de 10% dos indivíduos (29). No entanto, esses valores podem divergir entre os trabalhos científicos. Um estudo multicêntrico publicado por Azevedo e colaboradores avaliou a prevalência de SDRA em 773 pacientes adultos, que exigiram ventilação invasiva ou não invasiva por mais de 24 horas, em 45 UTIs de 12 estados brasileiros. A SDRA foi diagnosticada em 31% dos pacientes e o índice de mortalidade hospitalar foi de 52% (30).

1.1.3. Fisiopatologia das doenças inflamatórias pulmonares

1.1.3.1. Asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas associada à susceptibilidade genética do indivíduo em desenvolver uma resposta imunológica exacerbada quando exposto a fatores ambientais como alérgenos, infecções respiratórias, fumaça de cigarro e poluição do ar (7, 31, 32). A asma alérgica moderada é um dos tipos mais comuns da doença e é, geralmente, caracterizada pela presença de linfócitos Th2 ativados e infiltrados de eosinófilos em associação com a produção de IgE, hiperplasia e metaplasia de células secretoras de muco e hiper-reatividade das vias aéreas (AHR). Há também remodelamento brônquico decorrente do espessamento do epitélio das vias aéreas, fibrose subepitelial, deposição de colágeno e

hipertrofia muscular lisa (16, 33). Em conjunto, essas alterações estruturais levam aos sintomas recorrentes de falta de ar, sibilo e tosse nos pacientes (34).

A resposta imune apresenta papel crucial no desenvolvimento da asma. Após a exposição a estímulos ambientais como alérgenos, o epitélio ativado libera citocinas, que irão contribuir para o aparecimento da resposta inflamatória desencadeadora da doença (35). Em associação com o epitélio das vias aéreas encontram-se as células apresentadoras de antígenos especializadas, como as células dendríticas, as quais irão capturar o alérgeno, processá-lo em pequenos peptídeos e apresentá-los para os linfócitos T naíve residentes na região dos linfonodos ou nos sítios da mucosa local. Na presença de interleucina (IL)-4, estes linfócitos adquirem perfil de resposta de linfócitos T helper do tipo 2 (Th2) (35, 36). Os linfócitos Th2 têm um papel importante na ativação da resposta imune, através da liberação de mediadores, como a IL-4, a qual promove a diferenciação de linfócitos B, que passam a produzir IgE. A IgE distribui-se sistemicamente através dos vasos linfáticos e, após obter acesso ao tecido pulmonar, irá se ligar ao seu receptor de alta afinidade (Fcε RI) expresso na membrana de mastócitos ou basófilos, promovendo a diferenciação, maturação e prolongamento da sobrevivência dessas células. Este processo de primeiro contato com o alérgeno é conhecido como sensibilização. Nesta fase, não há sintomas clínicos (37, 38).

Após a re-exposição, o alérgeno se liga a pelo menos duas moléculas de IgE ligadas a FcεRI em mastócitos ou basófilos, com subsequente liberação de mediadores pré-formados (histamina, heparina, TNF-α) e mediadores lipídicos recém-sintetizados (prostaglandinas e leucotrienos). Esses eventos podem causar respostas como broncoconstrição, vasodilatação e secreção de muco nas vias aéreas, desencadeando respostas como espirros, tosse, corrimento nasal, dispnéia e aperto no peito dos pacientes (38). Além disso, os linfócitos Th2 de memória específica ao alérgeno, previamente ativados nesta fase da doença, proliferam-se e liberam citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Em casos mais crônicos da doença a IL-13 atua, em conjunto com a IL-4, sob as células caliciformes, induzindo a sua hiperplasia e hipertrofia e aumentando a expressão gênica da mucina, o que resulta na produção exacerbada de muco e, conseqüentemente, obstrução das vias aéreas. Essas citocinas também têm efeito direto nas células musculares lisas das vias aéreas, induzindo sua hipercontractilidade em asmáticos. Além disso, a resposta de IL-4 e IL-13 sobre os fibroblastos contribui para o remodelamento pulmonar, através da indução da produção de citocinas que estimulam as células epiteliais a secretar TGF-β, resultando, dentre outros fatores, no aumento da massa muscular lisa e espessamento da lâmina reticular (39, 40). A IL-5 é importante porque promove a ativação, a maturação e a sobrevivência dos eosinófilos no tecido inflamado, além de aumentar a sua

citotoxicidade e secreção de mediadores químicos (41). Os eosinófilos secretam diversos agentes inflamatórios potentes como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica de eosinófilos (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) e a peroxidase de eosinófilos (EPO), assim como citocinas como IL-5 e IL-13, resultando em graves danos ao tecido e respostas de remodelamento e AHR, perpetuando assim o quadro inflamatório asmático (42).

Os neutrófilos também migram para os pulmões durante a inflamação asmática, em geral nos casos mais graves da doença, num mecanismo majoritariamente mediado por linfócitos Th17 (40). A infiltração e ativação de neutrófilos contribuem para a gravidade da asma, uma vez que a inflamação pulmonar neutrofílica frequentemente responde mal à terapia mais eficaz no controle da asma que é aquela baseada no tratamento com agentes glicocorticoides. Isto torna o neutrófilo um alvo potencialmente atraente para novas terapias antiasmáticas (43). Em tais pacientes, a infiltração neutrofílica está correlacionada com a hipertrofia da glândula mucosa e secreção excessiva de muco, limitação persistente do fluxo de ar e o espessamento da membrana basal, sugerindo que os neutrófilos estão envolvidos em processos que levam ao remodelamento das vias aéreas (39). Um resumo do processo inflamatório asmático está demonstrado na Figura 1.1.

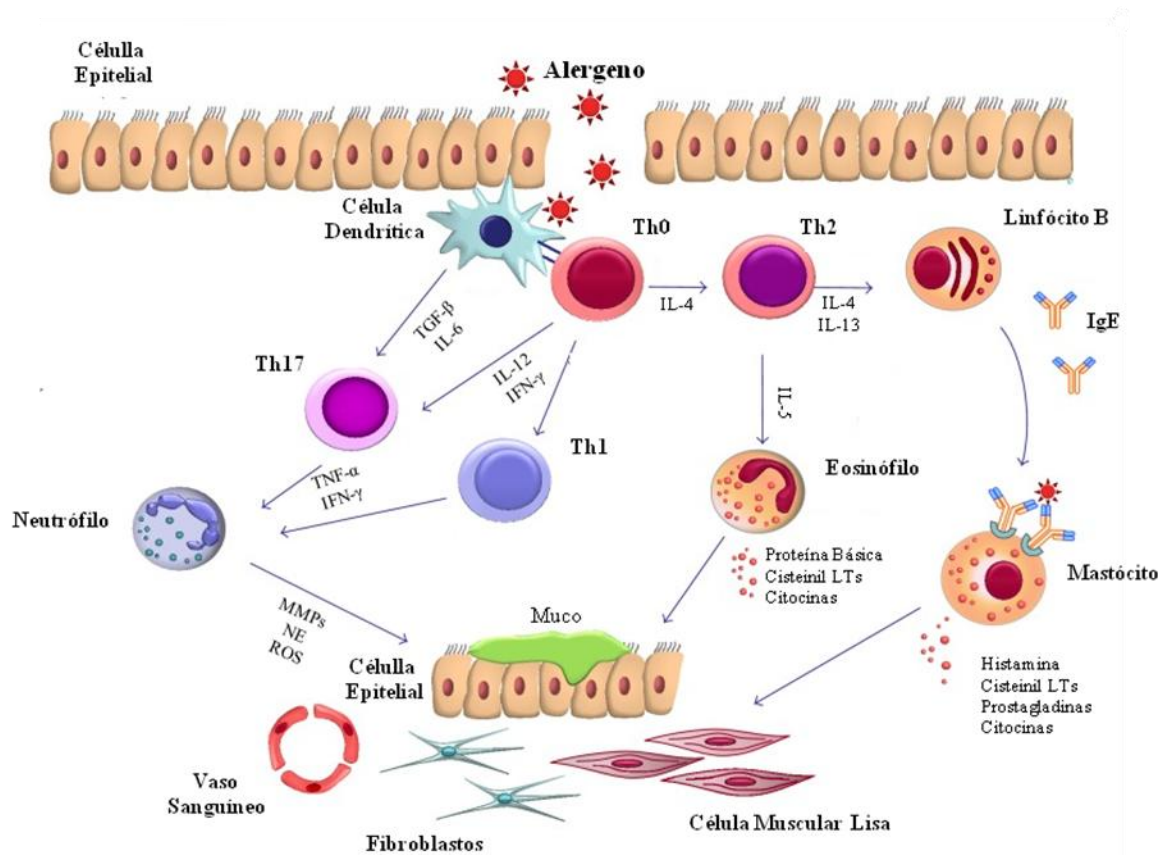


Figura 1.1 - Desenvolvimento da resposta inflamatória asmática. Uma vez dentro da luz das vias aéreas, os alérgenos podem ser capturados por células dendríticas, que processam o antígeno e os apresentam para linfócitos Th0. Esses linfócitos adquirem perfil de resposta Th2, se proliferam e liberam citocinas como a IL-5 que induz a maturação e sobrevivência de eosinófilos e a IL-4 e IL-13 que atuam na troca de classes em linfócitos B que passam a produzir IgE específica aos antígenos. As IgEs são distribuídas sistemicamente e se ligam aos receptores $FC\epsilon RI$ presentes na membrana de mastócitos ou basófilos. Enquanto que os linfócitos Th17 produzem IL17A e IL-17F que induzem o recrutamento e expansão de neutrófilos. Em conjunto, a ação dos diversos mediadores inflamatórios produzidos por diferentes células afetam as funções e taxas de proliferação de células estruturais das vias aéreas, incluindo células epiteliais, fibroblastos, células musculares lisas e células endoteliais vasculares. Modificado de Pelaia e colaboradores, 2015 (32).

1.1.3.2. DPOC

A DPOC é uma doença obstrutiva dos pulmões que progride lentamente ao longo de décadas, levando o paciente à morte por insuficiência respiratória, exceto em casos onde a morte ocorra por comorbidades, como doenças cardiovasculares e câncer de pulmão (44). A DPOC engloba dois fenótipos distintos, a bronquite obstrutiva crônica, caracterizada pela hipersecreção de muco, resultando em obstrução das vias aéreas inferiores e pelo fenótipo enfisematoso, caracterizado por alargamento dos interseptos alveolares e destruição do parênquima, perda da elasticidade pulmonar e fechamento das vias aéreas inferiores. Geralmente os pacientes com DPOC apresentam ambas as condições patológicas, mas a extensão relativa de enfisema e bronquite obstrutiva entre eles pode variar (8, 45). Estudos demonstram que bronquíolos de jovens fumantes já estão inflamados, refletindo os primeiros sinais de DPOC. No entanto, apenas cerca de 25% dos fumantes desenvolvem a doença, sugerindo que fatores genéticos e epigenéticos predisõem para o seu desenvolvimento, embora estes fatores ainda não tenham sido identificados (13, 46). Apesar de o tabagismo crônico ser a causa mais comum de DPOC, alguns pacientes, particularmente em países em desenvolvimento, desenvolvem a doença a partir da exposição a material da queima de biomassa ou outros irritantes inalados (46).

Ao contrário da asma, a inflamação na DPOC está predominantemente localizada nas vias aéreas periféricas e parênquima pulmonar e também está associada à inflamação sistêmica (1). A limitação do fluxo aéreo na DPOC é causada por processos patológicos como o remodelamento e estreitamento das vias aéreas inferiores, além da destruição do parênquima pulmonar, levando ao aprisionamento de ar (13, 22, 46). A hipersecreção de muco também pode contribuir para a obstrução das vias aéreas, uma vez que o muco ocupa tal região e tende a ser mantido por causa da disfunção ciliar (1). A inflamação na DPOC compreende, predominantemente, de células como macrófagos, neutrófilos e linfócitos T citotóxicos na parede e na luz das vias respiratórias inferiores. As células estruturais também estão envolvidas no desenvolvimento da doença (22). Geralmente, no processo de desenvolvimento da DPOC, as células epiteliais são ativadas diretamente por fumaça de cigarro ou outros irritantes inalados, resultando em produção e secreção de mediadores inflamatórios incluindo o TNF- α , IL-1 β e IL-6 que irão atuar na amplificação da resposta inflamatória e na liberação de quimiocinas que irão atrair leucócitos como monócitos e linfócitos para o pulmão (46).

Uma vez ativados, os macrófagos desempenham um papel chave na fisiopatologia da DPOC e podem orquestrar a resposta inflamatória crônica (46). O acúmulo de macrófagos em pacientes com DPOC pode ser explicado tanto pelo prolongamento do seu tempo de vida no

pulmão como pelo aumento do recrutamento de monócitos (seu precursor) da circulação, em resposta às quimiocinas (5, 47). Os macrófagos alveolares secretam enzimas elastolíticas, incluindo metaloproteinases da matriz (MMP)-2, MMP-9, MMP-12 e a catepsina K, L e S, destruindo o parênquima pulmonar e, em alguns casos, estimulando a secreção de muco por células caliciformes. Assim como as células epiteliais, os macrófagos também podem ser ativados pela fumaça de cigarro e secretar mediadores inflamatórios, incluindo as quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 que irão atuar no recrutamento de linfócitos T, CXCL1 e CXCL8, que irão recrutar neutrófilos e a CCL2 que irá recrutar monócitos para o tecido pulmonar (13, 45, 48). Em conjunto com os macrófagos, o aumento no número de neutrófilos é uma importante anormalidade encontrada em pacientes portadores de DPOC (47). Os neutrófilos secretam serinoproteases, incluindo elastases, catepsina G e proteinase-3, bem como a MMP-8 e MMP-9, o que contribui para a destruição alveolar (45). A neutrofilia nas vias aéreas também está associada à hipersecreção de muco, uma vez que a elastase de neutrófilo, catepsina G e proteinase-3 são potentes estimulantes de secreção de muco das glândulas mucosas e células caliciformes (22, 46). Uma síntese esquemática do processo de desenvolvimento da DPOC pode ser observada na Figura 1.2.

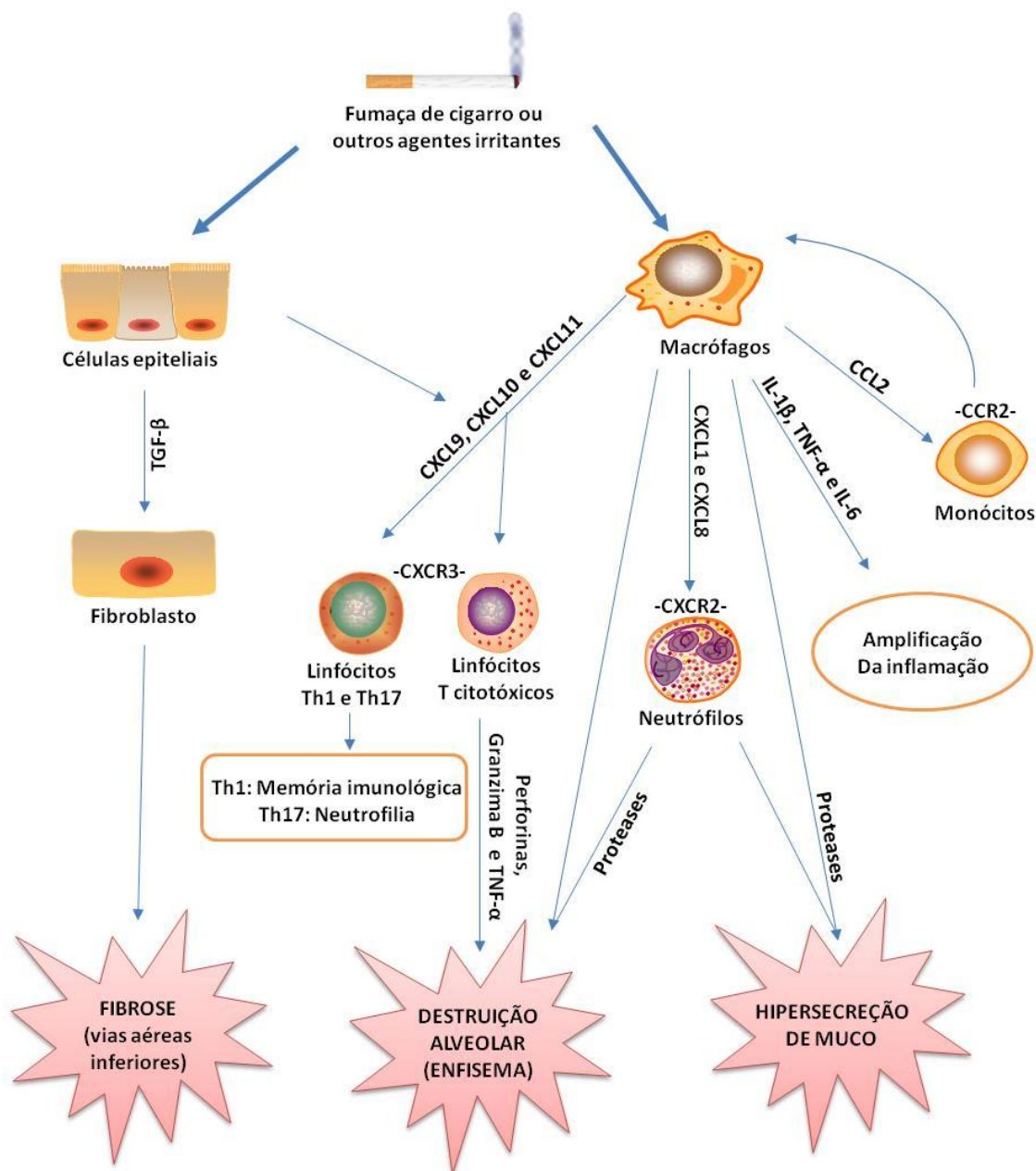


Figura 1.1 - Aspectos fisiopatológicos da DPOC. A inalação à fumaça de cigarro e outros agentes irritantes induzem em macrófagos a liberação de quimiocinas como CCL2, que atua no receptor CCR2 para atrair os monócitos; CXCL1 e CXCL8, que atuam sobre o CXCR2 para atrair neutrófilos e CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que atuam sobre o CXCR3 para atrair linfócitos Th1, Th17 e T citotóxicos para o pulmão. Neutrófilos e macrófagos liberam proteases, as quais em conjunto com a liberação de perforinas, granzima B e TNF- α de linfócitos T citotóxicos resultam em destruição alveolar e consequentemente enfisema. Proteases de macrófagos e neutrófilos também induzem a hipersecreção de muco em células caliciformes. Linfócitos Th1 atuam na resposta de memória imunológica, enquanto linfócitos Th17 atuam induzindo a inflamação neutrofílica. Células epiteliais ativadas liberam quimiocinas que recrutam linfócitos T, além de liberar TGF- β , estimulando a proliferação de fibroblastos, resultando em fibrose nas vias aéreas inferiores. Adaptado de Barnes 2008 (5).

1.1.3.3. SDRA

A SDRA é uma resposta inflamatória aguda e intensa dos pulmões que ocorre como resultado de um insulto direto ou indireto à membrana capilar alveolar, causando aumento da permeabilidade e posterior edema pulmonar intersticial e nos alvéolos (49). Tais danos resultam em anormalidades fisiológicas que caracterizam a doença, como por exemplo insuficiência respiratória hipóxica grave, redução da capacidade de troca de CO₂, redução dos volumes pulmonares, além da diminuição da complacência pulmonar (50). A SDRA geralmente ocorre em pessoas previamente saudáveis, após desenvolvimento de fatores de risco, tais como pneumonia, sepse, aspiração de conteúdo gástrico, trauma, pancreatite, lesão por inalação, queimaduras, choque não cardiogênico, overdose de drogas e afogamento (49). A maioria dos pacientes que sobrevivem à SDRA apresentam danos pulmonares mínimos, no entanto, uma outra parcela de pacientes pode desenvolver graus elevados de alterações pulmonares (51).

O aumento da permeabilidade capilar pulmonar, resultando na acumulação extravascular de fluido edemático rico em proteínas, é o mecanismo fisiopatológico central associado à SDRA (52, 53). Tal aumento é resultado de diversos fatores independentes, como lesões teciduais e destruição da arquitetura microvascular pulmonar, além da desregulação de um conjunto de moléculas inter e intracelulares associadas à permeabilidade endotelial e epitelial (52). As células epiteliais alveolares do tipo I e do tipo II se encontram danificadas na SDRA. O dano às células epiteliais alveolares de tipo I causa ruptura na integridade da barreira alveolar-capilar e permite que o líquido intersticial pulmonar, proteínas, neutrófilos, glóbulos vermelhos e fibroblastos passem para os alvéolos (54, 55). O dano às células do tipo II diminui a produção de surfactante, material indispensável para diminuir a tensão superficial alveolar, e o que neo-produzido é geralmente apresenta alterações na proporção, quantidade ou na qualidade dos fosfolipídios que o compõem, podendo causar a inativação da película tensoativa e, conseqüentemente, resultar em uma deficiência na remoção do fluido alveolar. Tais alterações levam ao quadro de colapso alveolar nos pacientes (54-57). O desajuste ventilação-perfusão, secundário ao colapso alveolar, diminui o número de alvéolos ventilados, o que por sua vez aumenta o espaço morto alveolar, levando à hipercapnia e à acidose respiratória. Além disso, a complacência pulmonar diminui e os pacientes começam a hiperventilar numa tentativa de compensar tais alterações (55). O sistema linfático pulmonar e canais de água epitelial desempenham papéis importantes no bombeamento de água fora do espaço extravascular. No entanto, quando o extravasamento vascular ultrapassa a capacidade desses sistemas compensadores, desenvolve-se o edema pulmonar clínico (52).

A resposta imune inata também desempenha um papel importante na fisiopatologia da SDRA (6). De fato, diversos processos imunológicos envolvendo macrófagos e, principalmente, neutrófilos participam na mediação da lesão tecidual relacionada à doença. Uma vez estimulados, os macrófagos alveolares recrutam neutrófilos e monócitos circulantes para os sítios pulmonares de lesão. Durante as fases inflamatória e/ou de resolução da SDRA, os macrófagos alveolares interagem de forma parácrina com outras células, incluindo células epiteliais, linfócitos e células-tronco mesenquimais, o que pode resultar no aumento da resposta inflamatória ou acentuação da lesão tecidual (6). O influxo de neutrófilos nos pulmões, em resposta aos macrófagos alveolares ativados está associado ao desenvolvimento da SDRA e pode influenciar diretamente a gravidade da doença (56). Diversas citocinas quimiotáticas, incluindo a IL-8, desempenham papel central na regulação do recrutamento de neutrófilos e consequente lesão tecidual e permeabilidade alvéolo-capilar (6). A migração maciça de neutrófilos ativados para os pulmões provoca a formação de grande desestruturação epitelial devido à separação de epitélios adjacentes nas junções do tipo oclusiva. Ademais, os neutrófilos liberam moléculas citotóxicas, incluindo enzimas granulares, metabólitos reativos de oxigênio, lipídios bioativos e citocinas. Essas ações, por sua vez, resultam em necrose, apoptose e autofagia de células do tecido pulmonar, levando à lesão tecidual e morte celular, que são características cruciais da SDRA (51, 52, 56). Embora a apoptose dos neutrófilos possa limitar o dano alveolar induzido pela infiltração de leucócitos, a morte das células epiteliais e endoteliais prejudica gravemente a função de barreira da parede alveolar, levando à inflamação e mais danos ao tecido circundante. Em conjunto, a inflamação presente no tecido pulmonar danificado pode resultar na síndrome de resposta inflamatória sistêmica, a qual pode progredir para falência de múltiplos órgãos, uma das principais causas de morte em pacientes com SDRA (55). Um resumo do processo fisiopatológico da SDRA pode ser observado na Figura 1.3.

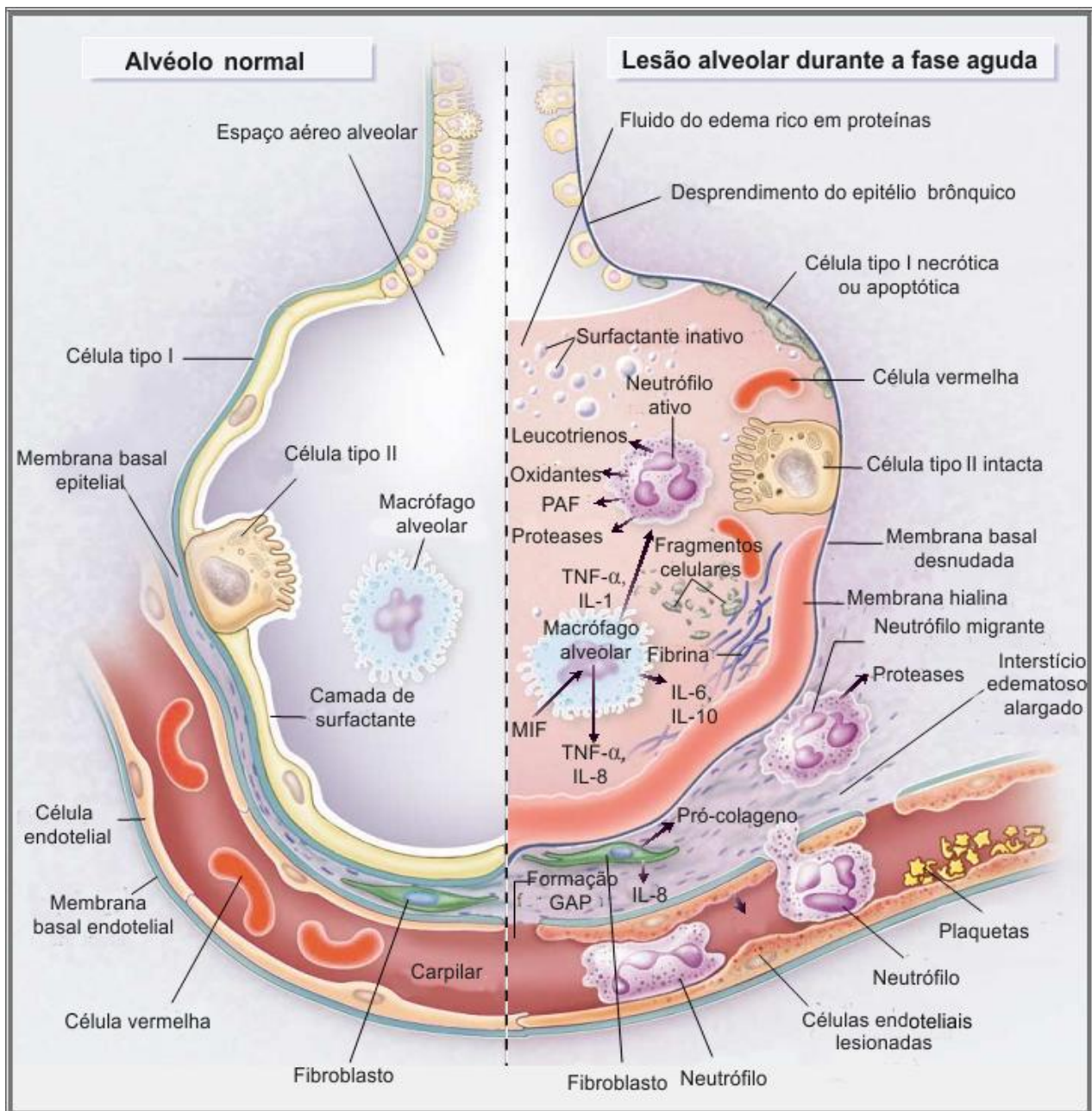


Figura 1.2 - Fisiopatologia da SDRA. Alvéolo normal (lado esquerdo) e alvéolo lesado na fase aguda da SDRA (lado direito). Durante o desenvolvimento da SDRA, ocorre o desprendimento de células epiteliais brônquicas e alveolares, com a formação de membranas hialinas, ricas em proteínas, na membrana basal desnudada. No espaço aéreo, macrófagos alveolares secretam citocinas (IL-1, 6, 8 e 10) e TNF- α os quais atuam localmente estimulando a quimiotaxia e ativando neutrófilos, além de estimular a produção de matriz extracelular por fibroblastos. Os neutrófilos aderem ao endotélio capilar lesado e atravessam o interstício para o espaço aéreo, que está preenchido com fluido de edema rico em proteínas. Os neutrófilos liberam oxidantes, proteases, leucotrienos, e outras moléculas pró-inflamatórias, levando ao dano alveolar. Além disso, o influxo de líquido de edema rico em proteínas no alvéolo leva à inativação do surfactante e, conseqüentemente, a remoção deficiente do edema. Adaptado de Ware e colaboradores, 2000 (6).

1.1.4. Modelos experimentais

Doenças inflamatória pulmonares como a asma, a DPOC e a SDRA apresentam fisiopatologia de grande complexidade. Nesse sentido, é importante o desenvolvimento de estudos com modelos experimentais animais capazes de mimetizar as características dessas doenças, visando a identificação dos mecanismos celulares e moleculares associados a esses distúrbios e a investigação de intervenções terapêuticas (58, 59). Além de seu tamanho, camundongos apresentam vantagens como facilidade de manuseio, rápida reprodução, sua criação de forma a reduzir a variação biológica, além de serem acessíveis e fáceis de criar e manter, sendo, portanto uma boa escolha para utilização em estudos experimentais envolvendo doenças (60). Idealmente, os modelos experimentais devem basear-se na etiologia da doença e refletir o seu quadro clínico (61). O lipopolissacarídeo (LPS), geralmente oriundo da cepa *Escherichia coli*, é um constituinte chave das paredes de células bacterianas gram-negativas muito utilizado como agente indutor de resposta inflamatória em diferentes modelos murinos de inflamação pulmonar (61, 62). Modelos experimentais utilizando LPS se destacam por serem rápidos, reprodutíveis e confiáveis para triagem e otimização de fármacos, definição dos efeitos dependentes da dose, janela terapêutica e efeitos biológicos de novas drogas (63).

A exposição de camundongos ao LPS resulta em características importantes de lesão pulmonar presente na SDRA, incluindo acúmulo de leucócitos no pulmão, principalmente neutrófilos, edema intersticial e alveolar, lesão das células epiteliais e aumento precoce da fibra colágena (58, 63). Além disso, é descrito na literatura que o LPS é um dos constituintes chaves do cigarro, com estudos demonstrando que tabagistas inalam níveis elevados de tal endotoxina (64). Uma vez que o tabagismo é o principal fator de risco associado ao desenvolvimento da DPOC, a instilação com LPS também é útil em modelos experimentais agudos da doença, induzindo alterações características da DPOC humana, como inflamação pulmonar neutrofílica, hipersecreção de muco e hiper-reatividade das vias aéreas, bem como alterações estruturais no pulmão (65, 66). Em modelos experimentais de asma, a utilização de alérgenos, como ovoalbumina, caracterizada por induzir infiltração eosinofílica e linfocítica no pulmão, além de remodelamento e AHR é mais comum. No entanto, a adição de LPS como um adjuvante neste modelo é capaz de promover o influxo de neutrófilos nas vias aéreas, caracterizando casos graves da doença de difícil tratamento e maior relevância clínica (59, 67). Portanto, modelos de inflamação pulmonar induzida por LPS são excelentes ferramentas aplicáveis para estudar mecanismos moleculares e terapias potenciais para doenças como a asma grave, a SDRA e a DPOC.

1.1.5. Terapias farmacológicas

Os fármacos utilizados para o tratamento das doenças inflamatórias pulmonares incluem broncodilatadores, que atuam inibindo a contração do músculo liso das vias respiratórias, e os fármacos anti-inflamatórios, os quais suprimem a inflamação pulmonar. Agonistas β_2 adrenérgicos são exemplos de broncodilatadores eficazes no tratamento da asma (16). Sua ação baseia-se principalmente na ligação aos receptores β_2 adrenérgicos acoplados à enzima adenilato ciclase, através da proteína G estimulatória. Essa ligação resulta na ativação da proteína cinase A (PKA), capaz de fosforilar a cadeia leve da miosina nas células musculares lisas das vias aéreas, promovendo assim o relaxamento dessas células (68). Em indivíduos portadores de DPOC, os agonistas β_2 adrenérgicos de ação prolongada são utilizados, sozinhos ou em combinação com outros agentes broncodilatadores, visando minimizar o sofrimento dos pacientes, através da melhora da função pulmonar, redução do aprisionamento de ar e redução das exacerbações (69). No que se refere à SDRA, os agonistas β_2 aerossolizados têm sido utilizados durante a ventilação para estimular a bomba de sódio e acelerar a remoção de fluido edemático exsudativo rico em proteínas presente nos espaços aéreos do pulmão desses pacientes (2, 70). No entanto, apesar dos efeitos benéficos, o uso prolongado de agonistas β_2 pode levar, em alguns casos, em perda de seus efeitos, ou no pior dos casos, pode induzir aumento da frequência cardíaca, palpitações e taquicardia (71). Além disso, os agentes broncodilatadores devem ser utilizados em combinação com agentes anti-inflamatórios, uma vez que não agem de forma eficaz na inflamação, componente crucial na fisiopatologia das doenças inflamatórias pulmonares (72, 73).

A terapia anti-inflamatória padrão no tratamento da asma consiste no uso de glicocorticoides. Os glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) são hormônios esteroides envolvidos em várias funções fisiológicas e no controle da inflamação. A partir de sua descoberta, os glicocorticoides são considerados os fármacos anti-inflamatórios mais eficazes existentes atualmente, sendo os glicocorticoides sintéticos uma das classes de medicamentos mais amplamente prescritas em todo o mundo (74, 75). Os glicocorticoides atuam através do receptor de glicocorticoides $GR\alpha$, modulando a transcrição gênica, embora mecanismos não genômicos também sejam relatados. No citoplasma, após a ligação com glicocorticoide, o $GR\alpha$ sofre uma mudança conformacional, promovendo a sua translocação nuclear. Uma vez no núcleo, homodímeros de $GR\alpha$ podem iniciar a transativação de genes após se ligar a elementos de resposta a glicocorticoides (GRE), resultando no aumento da transcrição de proteínas anti-inflamatórias. Além disso, o $GR\alpha$ pode transreprimir a atividade de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (75-77). No entanto, parte dos asmáticos é

resistente ao tratamento com glicocorticoides mesmo recebendo doses elevadas desses agentes, levando ao aumento dos índices de mortalidade associados à doença (78, 79). Ademais, o uso prolongado ou em altas doses de corticosteroides geralmente está associado a efeitos colaterais como síndrome de Cushing, supressão do eixo hipotálamo-hipófise adrenal, diabetes, perda de massa muscular e osteoporose (80, 81). Nos casos de SDRA, os dados da literatura são conflitantes em relação ao uso desses agentes anti-inflamatórios. Estudos realizados na fase inicial da SDRA demonstram que a utilização de metilprednisolona resultou na diminuição da taxa de mortalidade em pacientes com SDRA internados na UTI (82). Enquanto que em um grande estudo multicêntrico, foi observado que o tratamento com metilprednisolona não foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade dos pacientes. Além disso, foi observado nesse estudo que a terapia com metilprednisolona, se iniciada com mais de duas semanas após o início da SDRA, pode aumentar o risco de morte (83). De forma semelhante ao que ocorre na SDRA, o uso de corticosteroides é em grande parte ineficaz no tratamento da DPOC. Uma alternativa a esses pacientes é a utilização de agentes inibidores de fosfodiesterase tipo 4 (PDE4). A PDE4 é uma enzima presente em diversas células, responsável por catalisar a degradação de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) em 5'-AMP inativo (84). Ao inibir a hidrólise de cAMP e elevar o seu nível intracelular, os inibidores de PDE4 suprimem uma série de respostas inflamatórias na maioria das células imunes (85). O roflumilast é um dos inibidores da PDE4 introduzido como terapia anti-inflamatória da DPOC, mas a sua eficácia é limitada por seus efeitos adversos que incluem náusea, perda de apetite, dor abdominal, diarreia, distúrbios do sono e dor de cabeça (22, 86, 87).

Em conjunto, os problemas encontrados pelas intervenções farmacológicas no controle das alterações patológicas em pacientes portadores de doenças inflamatórias pulmonares justificam a busca por alternativas terapêuticas que possam ser mais eficientes no tratamento desses distúrbios.

1.2. ANESTÉSICOS LOCAIS NA TERAPIA CONTRA DOENÇAS INFLAMATÓRIAS PULMONARES

1.2.1. Lidocaína

Os anestésicos locais têm um nicho de aplicação clínica bem estabelecido na medicina. Eles interferem de modo reversível na excitação e na propagação dos potenciais de ação no sistema nervoso e coração, através do bloqueio dos canais de sódio regulados por voltagem, sendo amplamente utilizados como agentes anestésicos, bem como no tratamento de arritmias cardíacas (88, 89). Diversos estudos demonstram que os anestésicos locais

possuem também efeitos que vão além da sua reconhecida ação anestésica, como por exemplo, atividade neuroprotetora (90), antibacteriana (91), antitumoral (92) e anti-inflamatória (93).

Descoberta nos anos 50, a lidocaína, anestésico local do tipo amino-amida (Figura 1.4), é ainda hoje amplamente utilizada em procedimentos cirúrgicos devido à rápida e segura ação anestésica (94, 95). Vale notar que sua atividade não se restringe ao bloqueio dos canais de sódio em células excitáveis. Por exemplo, seu reconhecido efeito supressor sobre receptores acoplados a proteína G é uma área de investigação atraente, sobretudo porque a maioria dos mediadores envolvidos no processo inflamatório sinaliza através de receptores desta classe (96). A lidocaína pode interferir ainda com canais outros que os de sódio, a exemplo dos canais de potássio dependentes de ATP (97), além dos iônicos ativados quimicamente, como os receptores nicotínicos pós-sinápticos (98). É interessante notar que alguns dos efeitos farmacológicos da lidocaína ocorrem em concentrações muito mais baixas do que as necessárias para o bloqueio do canal de sódio. Enquanto a concentração de lidocaína capaz de induzir 50% do efeito máximo (IC_{50}) no canal neuronal de sódio é de aproximadamente 50-100 μ M (99), concentrações muito menores de lidocaína ($IC_{50} = 20$ nM) são suficientes para inibir a sinalização através dos receptores muscarínicos M1 (100). Além disso, estudos demonstram que os efeitos anti-inflamatórios da lidocaína não são reproduzidos por outros bloqueadores de canais de sódio, dando suporte a interpretação de que mecanismos alternativos devem contribuir para as ações anti-inflamatórias desse composto (101).

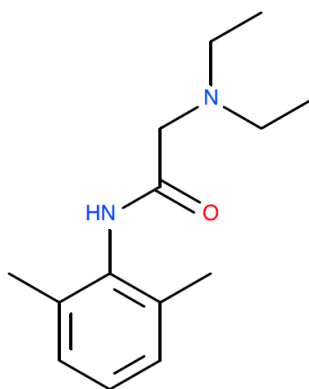


Figura 1.4 - Estrutura química da Lidocaína.

Diversos estudos demonstram que a lidocaína é capaz de inibir a migração, ativação e fagocitose de neutrófilos *in vitro* (102-104). Uma vez que os neutrófilos são células cruciais no desenvolvimento e na progressão de doenças como a asma grave, a DPOC e a SDRA, ensaios pré-clínicos investigaram o papel da lidocaína em modelos de doença com este perfil

inflamatório. Nishina e colaboradores avaliaram o efeito do tratamento intravenoso com lidocaína sobre a lesão pulmonar aguda em coelhos. Eles observaram que o tratamento resultou na diminuição do infiltrado de neutrófilos no pulmão após estimulação inflamatória. Além disso, os autores observaram marcada inibição da resposta pró-oxidante, indicando redução da geração de radicais livres, com subsequente redução do dano endotelial e edema pulmonar (105). De maneira semelhante, Mikawa e colaboradores demonstraram que o tratamento com lidocaína resultou na diminuição do acúmulo de neutrófilos na lesão pulmonar induzida por endotoxina em coelhos (106).

Dentre outros fatores, o influxo de células inflamatórias no tecido pulmonar está diretamente relacionado ao aumento da produção e secreção de mediadores pró-inflamatórios (6). Estudos relatam que a pré-incubação *in vitro* com lidocaína (2-20 mM) inibe substancialmente a liberação de leucotrieno B₄, um potente fator quimiotático para neutrófilos, por monócitos humanos estimulados com zimosan. Nesse mesmo estudo, foi mostrado que a pré-incubação com lidocaína resultou em diminuição nos níveis de IL-1 β no sobrenadante de células mononucleares estimuladas com LPS, citocina esta muito importante na ativação da fagocitose, quimiotaxia e desgranulação de neutrófilos (107). Estudos *in vivo* confirmaram o efeito da lidocaína na redução de mediadores inflamatórios como a IL-1 β e TNF- α no tecido pulmonar em condições de hiperoxia (108). Ademais, estudo utilizando o modelo de lesão pulmonar aguda induzida por ventilação mecânica, em camundongos, demonstrou que lidocaína administrada por via intravenosa é capaz de aumentar os níveis plasmáticos e pulmonares de IL-10, citocina com reconhecida atividade anti-inflamatória (109).

Em conjunto, esses estudos sugerem que a lidocaína poderia ser uma alternativa terapêutica em pacientes com alterações inflamatórias pulmonares. De fato, evidências clínicas apontam a capacidade da lidocaína inalada de minimizar os sintomas da asma moderada e grave, e de diminuir a necessidade de glicocorticoides em pacientes dependentes desse tratamento (110-114). De fato, um estudo publicado por Saito e colaboradores demonstrou que a lidocaína foi capaz de tratar de forma efetiva uma paciente asmática grávida, que se mostrava refratária a terapias convencionais, incluindo o tratamento com glicocorticoide sistêmico, agonistas β ₂ adrenérgicos e antagonistas colinérgicos (115). Contudo, o uso clínico sistemático de lidocaína na asma é controverso, visto que diversos estudos indicam que a anestesia das vias respiratórias pulmonares pode acarretar em irritação das vias aéreas e redução de fluxo de ar sobretudo nos asmáticos (116-120).

1.2.2. Análogos não anestésicos da lidocaína

Devido aos efeitos adversos da administração de lidocaína nebulizada em asmáticos, e a forte correlação existente entre tais efeitos e a ação de bloqueio de canais de sódio, levantou-se a possibilidade de que a atividade anestésica da lidocaína não seria relevante para a sua atividade antiasmática. Dessa forma, em tese, se poderia desenvolver análogos não anestésicos da lidocaína com atividade anti-inflamatória preservada ou até melhorada. Nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o Departamento de Síntese Orgânica de Farmaguinhos, sintetizou e avaliou a atividade anti-inflamatória e espasmolítica de análogos estruturais da lidocaína, possibilitando a identificação de análogos com limitada atividade anestésica local e propriedades anti-inflamatórias otimizadas, que foram avaliados farmacologicamente em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Dentre as moléculas selecionadas, destacaram-se o JMF2-1 e JM25-1 por apresentarem reduzida atividade sobre correntes de sódio em células excitáveis, preservando a atividade anti-inflamatória e relaxante da musculatura lisa das vias aéreas (121-123). Estudos subsequentes indicaram que a nebulização de JMF2-1 promoveu a redução de células inflamatórias no pulmão, a inibição da hiper-reatividade das vias aéreas e dos níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias em camundongos provocados com alérgeno, num mecanismo associado à inibição da proliferação e sobrevivência de linfócitos T (124). De maneira semelhante, foi observado que o tratamento com JM25-1 nebulizado também inibiu significativamente inflamação e remodelamento pulmonar, produção exacerbada de muco e hiper-reatividade na asma experimental em camundongos. Tais efeitos estão associados à indução de apoptose de eosinófilos e linfócitos Th2, além de diminuição da expressão de GATA-3 e p38 MAPK. Além disso, foi observado que esses análogos não anestésicos induzem significativo aumento nos níveis intracelulares de AMPc em células musculares lisas e inibem canais de cálcio dependentes de voltagem, resultando no bloqueio da contração de músculo liso respiratório induzida por agentes espasmogênicos (125). Esses achados resultaram em patentes concedidas por diferentes países, incluindo Estados Unidos, Japão, Índia e China. Entretanto, apesar dos achados serem de potencial interesse farmacológico e clínico, o avanço dessas moléculas na cadeia de desenvolvimento de medicamentos esbarrou na falta de originalidade estrutural das moléculas estudadas, o que fortemente inibe as chances de investimento e sucesso industrial no campo de novos fármacos e medicamentos.

1.2.3. Análogos não anestésicos da mexiletina

Visando a obtenção de análogos estruturalmente inéditos e ativos por via oral, o grupo investiu no desenvolvimento de uma segunda geração de moléculas. Neste caso, o protótipo foi o anestésico local mexiletina [1-(2,6-dimetilfenoxi)-2-propanoamina] (Figura 1.5), que ao contrário da lidocaína é ativa clinicamente por via oral. A mexiletina é um medicamento utilizado no tratamento de arritmias ventriculares graves e dor neuropática, efeitos estes decorrentes da inibição da propagação do potencial de ação na rede de Purkinje, via bloqueio dos canais rápidos de sódio (126, 127). De maneira interessante, estudos prévios demonstraram que o tratamento por via oral com mexiletina bloqueou o reflexo de broncoconstrição induzida por histamina em asmáticos (128, 129). Na busca de novas moléculas, o grupo utilizou o “know-how” desenvolvido no estudo anterior para modificar a estrutura do protótipo mexiletina, visando, essencialmente, suprimir a atividade anestésica, sabidamente associada a efeitos adversos, e potencializar a atividade anti-inflamatória e espasmolítica.

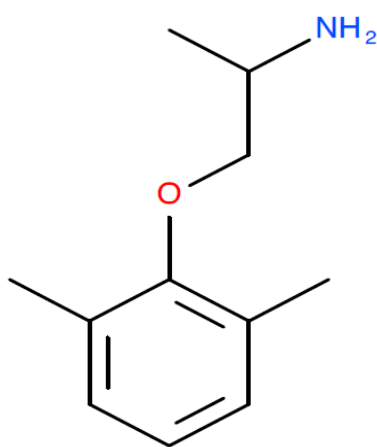


Figura 1.5 - Estrutura química da Mexiletina.

Em colaboração com a equipe de pesquisadores do Departamento de Síntese Orgânica de Farmanguinhos, foram planejados e sintetizados mais de 60 compostos, que puderam então ser submetidos à avaliação de toxicidade pré-clínica por pesquisadores do Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), através de modelos preditivos baseados

em estrutura, como os ensaios de simulação computacional *in silico*, e triagem farmacológica em estudos *in vitro* e *in vivo*. A tabela 1.1 mostra a predição *in silico* da toxicidade e propriedades físico-químicas do protótipo e das moléculas efetivamente inéditas, utilizando ferramentas do servidor *OSIRIS Property Explorer* (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). Das 16 moléculas pré-selecionadas, a mexiletina apresentou um perfil de toxicidade moderadamente aceitável. O respectivo valor de *drug score* (DS), que é um indicativo estatístico para que uma molécula tenha "características" de um bom fármaco, avaliado a partir de fatores como toxicidade, solubilidade e lipofilicidade, é de 0,31. Note-se que, do ponto de vista teórico, o valor "ideal" para este índice deve ser igual ou superior a 0,5. Os compostos JME-209-2, JME-209-5, JME-209-7 e JME-209-8 mostraram-se muito tóxicos na avaliação *in silico*, justificando seus baixos valores de DS. Já as moléculas JME-141, JME-173 e JME-207 foram mais promissoras nessa abordagem, com valores de DS relativamente mais promissores, variando de 0,43 a 0,66. Para estas moléculas, os estudos *in silico* não apontaram riscos associados ao sistema reprodutor, irritação tecidual, mutagenicidade e tumores, enquanto que houve indicativos de potencial irritativo e de efeitos adversos associados ao sistema reprodutor (Tabela 1.1).

Molécula	Mutagênico	Tumorigênico	Irritante	Efeito no sistema reprodutor	logP	logS	PM	PSA	Druglikeness	Drug score
Mexiletina	não	não	sim	moderado	1.72	-2.57	179	35.25	-0.44	0,31
JME-170	não	não	não	não	1.98	-2.96	199	35.25	-3.02	0,48
JME-173	não	não	não	não	2.44	-3.4	257	35.25	-4.56	0,43
JME-141	não	não	não	não	1.47	-2.9	277	35.25	-0.68	0,60
JME-188	não	não	não	não	1.74	-2.93	203	35.25	-3.23	0,47
JME-207	não	não	não	não	1.47	-2.9	277	32.25	-0.14	0,66
JME-208	não	não	não	não	2.61	-3.04	207	35.25	-2.81	0,47
JME-209	não	não	não	não	2.69	-3.97	227	35.25	0.18	0,63
JME-209-1	não	não	não	não	2.62	-3.99	257	44.48	-3.89	0,41
JME-209-2	sim	sim	moderado	sim	2.09	-4.6	274	78.95	-5.86	0,08
JME-209-3	não	não	não	não	2.79	-4.28	245	35.25	-4.69	0,39
JME-209-4	não	não	não	não	3.42	-4.8	305	35.25	-5.87	0,34
JME-209-5	sim	sim	não	não	2.01	-4.04	242	61.27	-3.69	0,15
JME-209-6	não	não	não	não	2.34	-3.67	243	55.48	-3.6	0,43
JME-209-7	sim	sim	não	não	2.39	-4.31	284	64.35	-3.17	0,15
JME-209-8	não	não	não	sim	2.68	-4.27	285	61.55	-2.99	0,24

Tabela 1.1 - Toxidez e propriedades físico-químicas *in silico*. Dados obtidos através das ferramentas do servidor *OSIRIS Property Explorer* (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

Com a finalidade de selecionar os candidatos mais promissores no tratamento de doenças pulmonares, os análogos passaram por triagem através de ensaios *in vitro* e *in vivo* baseados em critérios como atividade anestésica e atividade antiespasmódica. Mais precisamente, a triagem foi embasada nas seguintes propriedades dos compostos da série e da própria mexiletina: (i) potência de bloqueio de canais de sódio, com base na técnica de *patch*

clamp; (ii) potência e eficácia de inibição da contração do músculo liso respiratório, através de sistema de contração colinérgica de anéis isolados de traqueia de rato; (iii) atividade de relaxamento sobre o broncoespasmo induzido por aerossol de metacolina em camundongos hígidos; e (iv) efeito protetor sobre a desgranulação mastocitária, através da quantificação da enzima β -hexosaminidase (β -hex) em células RBL-2H3. Com base nestes critérios, foi possível selecionar o composto JME-173 (Figura 1.6), como candidato promissor na terapia contra distúrbios inflamatórios pulmonares.

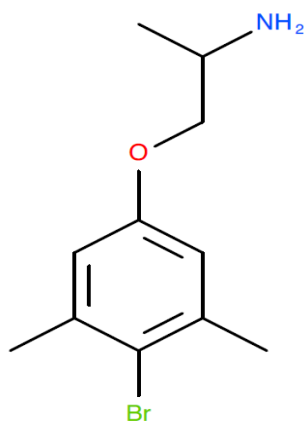


Figura 1.6 - Estrutura química do JME-173.

Visando avaliar o efeito anti-inflamatório e de relaxamento das vias aéreas do JME-173 em condições experimentais de doenças pulmonares, animais exposto a diferentes agentes inflamatórios, como a ovoalbumina e o LPS, foram tratados com o composto. De maneira semelhante ao observado com os análogos da lidocaína, o tratamento com JME-173 aerosolizado reduziu de maneira significativa parâmetros inflamatórios e de AHR nos diferentes modelos murinos de inflamação pulmonar. No entanto, quando veiculado oralmente, o composto mostrou-se pouco potente em inibir alterações cruciais como infiltrado inflamatório eosinofílico e hiperresponsividade brônquica (130). Considerando-se que, sob administração tópica, o JME-173 foi capaz de inibir alterações patológicas associadas à inflamação pulmonar, decidiu-se investir no desenvolvimento de uma formulação de JME-173 que melhorasse a sua biodisponibilidade por via oral, tendo em vista a maior adesão dos pacientes à terapia por essa via, devido a fatores como praticidade e facilidade de administração (131). Neste cenário, a nanotecnologia torna-se uma ferramenta importante e de grande potencialidade no melhoramento de parâmetros de biodistribuição e biodisponibilidade.

1.3. NANOTECNOLOGIA

1.3.1. Aspectos gerais

A nanotecnologia pode ser definida como a compreensão, controle e manipulação da matéria em nanoescala, tornando possível a criação de materiais em tamanho nanométrico com propriedades e funções fundamentalmente novas (2, 132). Tal tecnologia apresenta uma ampla gama de aplicações, oferecendo soluções inovadoras para diversas disciplinas científicas. A utilização da nanotecnologia reflete em grande impacto nas economias mundiais, pois suas aplicações podem ser encontradas em quase todos os domínios da atividade industrial. Os países industrializados lideram os índices de utilização de nanotecnologias, com diversas realizações mais próximas da comercialização ou já disponíveis no mercado global, como purificação de água, otimização de culturas agrícolas, ou ainda produção e armazenamento de energia (133, 134). Além de seu emprego multidisciplinar, aplicações na área médica como diagnóstico e tratamento de doenças também são áreas-alvo para o uso de nanotecnologias (134, 135).

Durante as últimas décadas, a aplicação biomédica de nanomateriais foi amplamente investigada devido às suas propriedades físico-químicas únicas. Isso inclui o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, tais como nanobiossensores e modalidades de imagem mais precisas, além de novas terapêuticas baseadas em sistemas de administração de fármacos direcionados a células/tecidos alvo (134, 135). Essa tecnologia em associação à área médica é uma possibilidade inovadora com potencial de expandir o mercado de várias drogas e se tornar um nicho altamente lucrativo dentro do setor industrial (136).

1.3.2. Sistemas nanocarreadores

As aplicações clínicas de terapias atuais são limitadas. Em geral, os fármacos enfrentam diversas barreiras durante o percurso desde o local de administração até o sítio molecular de ação. Dentre tais barreiras, destacam-se a rápida filtração pelo sistema renal, metabolismo de primeira passagem, remoção prematura através do sistema mononuclear fagocitário e transporte tortuoso da corrente sanguínea para as células alvo nos tecidos. Uma vez no tecido, os fármacos que apresentam alvo intracelular precisam ultrapassar membranas seletivamente permeáveis. Dentro da célula, ele ainda deve escapar do ambiente ácido dos endossomos, os quais podem inativar ou degradar drogas biomoleculares. Nos casos de fármacos com ação nuclear e fármacos que atuam a nível de sistema nervoso central, estes devem superar também a barreira da membrana nuclear e a barreira hematoencefálica, respectivamente (137, 138). Além disso, a baixa solubilidade e a estabilidade deficiente de

vários fármacos no meio biológico representam desafios altamente complexos (137). Nesse cenário, a utilização de nanocarreados visando à entrega de fármacos se torna um caminho particularmente promissor para superar tais barreiras de maneira eficaz (138).

As investigações de sistemas carreadores de fármaco se originaram desde o momento em que os cientistas descobriram que a membrana celular consiste em uma bicamada lipídica e, como tal, a maiorias dos compostos não polares atravessam facilmente esta barreira para o interior da célula. Nesse sentido, Bangham cunhou o termo "lipossomas" para descrever a autoformação de veículos lipídicos capazes de encapsular compostos para o transporte celular (139, 140). Ao mimetizar a bicamada lipídica, estes veículos, juntamente com o seu conteúdo, poderiam transcender a membrana celular, estruturalmente semelhante, e entrar na célula. Speiser e colaboradores estudaram, na mesma década, o desenvolvimento de sistemas de entrega miniaturizados, investigando no caso, esferas de ácido poliacrílico para administração oral (141, 142). Desde tais estudos, os protocolos de administração de fármacos evoluíram significativamente no aspecto de sistemas de liberação de compostos nanoformulados. Atualmente, diversos sistemas terapêuticos baseados em nanomateriais estão sendo investigados em estágios experimentais (*in vitro* e *in vivo*) e em ensaios clínicos ou estão comercialmente disponíveis para os pacientes (80, 81, 83, 143).

De um modo geral, nanopartículas utilizadas em diversas áreas, como engenharia e física, apresentam um diâmetro médio tipicamente compreendido entre 10 e 100 nm (144). No entanto, na área farmacêutica, os nanocarreadores envolvem diferentes tipos de materiais com diâmetro variando entre 1 a 1000 nanômetros (nm), mas geralmente se encontram na faixa de 100 nm (145). A efeito de comparação de tamanho, a pupila humana tem um diâmetro que varia de 4-9 mm, sendo cerca de 1 milhão de vezes maior que as nanopartículas usadas como carreadores de fármaco (Figura 1.7). O limite superior de diâmetro dos nanocarreadores é ditado pela sua capacidade de atravessar barreiras físicas do organismo, enquanto o limite inferior é fixado pelo limiar para a eliminação pelos rins. Além disso, tais dimensões permitem uma área superficial aumentada e boa biodistribuição de longa circulação, dentre outras vantagens (146, 147).

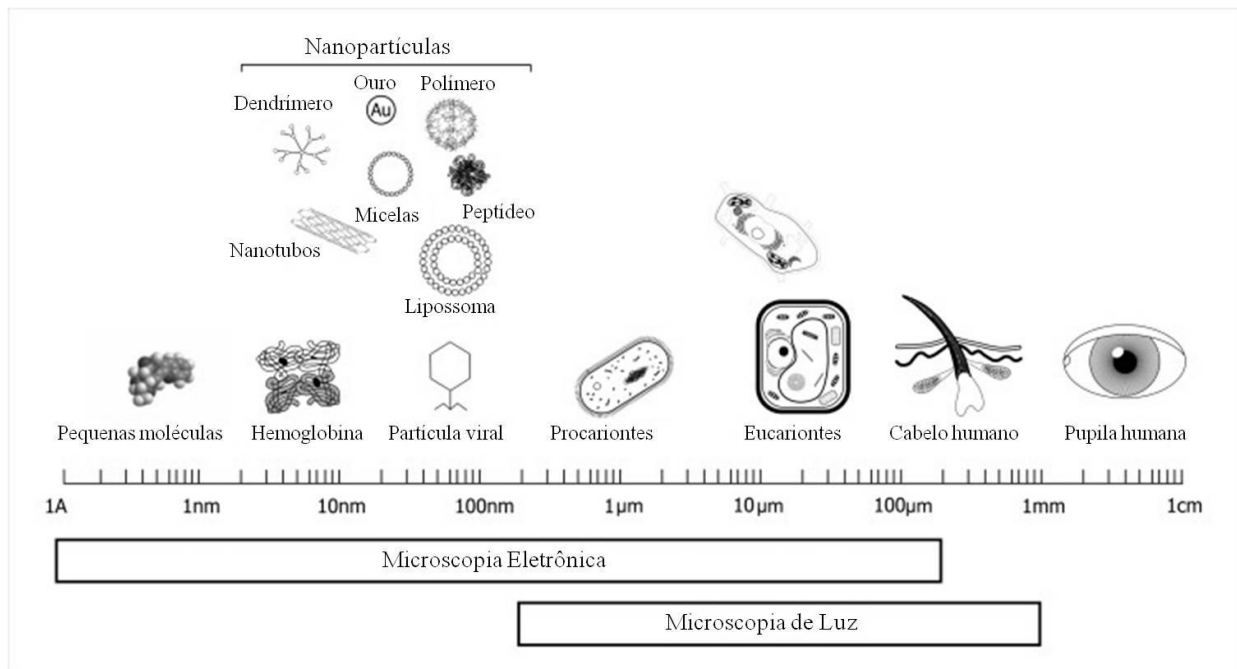


Figura 1.7 - Tamanhos relativos de nanopartículas em comparação com estruturas biológicas comuns e sua escala de comprimento associada. Exemplo de nanopartículas, com cerca de 100 nm e comparação de seu tamanho com estruturas como pequenas moléculas, hemoglobina, partículas virais, células procariontes ou eucariontes, cabelo e pupila humana. Adaptado de Ediriwickrema e colaboradores, 2015 (143).

Em comparação com formulações tradicionais, a utilização de nanocarreadores para administração de fármacos possibilita diversas vantagens terapêuticas. Dentre elas, pode-se citar a administração mais eficiente de fármacos pouco solúveis em água aumentando assim a sua biodisponibilidade nos sistemas biológicos (137, 146). A utilização de nanocarreadores pode também mediar a liberação controlada de fármacos que não só prolongam a ação como mantém seus níveis dentro da janela terapêutica, evitando picos potencialmente perigosos na sua concentração após a administração. Isto permite a redução das doses de administração do fármaco favorecendo, conseqüentemente, a diminuição dos riscos de efeitos adversos (137, 145). Os nanoveículos também podem aumentar a proteção do fármaco quando expostos a ambientes hostis (por exemplo, pH ácido no trato digestivo) (146). Além disso, podem proporcionar vias para fornecimento de dois ou mais fármacos, ou ainda sistemas para aplicações terapêuticas e de diagnóstico simultâneas, conferindo cumulativamente várias vantagens como efeitos sinérgicos ou supressão da resistência a fármacos (137). Outra característica única da liberação de fármacos com base em nanomateriais é a sua capacidade de atingir a distribuição direcionada do princípio ativo em células ou tecidos de maneira específica. Basicamente, devido ao seu tamanho em miniatura, apresentam vantajosa mobilidade biológica, podendo penetrar eficientemente através de pequenos capilares para

tumores e tecidos inflamados e acumular no local alvo, conduzindo à redução dos efeitos secundários indesejados e, em paralelo, aumentando a sua eficácia terapêutica (137, 145).

Tais vantagens estão associadas às propriedades físico-químicas das nanopartículas como tamanho, forma, composição química, estrutura superficial, carga, agregação e solubilidade, as quais influenciam em suas interações com biomoléculas e células (137). Além disso, outras estratégias podem ser utilizadas visando maximizar a entrega de fármacos administrados sistemicamente, como por exemplo estratégias de direcionamento passivo ou ativo ao alvo. A vetorização passiva é realizada através da alteração das características físico-químicas como pH ou hidrofobicidade da nanopartículas e, em casos de doenças inflamatórias, baseia-se na combinação de duas características dos tecidos inflamados: alta permeabilidade e retenção aprimorada, no que se denomina “efeito retenção e permeação aumentados”. A permeabilidade aumentada, observada na vasculatura de tecidos inflamados, é resultado de angiogênese desregulada e / ou aumento da expressão e ativação de fatores de permeabilidade vascular. Adicionalmente, há uma drenagem deficiente, resultando na retenção das nanopartículas dentro dos tecidos que apresentam o quadro inflamatório (148, 149). A vetorização ativa, diferentemente, usa biomarcadores (por exemplo, genes mutantes, RNAs, proteínas, lipídeos, carboidratos e pequenas moléculas de metabólitos) para atingir os locais alvo (146).

O primeiro nanocarreador introduzido no mercado foi uma formulação de doxorubicina lipossomal, em 1995. O estudo de Northfelt observou pacientes com sarcoma de Kaposi tratados com uma dose única de doxorubicina encapsulada em lipossomas contendo polietilenoglicol ligado à superfície. De forma interessante, a encapsulação aumentou, de maneira significativa, a acumulação do fármaco nas lesões, mantendo os níveis em até 72 horas após a administração, ao contrário do que o observado com a doxorubicina não encapsulada (150). Com o rápido progresso nesta área, novas formulações de nanocarreadores contendo agentes terapêuticos estão entrando em investigação clínica a cada ano (151). Diversos materiais e estruturas, foram estudados como nanocarreadores e, atualmente, podem ser classificados em nanotransportadores orgânicos ou inorgânicos (Figura 1.8) (152, 153). A nanomedicina inorgânica refere-se à síntese de nanocarreadores, como aqueles contendo materiais metálicos e semimetálicos, como por exemplo, partículas de ouro. Tais carreadores são uma alternativa para a entrega de fármacos devido às suas propriedades versáteis, sendo possível a liberação direcionada de fármacos com possibilidades de imagem (154). No entanto, os materiais orgânicos são mais versáteis, e suas propriedades podem ser finamente ajustadas, adaptando sua composição química, tamanho, forma, estrutura,

morfologia e propriedades de superfície (146). Tais nanomateriais estão, na maior parte, disponíveis naturalmente ou podem ser sinteticamente planejados para propósitos biomédicos. Uma vasta gama de nanocarreadores, como as nanopartículas lipídicas, estão disponíveis para a vetorização de drogas e/ou fármacos (154). Contudo, a utilização de polímeros fornece ainda mais versatilidade na engenharia de nanocarreadores orgânicos, sendo as nanocápsulas poliméricas, um dos numerosos exemplos de nanotransportador extremamente úteis como reservatório para a droga carregada (146).

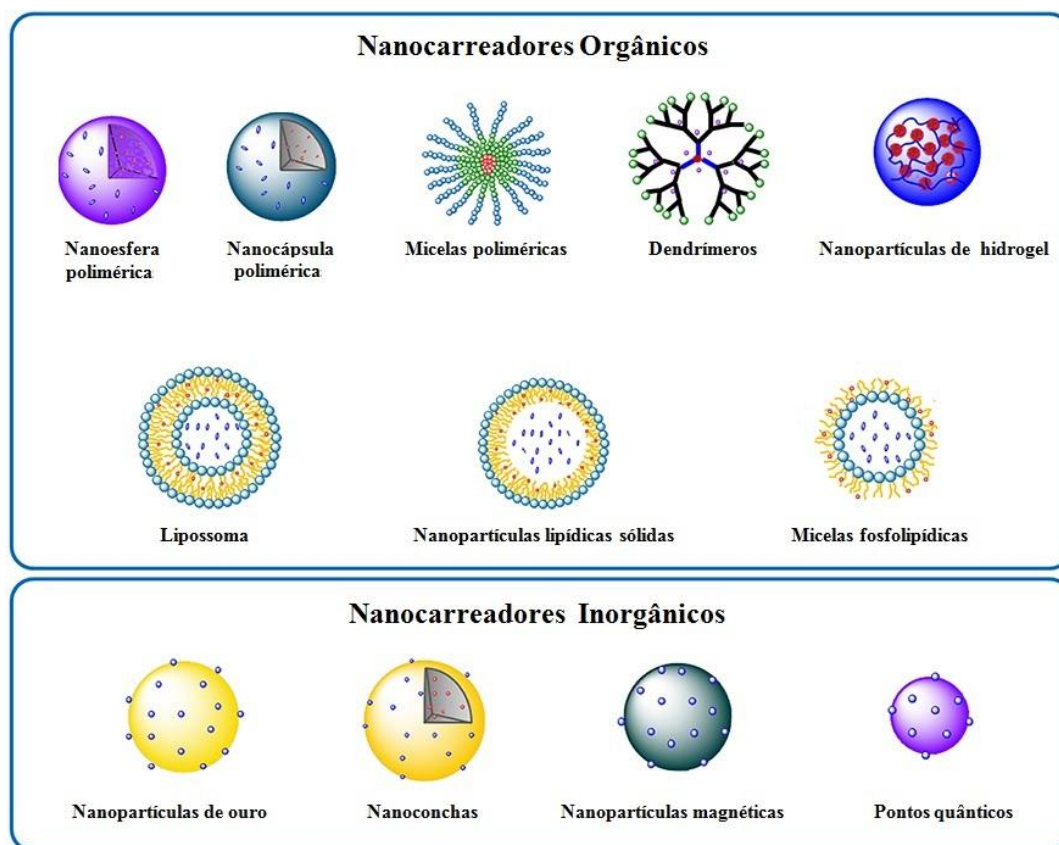


Figura 1.8 – Exemplos de nanocarreadores. Sistema de nanopartículas orgânicas (nanopartículas poliméricas e lipídicas) e inorgânicas (nanopartículas de metal). Adaptado de Conniot e colaboradores, 2014 (149).

1.3.3. Nanocápsulas Poliméricas

As nanocápsulas poliméricas são sistemas coloidais com uma estrutura núcleo-casca, onde o núcleo atua como um reservatório para diversas moléculas ou drogas, e a casca ou parede como uma membrana protetora (Figura 1.9) (155). As funcionalidades personalizáveis do núcleo e da parede tornam as nanocápsulas atraentes como uma plataforma nanocarreadora superior para a entrega de compostos funcionais. Em particular, as nanocápsulas constituídas por um núcleo oleoso e um invólucro de polímero circundante apresenta um uso especial para encapsular e distribuir fármacos hidrofóbicos, evitando assim a utilização de agentes solubilizantes para sua administração (156). A parede das nanocápsulas, por outro lado, serve para proteger o material em seu interior contra a decomposição prematura (por exemplo, fotólise, hidrólise, ação de micro-organismos ou oxidação/redução), proteger o ambiente onde as nanocápsulas estão dispersas contra a toxicidade da carga e fornecer vias acessíveis e estímulo-sensíveis para a liberação da droga (157). Como as nanocápsulas contêm cavidades internas, elas podem encapsular vários tipos de compostos e, usualmente, têm muito menos massa em comparação com nanopartículas de polímero sem cavidades como o caso das nanoesferas (158, 159).

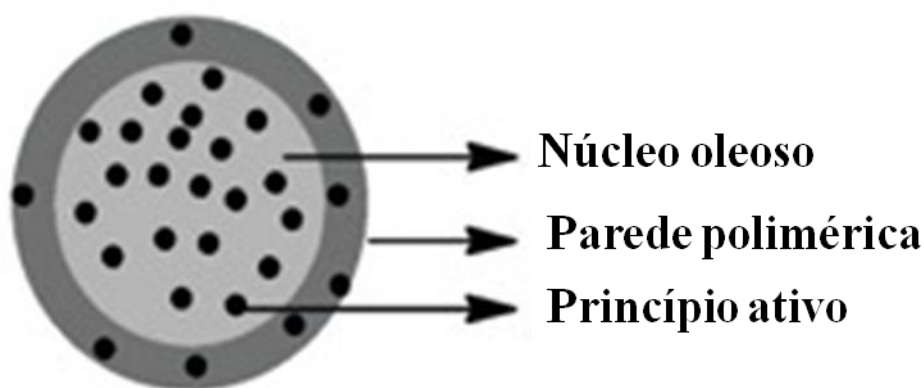


Figura 1.9 – Estrutura das nanocápsulas poliméricas com núcleo oleoso. Nesses sistemas nanocarreadores, o princípio ativo se encontra solubilizado e/ou disperso no núcleo oleoso ou adsorvido na parede polimérica que reveste o núcleo. Modificado de Yurgel e colaboradores, 2012 (155).

As propriedades físico-químicas e biológicas das nanocápsulas poliméricas dependem tanto do método de preparação como das matérias-primas utilizadas para a produção. As nanocápsulas são normalmente produzidas em meio aquoso como uma solução coloidal turva, através de métodos como emulsificação ou por deposição interfacial de polímero, também conhecido como nanoprecipitação (160, 161). O método de nanoprecipitação é o mais

utilizado, provavelmente devido à sua reprodutibilidade e fácil manuseio, sem a necessidade de etapas subsequentes para purificação, resultando em uma solução opalescente a qual pode ser utilizada diretamente após a preparação ou pode ser adicionalmente convertida em gel ou pó para facilitar sua aplicação e aumentar a estabilidade física do produto (161).

Geralmente, as nanopartículas são produzidas, sintetizadas ou estruturadas em suspensões aquosas. No entanto, os processos de secagem oferecem um aumento na estabilidade físico-química das formulações, fornecendo produtos secos versáteis que podem ser convertidos em várias formas de dosagem sólidas (comprimidos ou cápsulas), ou em pó que pode ser redisperso instantaneamente antes do uso. Várias técnicas têm sido descritas na literatura visando a secagem de nanopartículas, tais como o método de *spray drying* (162). Este método produz, eficientemente, pó seco a partir de um líquido ou de uma pasta. Suas vantagens são baseadas na versatilidade devido à compatibilidade com diversos materiais. Além disso, pode-se produzir pós contendo partículas com uma forma esférica, com um diâmetro na gama submicrométrica relativamente monodisperso e com elevado rendimento de formulação (163, 164). Assim, a secagem por pulverização é um processo rápido e de baixo custo através do qual se obtêm pós secos com conteúdos de água muito baixos. Como consequência, estes pós têm uma longa vida de prateleira (162). Devido a essas características, sugere-se que a tecnologia de secagem por *spray-drying* continuará a reforçar a sua posição na indústria farmacêutica e ganhar uma quota crescente do mercado nos próximos anos (165).

As propriedades físico-químicas mais importantes a serem analisadas após o preparo tanto pelo método de nanoemulsão quanto por *spray-dryer* incluem tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, perfil de liberação de fármaco e teor do princípio ativo na nanocápsula. Alguns desses parâmetros sofrem influência direta, de acordo com os constituintes da formulação. Por exemplo, o polímero que forma a parede da nanocápsula, geralmente biodegradável, tem uma grande influência no controle da liberação do fármaco (161).

1.3.4. Polímeros sintéticos

Nas últimas três décadas, os polímeros foram explorados como componentes-chaves em sistemas carreadores de substâncias ativas, como no caso de nanocápsulas poliméricas. Os polímeros são substâncias químicas compostas por unidades repetidas conhecidas como monômeros. Tais monômeros devem apresentar biocompatibilidade, histocompatibilidade e degradação hidrolítica produzindo polímeros não tóxicos, bem como outras propriedades

químicas, para serem caracterizadas como candidatos ótimos na tecnologia farmacêutica. Polímeros tais como quitosana, ácido algínico, ácido hialurônico, dentre outros, ocorrem na natureza e são utilizados em sistemas de administração de fármacos e até mesmo em diagnóstico por imagem (145). No entanto, tais polímeros não foram amplamente avaliados quanto à liberação de fármaco devido às diferenças de pureza e a necessidade de reticulação polimérica, a qual pode desnaturar os fármacos encapsulados. Como resultado, nanocápsulas de polímero sintético ganharam substancialmente mais atenção (136). Polímeros sintéticos são amplamente utilizados em produtos farmacêuticos comerciais devido às suas propriedades importantes tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade bem como grupamentos ativos (-OH) que podem ligar covalentemente ou conjugar com vários receptores de modo a melhorar a captação celular, além de apresentarem uma taxa de eficiência de encapsulação extremamente elevada (145).

Diversos polímeros sintéticos, de acordo com suas características, são utilizados em sistemas nanocarreadores, como por exemplo o poli épsilon caprolactona (PCL) e os copolímeros de ácido metacrílico. O PCL é um poliéster alifático, que era inicialmente utilizado para o preparo de materiais de embalagens biodegradáveis, uma vez que é digerido por micro-organismos. No entanto, uma vez que o PCL também pode ser dissolvido por um mecanismo hidrolítico em condições fisiológicas, tal polímero se tornou uma interessante opção para nanocarreamento de princípios ativos em sistemas biológicos (166). Relatos na literatura utilizando PCL em estratégias de nanovetorização de drogas têm demonstrado resultados promissores em diversos sistemas estudados, tornando-o uma alternativa interessante para o revestimento de nanopartículas (167, 168).

Os copolímeros de ácido metacrílico (Eudragit®) são polímeros de revestimento geralmente utilizados no preparo de nanocápsulas visando a administração oral, fornecendo oportunidades para uma terapia não invasiva e de fácil aceitação pelos pacientes (169, 170). Uma vez que o sistema imunitário do trato gastrointestinal constitui uma importante linha de defesa contra patógenos da mucosa e devido também a efeitos do metabolismo de primeira passagem, a possibilidade de administrar fármacos por essa via, sem perdas significativas do princípio ativo abre perspectiva altamente promissora em diferentes aplicações de interesse terapêutico (171, 172). O Eudragit® S-100 é um polímero aniônico que apresenta uma solubilidade dependente do pH, sendo lentamente solúvel na região do trato digestivo onde o meio é neutro a fracamente alcalino. Dessa forma, quando usado em sistemas de nanovetorização, espera-se que proteja a droga da degradação pelo suco gástrico e permita que seja liberada na região do trato gastrointestinal, de pH acima de 7, ou seja, o intestino

grosso ou cólon. Nessas regiões, as enzimas proteolíticas encontram-se em baixas concentrações, aumentando assim a sua biodisponibilidade no organismo (173). Além da liberação dependente do pH, polímeros de Eudragit® S-100 também têm sido apontados como tendo características superiores de mucoadesão em tecido intestinal, em comparação com outros polímeros de revestimento amplamente utilizados, sugerindo que a sua utilização pode reduzir a eliminação do princípio ativo do organismo e melhorar a entrega de drogas no colón (174). Um estudo recente de Paolino e colaboradores demonstrou que após administração oral em ratos, a curcumina encapsulada, utilizando como polímero de revestimento o Eudragit®, mostrou um aumento de sete vezes da biodisponibilidade em relação ao fármaco puro, com elevação de cerca de cinco vezes da concentração plasmática máxima experimental (C_{max}), além da redução do tempo de pico (T_{max}) correspondente de 120 para 90 min (175). Nesse cenário, o Eudragit®, mostra-se uma alternativa de revestimento em nanocapsulas bastante promissor em relação ao aumento de biodisponibilidade de princípios ativos administrados por via oral, uma vez que pode conceder a droga um perfil de concentração e tempo no plasma eficientemente necessário do ponto de vista de um regime de doses terapêuticamente viáveis (172).

1.3.5. Nanotecnologia e Tecido Pulmonar

A via pulmonar é bem estabelecida para a entrega de agentes terapêuticos visando o tratamento de doenças pulmonares e sistêmicas. A administração pulmonar de broncodilatadores, antibióticos, medicamentos anti-inflamatórios dentre diversos outros agentes está bem estabelecida no manejo de doenças que afetam o pulmão como a fibrose cística, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e SDRA. A entrega de fármacos ao tecido pulmonar é frequentemente vantajosa pois aproveita uma área de superfície alveolar extremamente grande, uma rede capilar densa e uma barreira muito fina para absorção eficiente de drogas com aumento de sua biodisponibilidade (176).

No entanto, as vias aéreas apresentam barreiras relativamente difíceis para a penetração das partículas. Tal região é revestida por epitélio respiratório ciliado, que é coberto por uma camada de muco. O movimento mucociliar é um importante mecanismo de remoção das partículas, enquanto que a barreira entre a parede alveolar e os capilares é muito fina e relativamente fraca nas áreas de troca de gás (177, 178). No entanto, de acordo com características como tamanho, índice de polidispersão, densidade, forma, carga e higroscopicidade, as nanopartículas podem transpor a camada de muco e alcançar as células epiteliais, além de atravessar a barreira epitelial (177). De fato, diversos estudos utilizando

nanomateriais visando o tratamento de doenças pulmonares demonstram que tais nanocarreadores apresentam grande potencial terapêutico quando avaliados em modelos experimentais animais (179-181). Importante salientar que, apesar dos benefícios descritos pela administração de compostos por via pulmonar, tal rota apresenta desvantagens como, por exemplo, a dificuldade em usar os dispositivos corretamente e o desconforto causado ao paciente (182). Nesse sentido, a administração oral indica ser uma via mais conveniente, não invasiva, e que não requer treinamento especial (183).

Estudos envolvendo a utilização de nanocarreadores para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares vêm sendo descritos na literatura. Um estudo de Lim e colaboradores, comparou o efeito do tratamento com o peptídeo GLP1 humano, livre ou associado com micelas fosfolipídicas revestidas por polietilenoglicol, administradas por via sistêmica em camundongos C57Black 6, em um modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS. De maneira interessante, o tratamento com GLP1-nanoformulado (5-30 nmol/camundongo) demonstrou uma diminuição dose-dependente no influxo de neutrófilos no pulmão, na atividade de mieloperoxidase e nos níveis de IL-6 dos animais doentes. Vale notar que a administração de GLP-1 em solução salina não apresentou efeitos anti-inflamatórios significativos nas mesmas condições (184). De maneira semelhante, Chu e colaboradores demonstraram que nanopartículas constituídas por albumina de soro bovino desnaturado, contendo em seu interior um inibidor do fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B, quando administrados sistemicamente, reduziram de maneira significativa o número de neutrófilos no BAL, juntamente com os níveis de IL-6 e TNF- α , se comparado com a droga livre em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS. Verificou-se ainda que no grupo de animais tratados com o nanocarreador, a droga foi detectada no lavado broncoalveolar (BAL), mas não no plasma dos camundongos, indicando um acúmulo no tecido pulmonar inflamado. Da mesma forma que o estudo anterior, o composto administrado em sua forma livre não foi detectado nem no BAL nem no plasma dos animais (185), reforçando assim a hipótese da vetorização da droga nanoformulada.

Em conjunto, esses dados indicam que o uso de nanocarreadores tem potencial para aumentar o efeito farmacológico de compostos candidatos a prevenir ou tratar patológicas associadas às doenças inflamatórias pulmonares.

2. OBJETIVOS E METAS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar físico-quimicamente uma formulação de nanocápsulas contendo JME-173, bem como investigar o potencial efeito farmacológico desta formulação na inflamação pulmonar induzida por LPS, visando potencial aplicação terapêutica no controle de doenças inflamatórias pulmonares.

2.2 - Objetivos específicos:

- Realizar estudos para avaliar possíveis efeitos tóxicos *in vivo*, resultantes do tratamento oral com JME-173 livre.
- Realizar estudo fatorial para a preparação das suspensões de nanocápsulas contendo JME-173, utilizando-se como variáveis o polímero de revestimento e a proporção princípio ativo em óleo inerte.
- Desenvolver e caracterizar formulações de nanocápsulas contendo JME-173, quanto aos seguintes parâmetros:
 - Diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão;
 - Potencial zeta;
 - Doseamento do teor total do composto na formulação;
 - Taxa de encapsulação do princípio ativo;
 - pH da formulação;
- Avaliar o efeito do tratamento oral com formulação, na forma de suspensão, do JME-173 nanoencapsulado sobre alterações fisiopatológicas relevantes em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS em camundongos, através da análise parâmetros relevantes:
 - Influxo de células inflamatórias recuperadas no lavado broncoalveolar;
 - Atividade de mieloperoxidase (MPO) presente no pulmão;
 - Mediadores inflamatórios no tecido pulmonar;
 - Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas, estimuladas por concentrações crescentes de metacolina;

- Realizar a secagem das suspensões líquidas preparadas, visando aumentar a estabilidade e posteriormente caracterizar físico-quimicamente estes pós;

- Comparar o efeito do tratamento oral com formulações, na forma de suspensão e na forma seca (pó) recém redisperso, sobre alterações fisiopatológicas relevantes em modelos de inflamação pulmonar induzida por LPS em camundongos, através da análise parâmetros relevantes:
 - Influxo de células inflamatórias recuperadas no lavado broncoalveolar;
 - Atividade de MPO presente no pulmão;
 - Mediadores inflamatórios no tecido pulmonar;
 - Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas, estimuladas por concentrações crescentes de metacolina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparo e caracterização físico-química de nanocápsulas contendo JME-173

3.1.1. Estudo de desenvolvimento da formulação

Durante o estudo fatorial foram testadas combinações, de acordo com a utilização de duas variáveis diferentes, em busca da melhor condição para o preparo das formulações. As variáveis utilizadas foram o tipo de polímero: PCL(Mw: 85000) (Sigma-Aldrich, EUA) ou Eudragit® S-100 (Evonik Industries, Alemanha) e a proporção (1:2, 1:1 e 2:1) de JME-173 em triglicerídeos de cadeia média (TCM) (Delaware, Brasil), utilizados para a produção das nanocápsulas, segundo a técnica descrita no item 3.1.2. Desta forma, foi possível avaliar se a alteração desses parâmetros influenciaria nas características das nanopartículas formadas, principalmente, em termos de tamanho de partícula. O organograma do estudo fatorial está demonstrado na Figura 3.1.

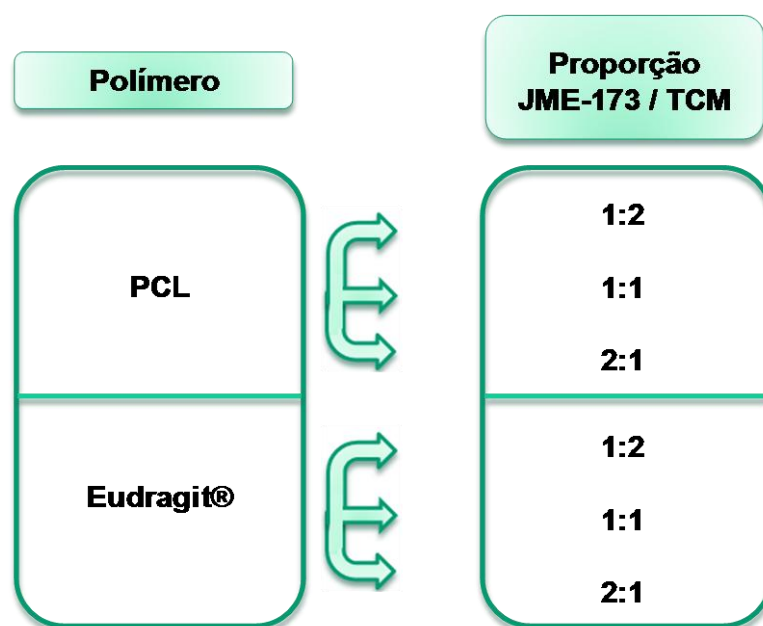


Figura 3.1 - Organograma do estudo fatorial para preparação das nanocápsulas contendo JME-173. Foram testadas 6 diferentes condições para o preparo de nanocápsulas contendo JME-173, de acordo com a utilização de 2 variáveis: tipo de polímero (PCL ou Eudragit® S-100) e proporção de JME-173:TCM (1:2, 1:1 e 2:1). TCM= Triglicerídeos de cadeia média; PCL= poli(epsilon-caprolactona).

3.1.2. Preparo das suspensões de nanocápsulas contendo JME-173

Nanocápsulas contendo JME-173 foram obtidas através do método de deposição interfacial de polímeros biodegradáveis pré-formados (método de nanoprecipitação) proposto por Fessi e colaboradores (186), com algumas modificações. A preparação das suspensões de nanocápsulas consistiu em duas fases distintas, uma fase orgânica e outra aquosa. A fase orgânica, constituída pelos polímeros PCL ou Eudragit® S-100, JME-173, TCM e no caso das formulações preparadas com o polímero PCL o tensoativo monoestearato de sorbitano (Span® 60) (Sigma-Aldrich, EUA), dissolvidos em acetona e etanol em banho-maria a 40 °C. A fase aquosa foi constituída por tensoativo hidrofílico polissorbato 80 (Tween® 80) (Delaware, Brasil) em água (Milli-Q®), também em banho-maria a 40 °C. Após a solubilização dos componentes da preparação de fase orgânica, esta fase foi introduzida lentamente na solução aquosa, sob agitação magnética de 400 RPM. O produto dessa mistura foi a formação de gotículas de emulsão de diâmetro nanométrico, ocorrendo posterior precipitação do polímero na superfície da gotícula. A acetona e o etanol, os quais rapidamente se difundem através da fase aquosa, foram então removidos através do processo de evaporação a pressão reduzida, utilizando o evaporador rotatório (Büchi Labortechnik AG, Suíça) originando uma dispersão coloidal. Esta dispersão coloidal foi concentrada para um volume final de 5, 7,5 ou 10 mL, de acordo com a proporção de JME em TCM utilizada em cada uma das formulações, através da remoção de água, por rotaevaporação. Nanocápsulas brancas foram preparadas pelo mesmo procedimento sem a adição do princípio ativo. A proporção dos constituintes de cada uma das formulações está demonstrada na tabela 3.1. O processo de preparo e caracterização das nanocápsulas foi realizado em colaboração com Prof. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres e Dra. Adriana Pohlmann da Faculdade de Farmácia/UFRGS.

	PCL JME-173: TCM (1:2)	PCL JME-173: TCM (1:1)	PCL JME-173: TCM (2:1)	Eudragit S-100® JME-173: TCM (1:2)	Eudragit S-100® JME-173: TCM (1:1)	Eudragit S-100® JME-173: TCM (2:1)
Polímero	PCL (100 mg)	PCL (100 mg)	PCL (100 mg)	Eudragit S-100® (100 mg)	Eudragit S-100® (100 mg)	Eudragit S-100® (100 mg)
JME-173	50 mg	75 mg	100 mg	50 mg	75 mg	100 mg
TCM	100 mg	75 mg	50 mg	100 mg	75 mg	50 mg
Span 60	38 mg	38 mg	38 mg	-	-	-
Acetona	27 mL	27 mL	27 mL	27 mL	27 mL	27 mL
Etanol	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL
Água	53 mL	53 mL	53 mL	53 mL	53 mL	53 mL
Tween 80	77 mg	77 mg	77 mg	77 mg	77 mg	77 mg
Concentração JME-173 na Formulação	5 mg/mL	7,5 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	7,5 mg/mL	10 mg/mL

Tabela 3.1 - Constituintes das formulações das nanocápsulas contendo JME-173. Foram testadas 6 diferentes condições para o preparo de nanocápsulas contendo JME-173, de acordo com a utilização de 2 variáveis: tipo de polímero (PCL ou Eudragit® S-100) e proporção de JME-173:TCM (1:2, 1:1 e 2:1). TCM: Triglicerídeos de cadeia média; PCL: poli(epsilon- caprolactona).

3.1.3. Estudo fatorial e preparo das formulações secas de nanocápsulas contendo JME-173

Para a obtenção da formulação de nanocápsulas secas, foram preparadas, previamente, duas fases distintas. Uma fase orgânica contendo polímero Eudragit® S-100 (100 mg), TCM (50 mg), JME-173 (100 mg), os quais foram solubilizados em 27 mL de acetona e 3 mL de etanol sob agitação magnética constante e temperatura controlada de 40 ± 2 °C. A fase aquosa foi preparada com a dissolução de Tween 80 (0,077 g) em 53 mL de água ultrapura sob as mesmas condições de agitação e temperatura supracitadas. A fase orgânica foi inserida na fase aquosa em velocidade constante. Após a formação das nanocápsulas, foi adicionado 0,410 (0,5%), 0,820 (1%) ou 1,230 g (1,5%) dos adjuvantes de secagem L-leucina ou Lactose (DEG Produtos Químicos, Brasil) na suspensão. Após a homogeneização com o adjuvante de secagem, a suspensão de nanocápsulas foi seca pela técnica de secagem por aspersão (*spray-drying*) utilizando o equipamento Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Suíça) sob condições de secagem pré-determinadas (187). As condições de secagem utilizadas foram: aspiração 37,5 m³/h (100%), temperatura de entrada 120 °C, temperatura de saída 68° C, pressão de ar 1,8 bar e fluxo de alimentação de 5 mL/min (15 %). O organograma do estudo fatorial está demonstrado na Figura 3.2.

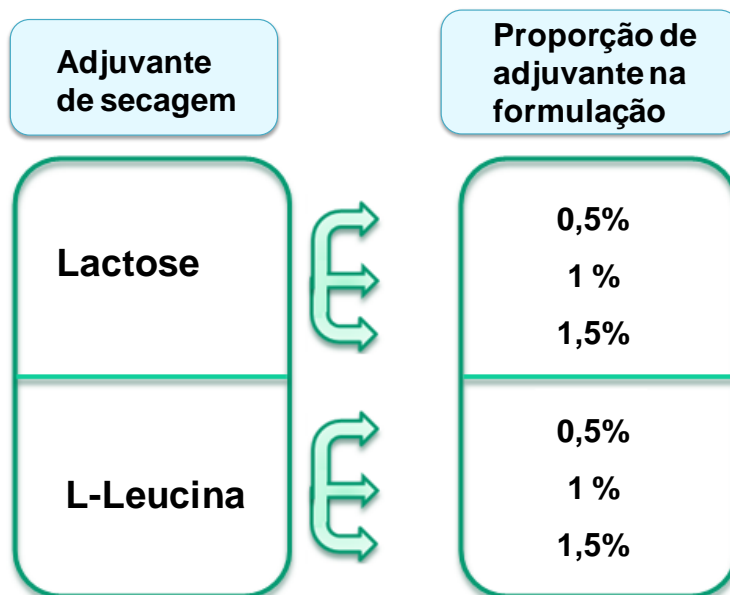


Figura 3.2 - Organograma do estudo fatorial para preparação das formulações secas de nanocápsulas contendo JME-173. Foram testadas 6 diferentes condições para o preparo da formulação em forma de pó de nanocápsulas contendo JME-173, de acordo com a utilização de 2 variáveis: adjuvante de secagem (lactose ou l-leucina) e proporção de adjuvante da formulação (0,5, 1 ou 1.5%).

3.1.4. Caracterização físico-química das formulações

3.1.4.1. Análise do tamanho de partícula por difração de laser (LD)

A caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo JME-173 foi realizada logo após o seu preparo, segundo os métodos descritos anteriormente (188). As suspensões de nanocápsulas foram caracterizadas quanto ao seu tamanho e distribuição de tamanho (Span), utilizando a técnica de difração de laser, utilizando o equipamento MasterSizer – Hydro 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido). Esta técnica é utilizada para realizar o controle nanotecnológico da formulação, pois permite evidenciar se ocorrem populações micrométricas na suspensão de nanopartículas. Uma alíquota das suspensões de nanocápsulas foi dispersa em água ultrapura, diretamente na unidade de leitura do equipamento, até que a obscuração do laser atingisse 2%. Os resultados foram expressos como média de triplicatas.

3.1.4.2. Análise do tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As suspensões de nanocápsulas foram caracterizadas quanto ao seu tamanho e homogeneidade (índice de polidispersão – PDI), pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizando o equipamento ZetaSizer ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Esta técnica é mais sensível para medidas de sistemas nanotecnológicos em uma faixa estreita de distribuição. Uma alíquota da suspensão foi diluída 500 vezes (v/v), em água ultrapura, e o resultado expresso como média de triplicata. Os índices de tamanho e polidispersão foram calculados usando o *software* (Dispersion Technology Software - DTS Nano - Versão 5.02, Malvern) fornecido pelo fabricante (Malvern Instruments, Reino Unido).

3.1.4.3. Análise do potencial zeta

As suspensões de nanocápsulas foram caracterizadas quanto ao seu potencial zeta pela técnica de microeletroforese associada à anemometria doppler de laser, submetendo-se a amostra a um campo elétrico no equipamento ZetaSizer ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Uma alíquota da suspensão foi diluída 500 vezes (v/v), em uma solução contendo cloreto de sódio a 10 µM para a análise. O resultado foi expresso como média de triplicata.

3.1.4.4. Quantificação de JME-173 na formulação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) - UV

O teor de JME-173 (concentração total) na formulação foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)-UV. O conteúdo foi determinado após a dissolução total das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo a quantidade (teórica) de 1,5 mg de JME-173 em 10 mL de acetonitrila (Merck, Brasil), através de sonicação por 30 minutos e posterior filtragem (Millipore® 0,45 µm) para análise. O sistema consistiu em um detector UV-Vis, bomba e autoinjeter Shimadzu (Shimadzu Corporation, Japão) e uma coluna Phenomenex C18 (150 mm x 4,6 mm i.d. com partícula de 5 µm, Shimadzu Corporation, Japão). A fase móvel consistiu em acetonitrila / tampão fosfato (pH 3,0) (40:60 v / v) com um pH de 3,0 ± 0,5 corrigido com ácido ortofosfórico a 10% (v / v). A taxa de fluxo isocrático da fase móvel foi de 1 mL / min e o tempo de retenção do JME-173 foi de 3,52 min com comprimento de onda de 254 nm. O método utilizado foi previamente validado com o JME-173 livre (não-nanoencapsulado). Foram construídas 3 curvas de calibração diferentes. O coeficiente de correlação médio obtido foi de 0,998. Depois de construída a curva de calibração, foi realizada a avaliação do teor de JME-173 nas formulações. Basicamente, a quantidade de

JME-173 foi calculada comparando a relação da área do pico de formulação contendo a concentração teórica de 150 µg/mL de JME-173 em fase móvel, com o ponto da curva de calibração equivalente a essa concentração do composto livre.

3.1.4.5. Eficiência de encapsulação

Para avaliar a eficiência de encapsulação, 400 µl da formulação de nanocápsulas contendo JME-173 foram adicionados em microtubos de centrifugação (*ultrafree*®, Millipore, EUA). Os microtubos foram então centrifugados a 23548 x g em centrífuga de eppendorfs durante 5 min. O ultrafiltrado foi recolhido e a quantificação de JME-173 foi realizada por CLAE-UV. A eficiência de encapsulação foi calculada de forma indireta, a partir da diferença entre as concentrações do JME-173 total e livre medidos na suspensão de nanopartículas e no ultrafiltrado, respectivamente.

3.1.4.6. pH das formulações

O pH das formulações foram avaliados diretamente na suspensão de nanocápsulas contendo JME-173, usando potenciômetro B-474 (Micronal, Brazil). As medições foram realizadas utilizando 3 lotes diferentes da formulação.

3.2. Animais

Camundongos A/J (18-20 g) machos, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz, foram utilizados nos experimentos. Os animais foram acondicionados, em grupos de cinco animais por caixa, no biotério do Pavilhão Ozório de Almeida do Instituto Oswaldo Cruz, com temperatura controlada entre 25-28 °C, e submetidos ao ciclo de luz definido em claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Todos os protocolos e procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Uso de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA – número de licença LW23/10).

3.3. Avaliação de alterações de peso corporal e parâmetros bioquímicos e leucocitários sanguíneos, após tratamento repetitivo com JME-173 por 35 dias.

Os camundongos foram tratados com JME-173 na dose de 100 mg/Kg, escolhida com base em estudos prévios do grupo (130), por via oral, através de gavagem, uma vez ao dia, cinco dias por semana, durante seis semanas. O grupo controle foi tratado com veículo, água destilada. O protótipo mexiletina (100 mg/kg), administrado nas mesmas condições, foi utilizado como referência. As soluções de tratamento foram preparadas imediatamente antes de sua administração.

3.3.1. Análise de peso

Os animais foram pesados imediatamente antes da administração das substâncias ou do veículo. Os camundongos foram pesados, individualmente, todos os dias até o último dia da administração da droga.

3.3.2. Contagem de células do sangue

As análises sanguíneas foram realizadas 24 h após o último tratamento com a mexiletina, JME-173 ou veículo, conforme descrito em (189), com ligeiras modificações. Amostras de 5 µl de sangue foram retiradas da cauda dos camundongos e imediatamente diluídas em 195 µl de solução de Türk (ácido acético 0,2%) para contagem dos leucócitos totais. A contagem foi realizada através de microscopia de luz (microscópio Olympus®) em câmara de Neubauer. Para a contagem de leucócitos diferenciais foram realizados esfregaços sanguíneos, sendo as lâminas posteriormente coradas com May-Grunwald e Giemsa (Merck, Brasil) e diferenciadas com auxílio de microscopia de luz, com auxílio de uma objetiva de imersão em óleo.

3.3.3. Análises bioquímicas do sangue

Os camundongos foram anestesiados, através de exposição a aerossol de Isoflurano (Isoforine®, Cristália, Brasil), para o recolhimento do sangue, por meio de punção cardíaca. O sangue recolhido foi imediatamente armazenado para posterior quantificação de creatinina, bilirrubina total, albumina, ureia, colesterol, alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, cloro, sódio, glicose e proteínas totais, realizada no Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal) FIOCRUZ (Plataforma RPT12C - Análises Clínicas de Animais de Laboratório).

3.4. Avaliação do efeito anti-inflamatório do JME-173 nanoencapsulado em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS

3.4.1. Modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS

Camundongos A/J foram anestesiados com aerossol de isoflurano (Cristália, Brasil) e submetidos ao desafio intranasal de LPS (25 µg/25 µL) (Sigma-Aldrich, USA) ou veículo salina estéril (NaCl 0.9%) (VicMed, Brasil) no grupo controle, conforme descrito em (190). O tratamento com JME-173 livre ou nanoencapsulado nas doses de 8, 25 e 50 mg/Kg, escolhidas com base em estudos prévios do grupo, avaliando o efeito anti-inflamatório do JME-173 livre em modelo de inflamação pulmonar induzida por OVA (130), ou com ou nanocápsulas brancas foi realizado pela via oral, através de gavagem, 4 h antes da provocação por LPS. As análises foram realizadas 18 h após o desafio. O protocolo experimental do modelo de inflamação pulmonar induzido por LPS está mostrado na Figura 3.3.

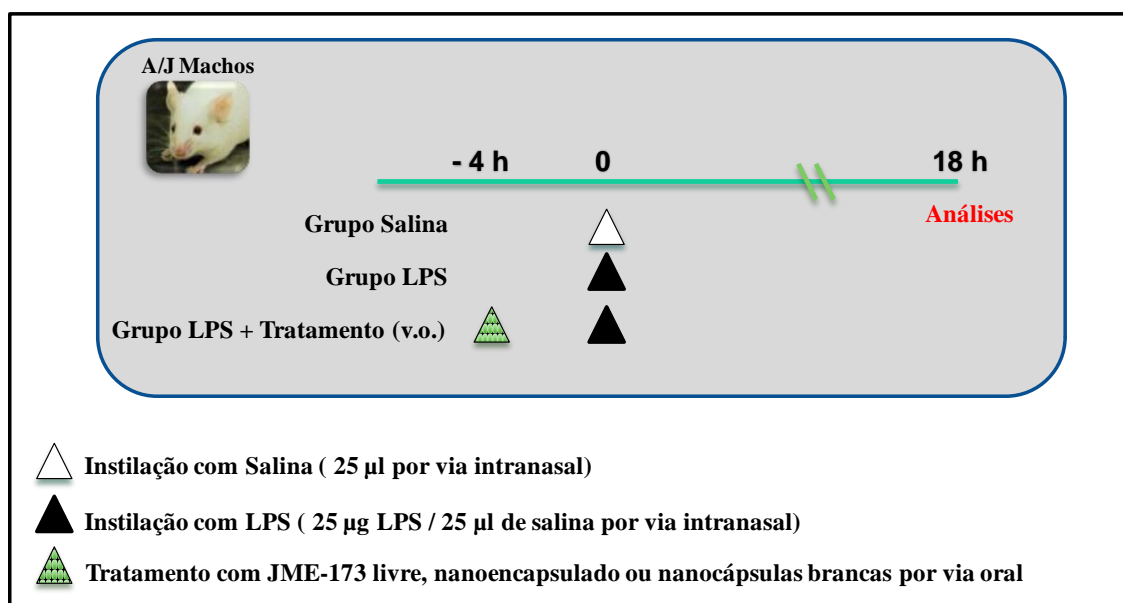


Figura 3.3 - Protocolo experimental do modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS. A seta branca indica desafio intranasal com 25 µl de Salina; a seta preta indica desafio intranasal com 25 µg de LPS em 25 µl de salina; o triângulo verde indica tratamento oral com JME-173 livre ou nanoencapsulado (8, 25 ou 50 mg/Kg) ou com nanocápsulas brancas.

3.4.2. Medidas de mecânica respiratória

Para o teste de mecânica respiratória, avaliou-se o parâmetro de elastância pulmonar (cmH₂O/mL), com auxílio da pletismógrafia barométrica de corpo inteiro invasiva

(Finepointe, Buxco-DSI, EUA), conforme descrito em (191). Para tanto, os camundongos foram anestesiados com nembital (Pentobarbital, Sigma-Aldrich, USA) (60 mg/Kg, i.p.), traqueostomizados e submetidos à intubação endotraqueal e conectados ao equipamento BUXCO para tomada de parâmetros de função pulmonar. A obtenção dos dados fisiológicos foi realizada com os animais curarizados com brometo de pancurônio (Pavulon®, Sigma-Aldrich, USA) (1 mg/Kg), ventilados mecanicamente (volume tidal de 200 µL) e mantidos à temperatura de 37°C. Após curto período de estabilização, os animais foram sequencialmente estimulados com aerossóis de PBS e metacolina (3, 9 e 27 mg/mL), após o que foram coletados os valores de elastância em tempo real por um período de 5 minutos. Os foram registrados e processados com auxílio do *software* Buxco Biosystem XA (Buxco Research System, EUA).

3.4.3. Avaliação de células do lavado broncoalveolar

Após a análise de função pulmonar, os camundongos foram eutanasiados através de anestesia terminal com 500 mg/Kg de tiopental (Thiopentax®, Cristália, Brasil), injetado por via intraperitoneal. O lavado broncoalveolar foi obtido através de três lavagens consecutivas com 0,5 mL de salina tamponada (PBS) contendo EDTA (10 mM) (Sigma-Aldrich, USA), conforme descrito em (190). As amostras foram centrifugadas a 250 x g durante 10 min e o precipitado foi ressuspenso em 250 µL de PBS/EDTA 10 mM para a contagem total e diferencial de leucócitos. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer através de microscopia óptica (aumento de 100x), diluindo-se uma alíquota da suspensão de células proveniente do lavado em líquido de Türk (1:10). A contagem diferencial foi realizada em citoesfregaços e posteriormente corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio ótico com objetiva de imersão em óleo (objetiva 100x).

3.4.4. Quantificação de proteínas do tecido pulmonar

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinônico (BCA), conforme descrito anteriormente (192). Tal método se baseia na reação na redução do cobre, em meio alcalino, promovida pelas proteínas. O cobre reduzido por sua vez, forma um complexo com o BCA, formando uma coloração roxa, a qual pode ser medido em comprimento de onda de 562 nm. As amostras foram adicionadas, assim como a curva com concentrações crescentes de albumina do soro bovino (BSA) (SeraLab, Reino Unido) em placas 96 poços. Posteriormente, foram adicionados 200 µL da mistura (50:1) de BCA (Sigma-Aldrich, EUA) e sulfato de cobre (Sigma-Aldrich, EUA). A placa foi incubada

durante 30 min a 37°C e após esse período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (562 nm).

3.4.5. Quantificação de citocinas e quimiocinas do tecido pulmonar

Fragmentos do pulmão dos camundongos foram removidos 18 h após o último desafio, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C para posterior análise. Imediatamente antes das quantificações, os tecidos foram homogeneizados em 1 ml de solução lise contendo um coquetel de inibidores de proteases (Complete®) (Roche Diagnostics, Alemanha) e 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) em PBS 1X. Após centrifugação de 1370 x g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e foi realizada a quantificação de proteína total e de citocinas.

Os níveis de citocinas foram detectados através da técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), conforme descrito em (179). As amostras foram quantificadas utilizando kits comercialmente disponíveis de IL-1 β , KC/CXCL1 (Quimioatrativo de queratinócitos), MCP-1/CCL2 (Proteína quimiotática de monócitos 1) e RANTES/CCL5 (Fator regulador da ativação expressos e secretados por linfócitos T normais) (R&D Systems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para recobrir a placa de 96 poços foi utilizado um anticorpo capturador (de acordo com o indicado pelo kit), onde o tempo de captura foi de 18 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada em tampão "*coat buffer*" e bloqueada com PBS-BSA 1 % (250 μ l por poço), permanecendo em contato com o anticorpo capturador durante 1 h. Após esta incubação ocorreu a lavagem, seguida da aplicação das amostras e dos padrões com diluição seriada nas concentrações indicadas nos kits, etapa que durou 18 h à temperatura de 4 °C. A placa foi, então, lavada com tampão "*Assay Buffer*" para posterior adição do anticorpo de detecção, permanecendo incubado por 1 h. Após esse tempo, a placa foi novamente lavada com o respectivo tampão e adicionou-se a enzima estreptoavidina por 1 h. O substrato (K-Blue) foi adicionado e a reação interrompida com H₂SO₄ (0,19 M). A leitura da placa foi realizada com a utilização de um espectrofotômetro (Versamax-Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 450 nm. Os níveis de citocinas foram normalizados para os níveis de proteína total medidos pelo ensaio de BCA e expressos como picogramas de citocina por miligrama de proteína.

3.4.6 Quantificação de Mieloperoxidase no tecido pulmonar

Conforme descrito previamente (190), fragmentos de tecido pulmonar foram homogeneizados em 1 ml de solução de Hank (Sigma-Aldrich, EUA) e centrifugados a 1.950

$\times g$ durante 10 min a 4 ° C. O *pellet* foi ressuspenso em 0,5 mL de NaCl a 0,2% seguido por 0,5 mL de solução hipertônica de NaCl a 1,6% e após centrifugado a 2.000 $\times g$ durante 10 min a 4 ° C. Em seguida, *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma-Aldrich, EUA) e recentrifugado a 1.700 $\times g$ durante 15 min a 4 ° C. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 15.300 $\times g$ durante 15 min a 4 ° C. Posteriormente, foram pipetados 50 μ L de amostra, 50 μ L de HTAB e 50 μ L de ortodidissidina em uma placa de 96 poços (Sigma-Aldrich, EUA). A placa foi mantida a 37 °C durante 15 min e, em seguida, adicionaram-se 50 μ L de H₂O₂ (Vetec, Brasil) a cada poço. Após 10 min, foram adicionados 50 μ L de azida sódica (1%) (Sigma-Aldrich, EUA). A análise foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 460 nm, e o resultado expresso como U (unidade enzimática) por mg de proteína.

3.4.7. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média e erro padrão da média e analisados estatisticamente por teste de análise de variância one-way ou two way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. GraphPad Prism 5 foi utilizado como *software* de análise estatística (GraphPad Prism versão 5.0, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Análise do peso corporal e parâmetros bioquímicos e leucocitários no sangue, após administração oral crônica de JME-173 livre

Com o objetivo de avaliar possíveis efeitos tóxicos do tratamento com JME-173 livre, camundongos A/J machos receberam doses elevadas (100 mg/Kg) de tal composto, por via oral, assim como da mexiletina para efeitos de comparação. Os tratamentos foram realizados uma vez ao dia, de segunda a sexta, durante seis semanas consecutivas. Os dados individuais de peso corpóreo (Figura 4.1A) e, particularmente aqueles relacionados as diferenças de massa em relação ao peso individual inicial (delta de ganho ou perda) (Figura 4.1B), revelaram que, ao contrário dos animais tratados com veículo ou mexiletina, aqueles tratados com JME-173 apresentaram perda significativa de peso ao longo do tratamento. As perdas foram já observadas ao longo da primeira semana e foram ainda notadas na última semana de análise.

Visando investigar possíveis alterações hematológicas nos animais tratados continuamente com altas doses de JME-173, avaliamos o perfil de leucócitos presentes no sangue desses animais. Conforme mostrado na Figura 4.2A, observamos que não houve alterações significativas no número de leucócitos nos camundongos tratados com mexiletina ou com JME-173, em relação ao grupo tratado com o veículo salina. A análise diferencial confirmou o perfil celular majoritariamente linfocitário (Figura 4.2B) característico da espécie, havendo também neutrófilos (Figura 4.2C) e monócitos (Figura 4.2D), os quais não se encontraram alterados em nenhum grupo estudado.

A partir de amostras de sangue, avaliamos também os níveis de marcadores de lesão de órgãos vitais em animais tratados com JME-173 e mexiletina. De forma semelhante a encontrada no número de células, não houve diferença significativa nos níveis de creatinina (Figura 4.3A), bilirrubina total (Figura 4.3B), albumina (Figura 4.3C), ureia (Figura 4.3D), colesterol (Figura 4.3E), alanina-aminotransferase (Figura 4.3F), aspartato-aminotransferase (Figura 4.3G), sódio (Figura 4.3H), cloro (Figura 4.3I), glicose (Figura 4.3J) e proteínas totais (Figura 4.3K) no sangue dos camundongos tratados com 100 mg/Kg de mexiletina e JME-173, em relação ao comparado com o grupo controle tratado com água destilada.

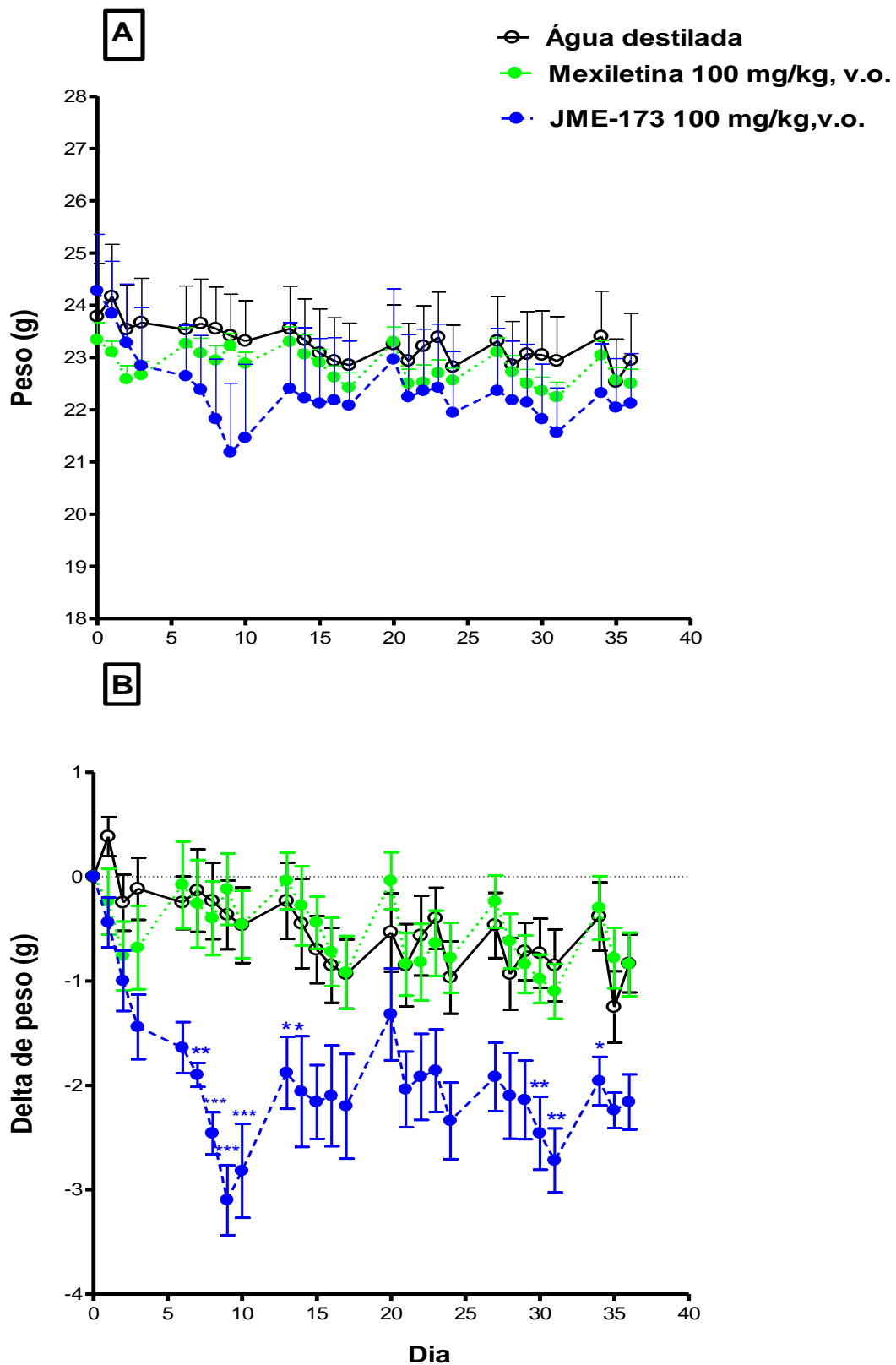


Figura 4.1 - Análise de peso dos animais submetidos ao tratamento contínuo com mexiletina ou JME-173. Camundongos A/J foram tratados, por via oral, com água destilada ou com 100 mg/Kg de mexiletina ou de JME-173, 5 vezes na semana, durante 6 semanas. Análise do peso (A) e delta de peso (B) dos animais, ao longo dos dias. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 5-6 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com água destilada.

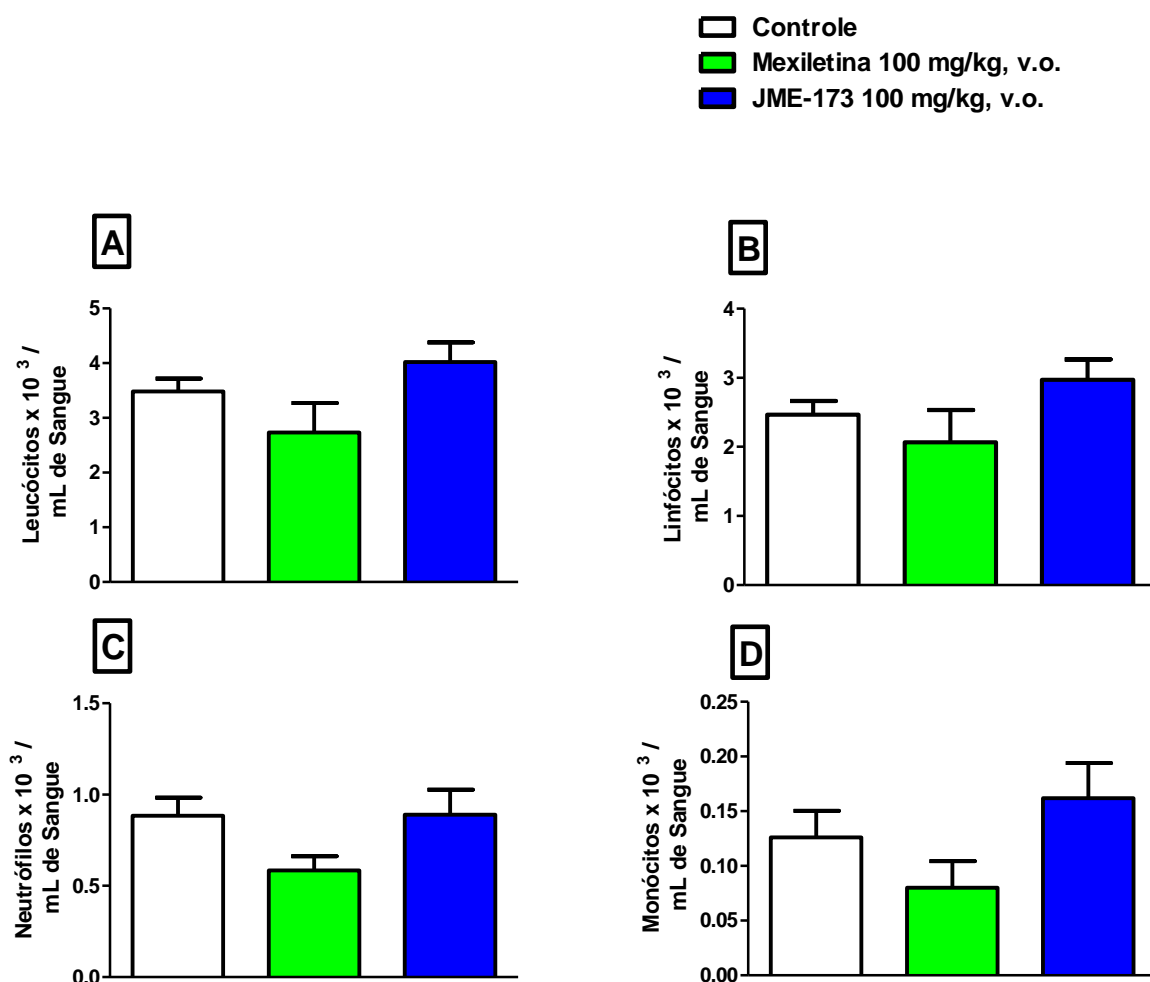


Figura 4.2 - Número de células no sangue dos animais submetidos ao tratamento contínuo com mexiletina ou JME-173. Camundongos A/J foram tratados, por via oral, com água destilada ou com 100 mg/Kg de mexiletina ou de JME-173, 5 vezes na semana, durante 6 semanas. A análise quantitativa de leucócito total no sangue (A) foi realizada por microscopia ótica com auxílio da câmara de Neubauer, enquanto que a análise do número de linfócitos (B), neutrófilos (C) e monócitos (D) foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com May Grunwald – Giemsa, 24 h após o último tratamento. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 5 animais.

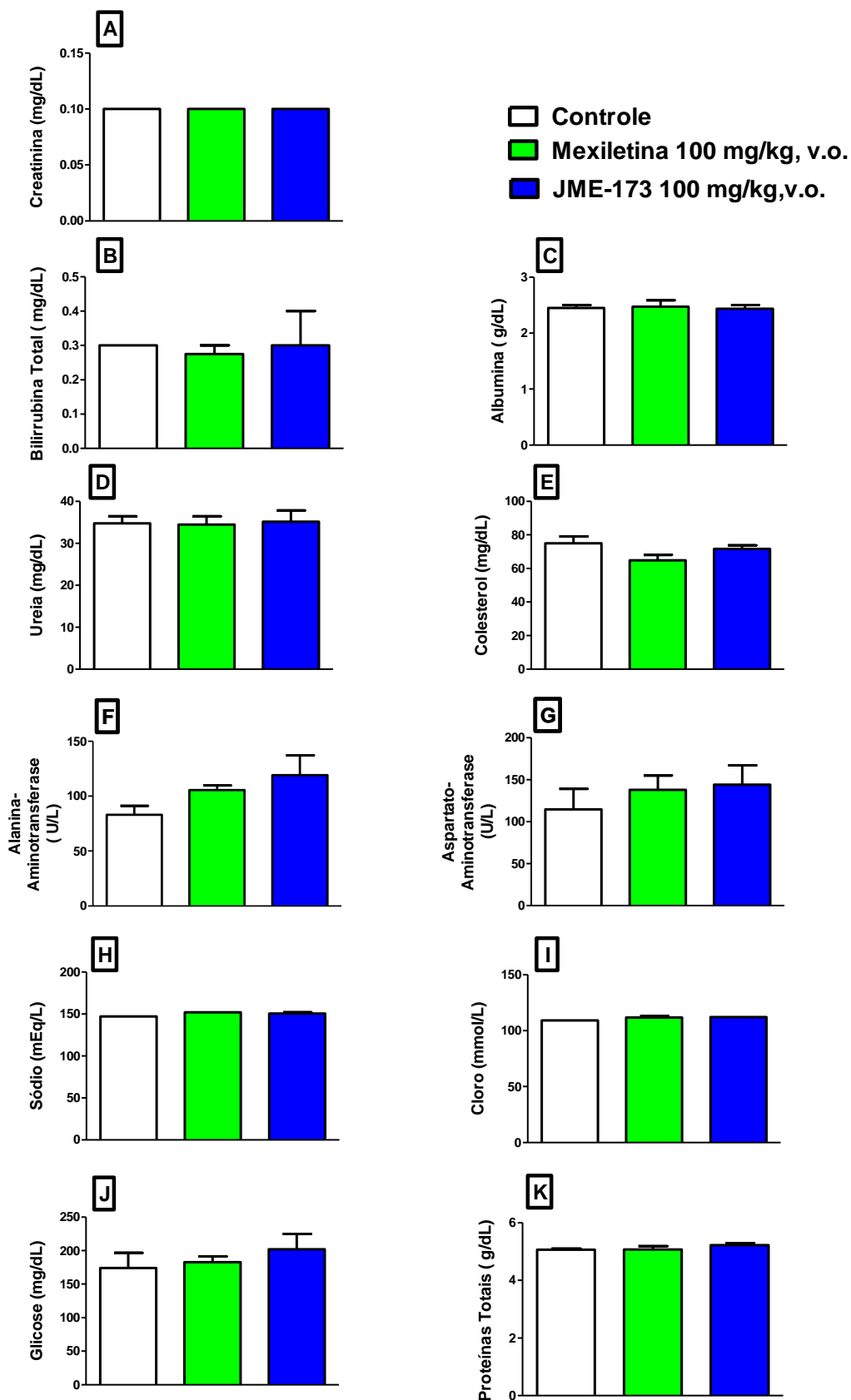


Figura 4.3 - Análise bioquímica do sangue dos animais submetidos ao tratamento contínuo com mexiletina ou JME-173. Camundongos A/J foram tratados, por via oral, com água destilada ou com 100 mg/Kg de mexiletina, JME-173, 5 vezes na semana, durante 6 semanas. Análise dos níveis de creatinina (A), bilirrubina total (B), albumina (C), ureia (D), colesterol (E), alanina-aminotransferase (F), aspartato-aminotransferase (G), sódio (H), cloro (I), glicose (J) e proteínas totais (K) no sangue dos animais. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 2-4 animais.

4.2. Desenvolvimento e caracterização da suspensão de nanocápsulas contendo JME-173

4.2.1. Estudo fatorial

A partir do estudo fatorial, avaliamos duas possíveis variáveis que poderiam afetar a preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico, contendo JME-173: o tipo de polímero (PCL ou Eudragit® S-100) e a proporção de JME-173 e TCM na formulação (1:2, 1:1 e 2:1). Baseado nas proporções e constituintes utilizados, conforme apresentado na Tabela 3.1 do capítulo 3 (Materiais e Métodos), foram desenvolvidas 6 formulações de nanocápsulas contendo o composto, a partir do método de deposição interfacial de polímeros biodegradáveis pré-formados. O método de preparação gerou suspensões aquosas de aspecto leitoso e homogêneo, sem a formação de precipitado ou separação de fases. A análise por difração de laser evidenciou que as formulações apresentaram diferentes diâmetros e distribuição de tamanho. As formulações utilizando PCL como polímero apresentaram diâmetro de 713 nm, 491 nm e 851 nm, com distribuição de tamanho de 5.7, 3.8 e 2.1 para as proporções JME-173:TCM de 1:2 (Figura 4.4A), 1:1 (Figura 4.4B) e 2:1 (Figura 4.4C), respectivamente. Enquanto que as suspensões utilizando Eudragit® S-100 como polímero apresentaram diâmetro de 3041 nm, 218 nm e 120 nm, com distribuição de tamanho de 1.4, 0.9 e 0.8 para as proporções JME-173:TCM de 1:2 (Figura 4.5A), 1:1 (Figura 4.5B) e 2:1 (Figura 4.5C), respectivamente. Tal análise demonstrou que a formulação utilizando o Eudragit® S-100 como polímero e contendo 75% de JME-173 em 25% de TCM (proporção de 2:1) apresentou as condições nanométricas requeridas, como pode ser observado pelo menor diâmetro e distribuição de tamanho das partículas, sendo, portanto, selecionada para o prosseguimento do trabalho.

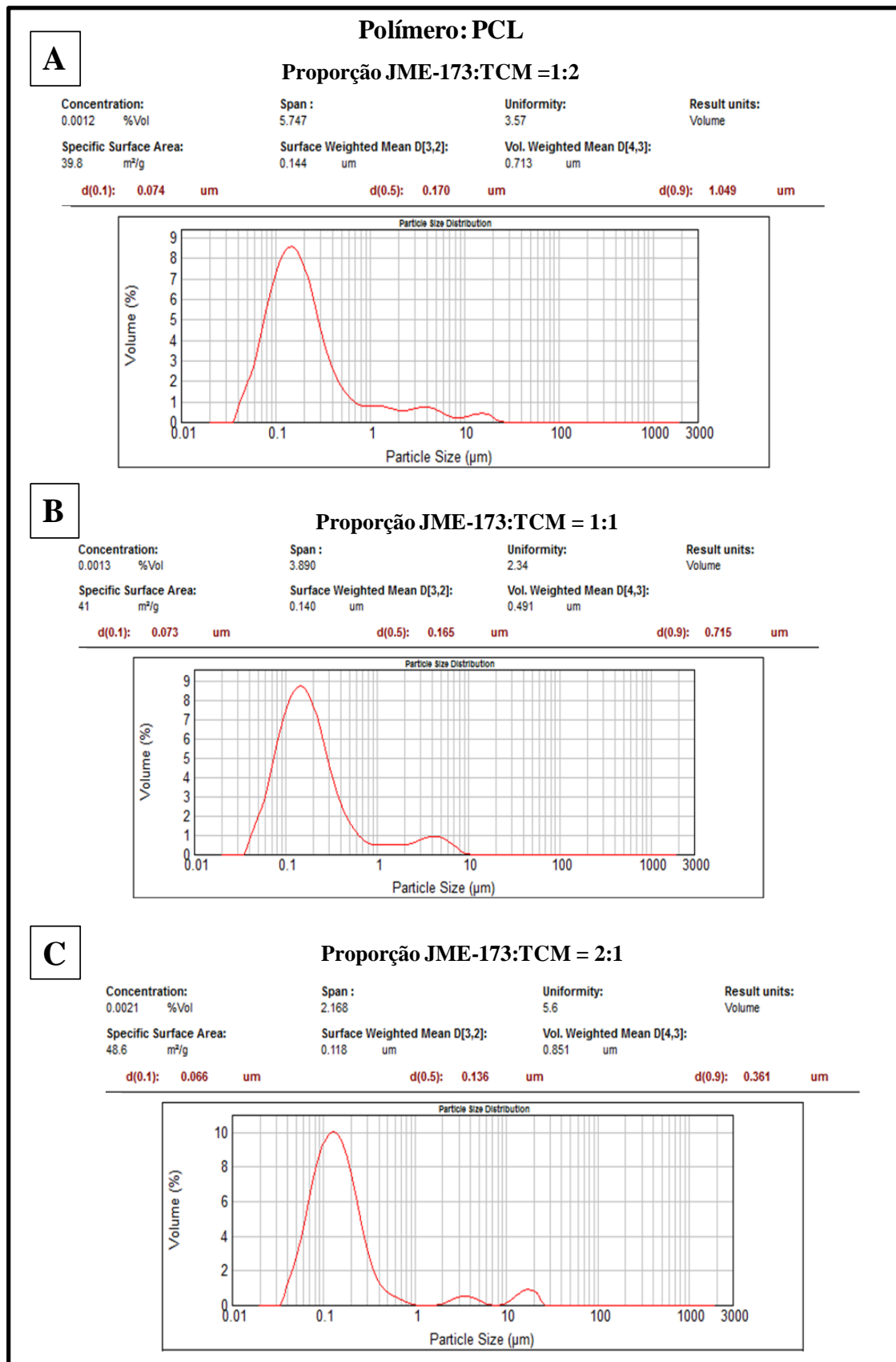


Figura 4.4 – Avaliação do diâmetro médio e distribuição de partículas da suspensão de nanocápsulas revestidas com PCL na proporção de JME-173 em triglicerídeos de cadeia média de 1:2 (A); 1:1 (B) e 2:1 (C), através de difratometria a laser. A granulometria e distribuição de tamanho de partículas foram medidos em uma suspensão contendo JME-173 nanoencapsulado por difração de luz laser utilizando um analisador de partículas Mastersizer® (Malvern). O espectro de curva gaussiana polidispersa no intervalo de 0,01 a 3000 µm foi obtido para nanocápsulas recém preparadas a partir da média de 3 análises consecutivas da mesma amostra.

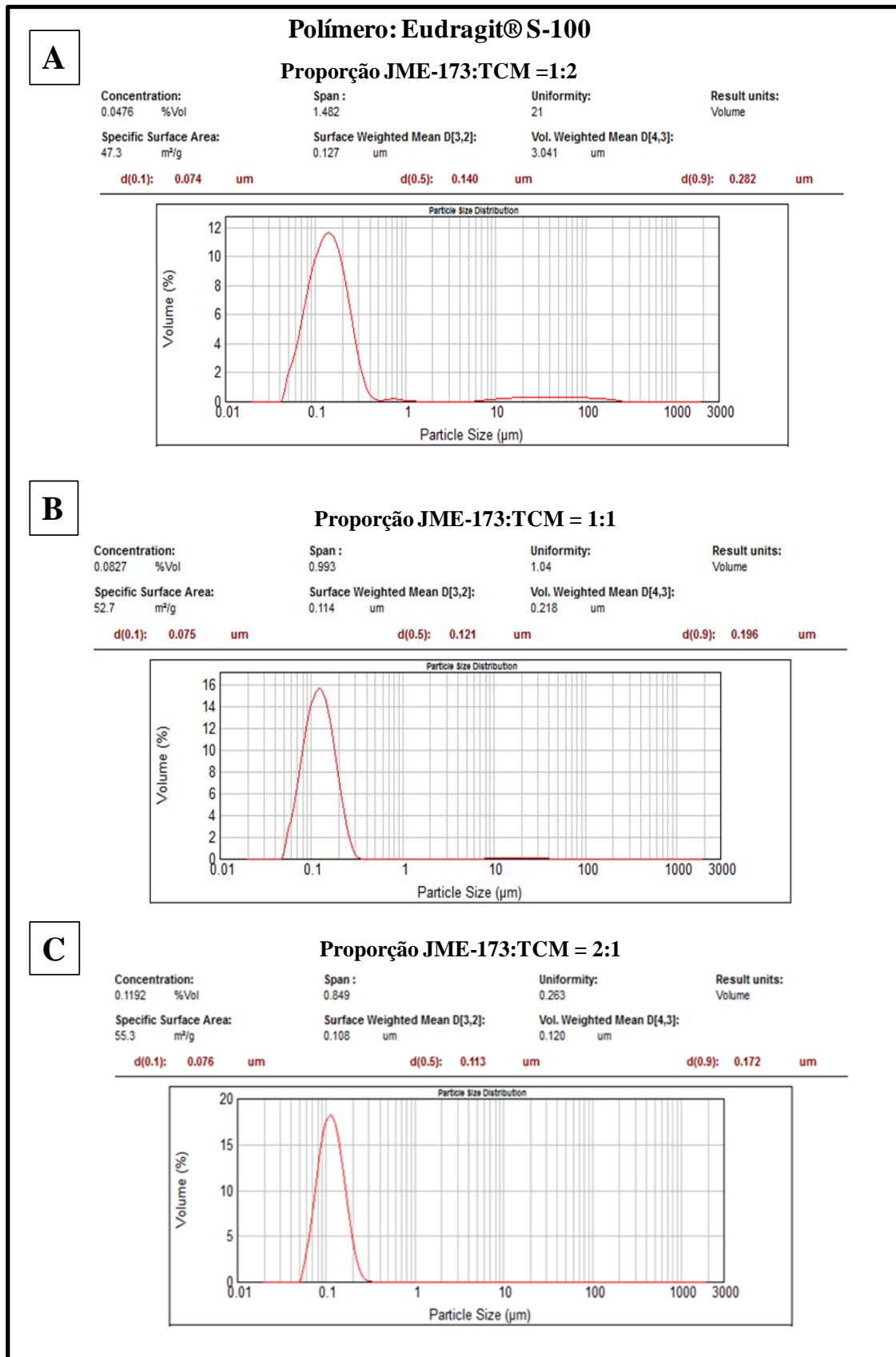


Figura 4.5 – Avaliação do diâmetro médio e distribuição de partículas da suspensão de nanocápsulas revestidas com Eudragit® S-100 na proporção de JME-173 em triglicerídeos de cadeia média de 1:2 (A); 1:1 (B) e 2:1 (C), através de difratometria a laser. A granulometria e distribuição de tamanho de partículas foram medidos em uma suspensão contendo JME-173 nanoencapsulado por difração de luz laser utilizando um analisador de partículas Mastersizer® (Malvern). O espectro de curva gaussiana polidispersa no intervalo de 0,01 a 3000 µm foi obtido para nanocápsulas recém preparadas a partir da média de 3 análises consecutivas da mesma amostra.

4.2.2. Caracterização físico-química

Visando uma melhor caracterização da suspensão de escolha (polímero Eudragit® S-100, proporção de 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente), avaliamos o diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta, através do equipamento o equipamento Zetasizer®. Através de espalhamento de luz dinâmica e mobilidade eletroforética observou-se que a formulação de nanocápsulas utilizando Eudragit® S-100 como polímero e proporção de JME-173 em TCM de 2:1 apresentou diâmetro médio de 183,6 nm (Figura 4.6) e potencial zeta de -39,9 mV (Figura 4.7). De acordo com o baixo índice de polidispersão observado, pode-se sugerir que as partículas apresentam distribuição monomodal sem a presença de populações micrométricas.

Com o objetivo de avaliar o teor do princípio ativo presente na formulação e a eficiência de encapsulação, desenvolvemos e validamos um método analítico de cromatografia, possibilitando determinar com precisão e exatidão o teor de JME-173 em cada lote de formulação preparada. A detecção de 1 mg/mL JME-173 livre em acetonitrila está demonstrada na Figura 4.8A. A curva de calibração contendo concentrações crescentes de JME-173 (50 – 350 µg/mL) apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,99 (Figura 4.8B) e gerou a equação da reta: $Y=3251x-4565,1$, utilizada para análises de teor do composto e eficiência de encapsulação.

A análise da concentração de princípio ativo presente na formulação e a taxa de encapsulação foi realizada em amostras das suspensões de nanocápsulas contendo JME-173, após detecção por CLAE-UV. A tabela 4.1 nos mostra que as formulações apresentaram teor médio de $94,9 \pm 1,4\%$ em relação ao valor teórico de 10 mg/mL de JME-173 na formulação. Enquanto que, a tabela 4.2 mostra que o método apresentou $97,2 \pm 0,5\%$ de eficiência de encapsulação de JME-173. O pH das formulações de nanocápsulas, avaliado diretamente em potenciômetro, foi de $3,8 \pm 0,1$ (Tabela 4.3). Um resumo contendo todos os valores relacionados à caracterização físico-química das formulações de nanocápsulas contendo JME-173 está apresentado na Tabela 4.4.

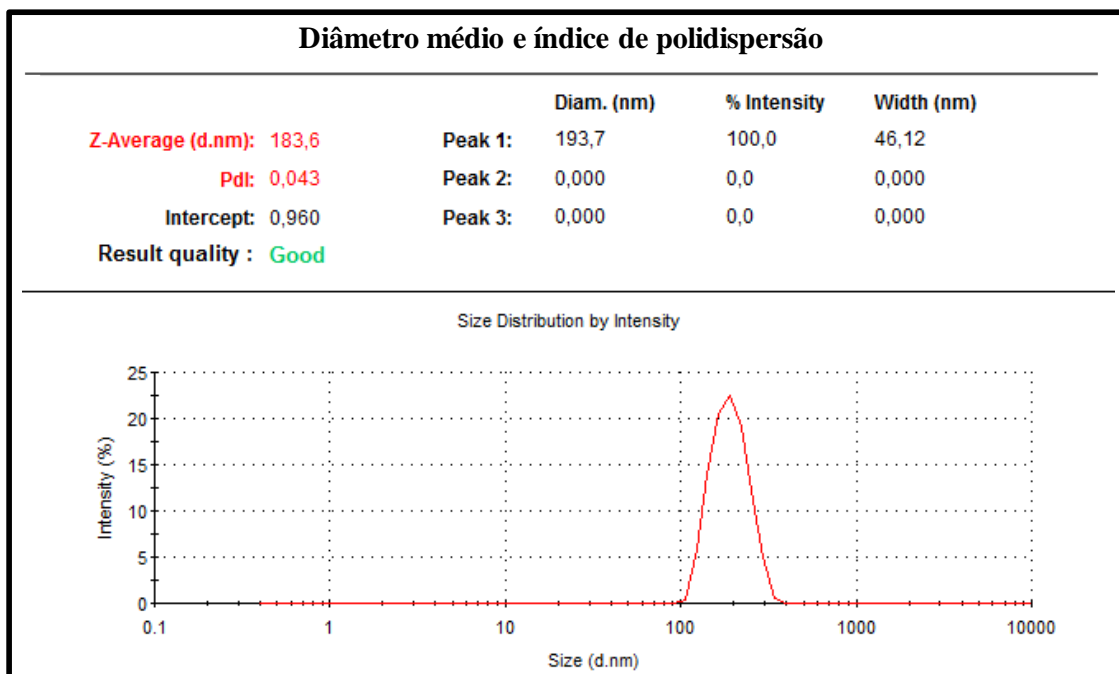


Figura 4.6 – Avaliação do diâmetro médio e do índice de polidispersão de nanocápsulas contendo JME-173 (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente). A granulometria das partículas e o índice de polidispersão foram medidos em uma suspensão contendo JME-173 nanoencapsulado por espalhamento dinâmico de luz utilizando um analisador de partículas Zetasizer® (Malvern). O espectro de curva gaussiana polidispersa no intervalo de 0,1 a 10.000 nm foi obtido para nanocápsulas recém preparadas a partir da média de 3 análises consecutivas da mesma amostra.

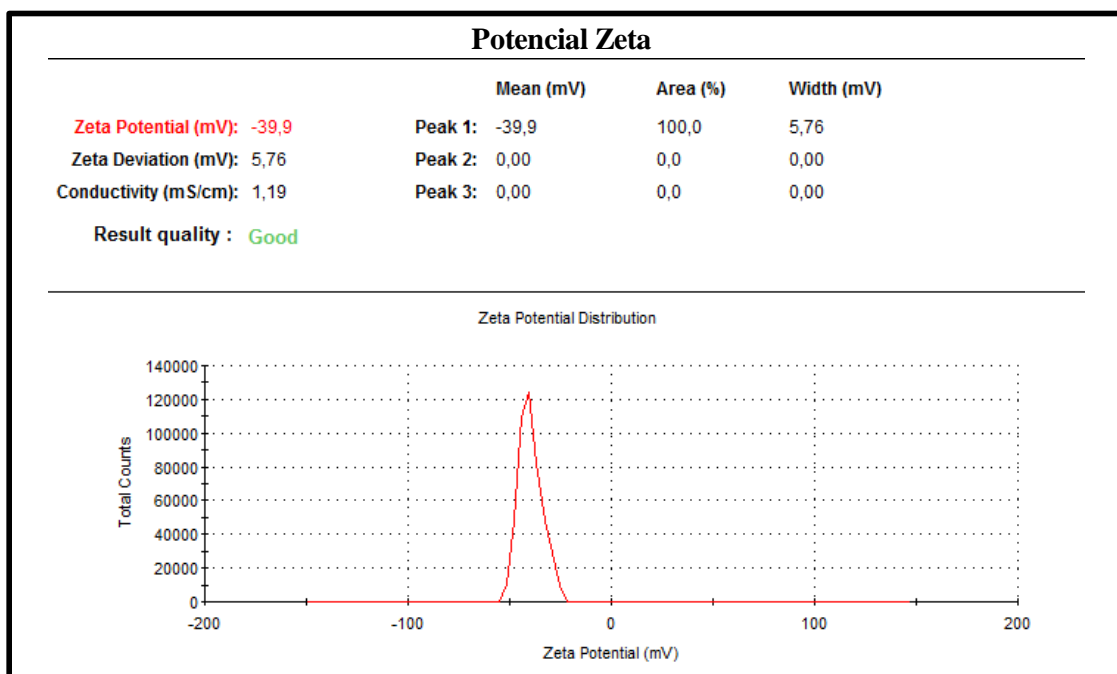


Figura 4.7 – Avaliação do potencial zeta de nanocápsulas contendo JME-173 (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente), através de mobilidade eletroforética. O potencial zeta foi avaliado em uma suspensão contendo JME-173 nanoencapsulado, por mobilidade eletroforética das partículas, utilizando o equipamento Malvern Zetasizer. O espectro de curva no intervalo de -200 a 200 mV foi obtido para nanocápsulas recém preparadas a partir da média de 3 análises consecutivas da mesma amostra.

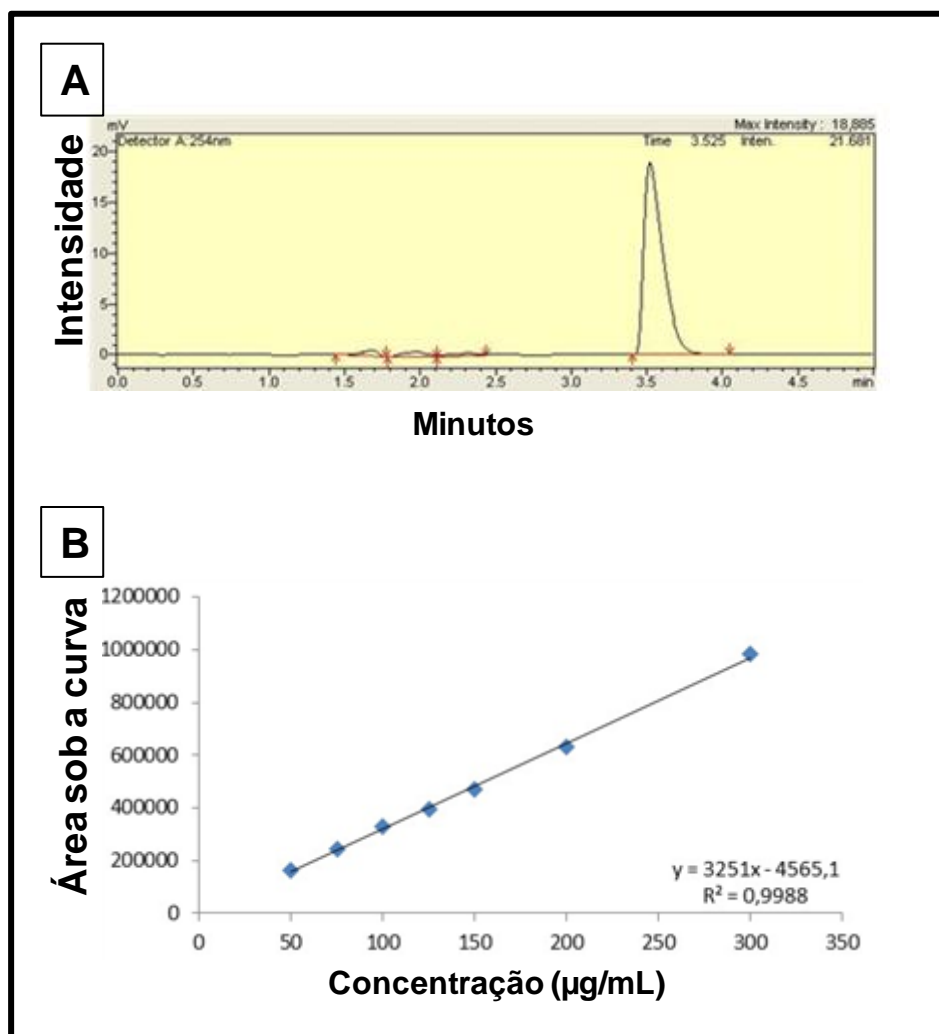


Figura 4.8 – Detecção e curva de calibração de JME-173 livre obtido por HPLC. Cromatograma ilustrando a detecção do JME-173 solubilizado em Acetonitrila (1 mg/mL), analisado por HPLC (A); Curva, Equação da reta e R^2 obtidos a partir da área sob a curva de 7 concentrações diferentes de JME-173 livre (50 – 350 µg/mL) (B).

Lote	Área sob a curva (y)	Equação da reta	Concentração (µg/mL)	Concentração Teórica (µg/mL)	Teor de JME-173 na formulação
1	472660	$y=3251 - 4565,1$	146,79	150	97,9 %
2	472660	$y=3251 - 4565,2$	139,68	150	93,1 %
3	472660	$y=3251 - 4565,3$	140,82	150	93,9 %

Tabela 4.1 – Doseamento da concentração experimental de JME-173 presente na formulação de nanocápsulas (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente). Nanocápsulas foram rompidas através de sonicação e solubilização em acetonitrila. O teor total de JME-173 presente na amostra foi obtido por HPLC. Os dados foram obtidos a partir da média de 6 amostras diferentes em cada lote.

Lote	Área	Concentração (µg/mL)	Fórmula	Eficiência de encapsulação
1	917198	283,53207	$\frac{((CF-C) \times 100)}{100}$	97,2 %
2	861317	266,34341		97,3 %
3	904742	279,05068		97,2 %

Tabela 4.2 – Eficiência de encapsulação do JME-173 na formulação (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente). A determinação da taxa de encapsulação foi realizada conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.4.5). Os dados foram obtidos a partir da média de 6 amostras diferentes em cada lote.

Lote	Área
1	3,8
2	3,6
3	3,9

Tabela 4.3 - Determinação de pH da formulação nanocápsulas contendo JME-173 (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente). A avaliação de pH foi obtida pela análise com potenciômetro.

	Média
Diâmetro médio (Mastersizer)	120 nm
Diâmetro médio (Zetasizer)	183 nm
Potencial Zeta	- 39, 9 mV
Teor Experimental	97%
Eficiência de encapsulação	3,8

Tabela 4.4 – Caracterização físico-química das nanopartículas contendo JME-173 (Eudragit® S-100, 2:1 de JME-173 e TCM, respectivamente). Parâmetros: Diâmetro médio das partículas, potencial zeta, Teor experimental, eficiência de encapsulação e pH das formulações.

4.3. Avaliação farmacológica da formulação de JME-173 nanoencapsulado

4.3.1. Efeito do tratamento com JME-173 (50 mg/Kg) nanoencapsulado sobre o infiltrado de células inflamatórias induzido por LPS no lavado bronchoalveolar

Visando comparar o efeito do composto JME-173 livre e nanoencapsulado sobre a resposta inflamatória pulmonar utilizamos o modelo de inflamação pulmonar no qual camundongos foram submetidos a uma provocação intranasal com LPS (25 µg/25 µl). Como esperado, os achados mostrados na Figura 4.9A indicam que os animais desafiados com LPS, sem tratamento ou tratados apenas com nanocápsulas branca (sem JME-173), apresentaram um aumento significativo do número de leucócitos totais, 18 h após a última instilação com o estímulo inflamatório. O tratamento com JME-173 livre (50 mg/Kg) não reduziu o infiltrado leucocitário no lavado, enquanto que o tratamento com o composto nanoencapsulado, na mesma dose, reduziu fortemente o influxo de células inflamatórias, com contagens que se aproximaram aos níveis basais. A análise diferencial do infiltrado inflamatório, realizada em citoesfregaços corados com May-Grunwald-Giemsa, mostrou que o acúmulo leucocitário resultou do recrutamento majoritariamente neutrofílico (Figura 4.9B), e também de macrófagos (Figura 4.9C). A análise revelou que somente o tratamento com JME-173 nanoencapsulado diminuiu, de maneira estatisticamente significativa, o aporte de neutrófilos e de macrófagos do BAL quando comparado ao grupo apenas estimulado com LPS.

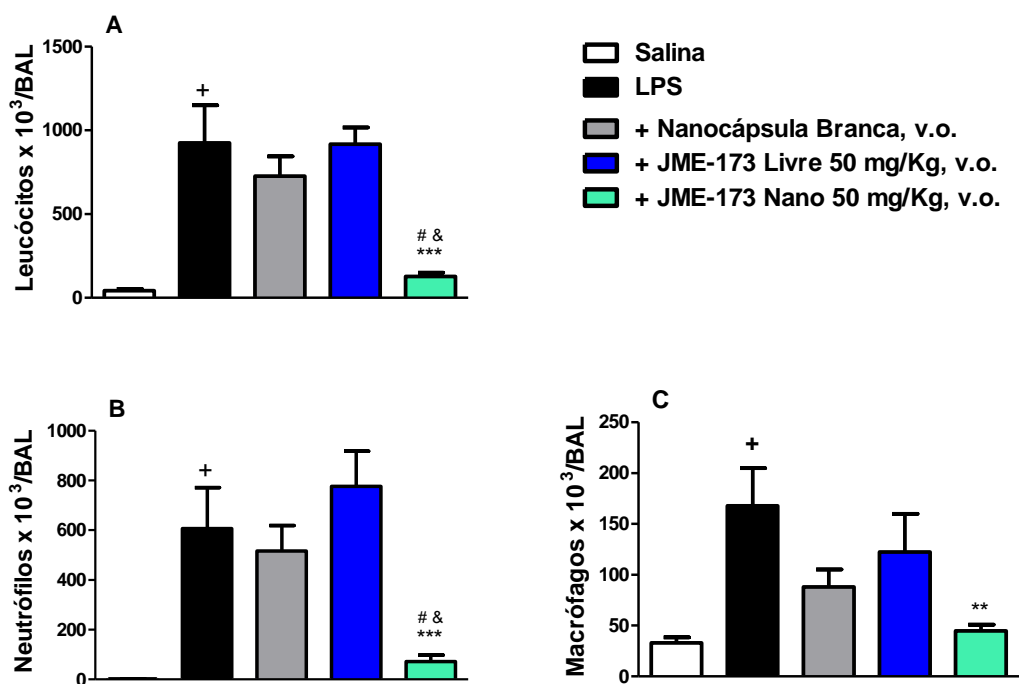


Figura 4.9 – Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre o influxo de células inflamatórias no BAL de camundongos instilados com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 livre ou nanoencapsulado (50 mg/Kg) ou com nanocápsulas branca 4 h antes da instilação com LPS. A análise quantitativa de leucócito total (A) foi realizada por microscopia ótica com auxílio da câmara de Neubauer, enquanto que a análise do número de neutrófilos (B) e macrófagos (C) foi realizada em citoesfregaços corados com May Grunwald – Giemsa, 18 horas após a provocação com LPS. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 10 animais. + p <0,05 em relação ao grupo desafiado com salina; ** p <0,01;*** p <0,001 em relação ao grupo desafiado com LPS. & p <0,05 em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com nanocápsulas branca. # p <0,05 em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com JME-173 livre.

4.3.2. Efeito do tratamento com JME-173 (50 mg/Kg) nanoencapsulado sobre a atividade de MPO no pulmão

Visando confirmar o efeito da administração de JME-173 nanoencapsulado sobre os níveis de neutrófilos presentes no pulmão, comparamos o efeito do tratamento com o composto livre e o nanoencapsulado sobre a atividade de MPO presente no tecido pulmonar, 18 h após o estímulo com LPS. Os achados representados na Figura 4.10 mostraram que os animais desafiados com LPS apresentaram um aumento significativo nos níveis de MPO quando comparados ao grupo desafiado com salina. O tratamento com nanocápsulas brancas ou com JME-173 (50 mg/Kg) livre não alteraram o aumento nos níveis de MPO. O tratamento com JME-173 nanoencapsulado, no entanto, reduziu drasticamente o aumento dos níveis de MPO quando comparado ao grupo LPS.

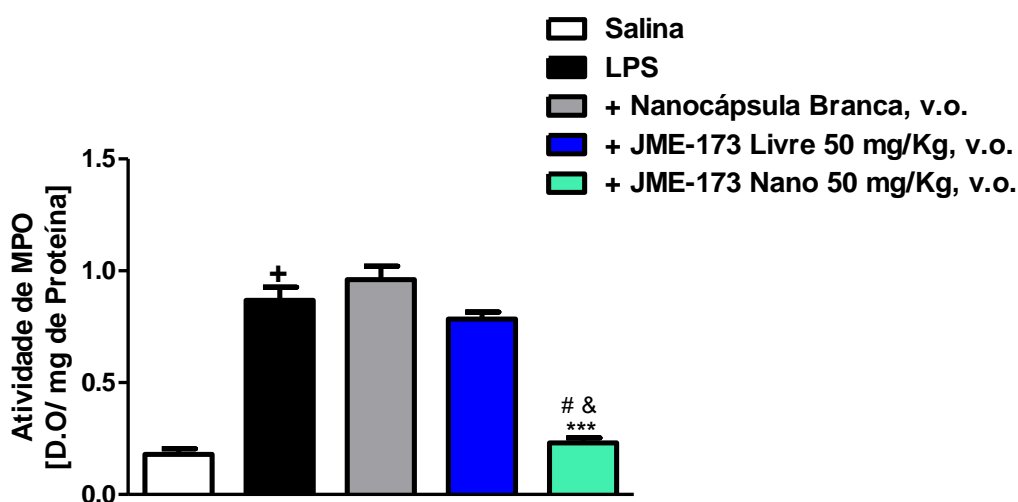


Figura 4.10 – Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre a atividade de MPO no pulmão de camundongos instilados com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 livre ou nanoencapsulado (50 mg/Kg) ou com nanocápsulas branca 4 h antes da instilação com LPS. A dosagem de MPO presente no tecido pulmonar foi realizada, por ensaio enzimático, 18 horas após a provocação com LPS. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 10 animais. $+p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com salina; $***p < 0,001$ em relação ao grupo desafiado com LPS. $^{\&}p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com nanocápsulas branca. $^{\#}p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com JME-173 livre.

4.3.3. Efeito do tratamento com JME-173 (50 mg/Kg) nanoencapsulado sobre a produção de citocinas induzidas por LPS

A quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar foi realizada através da técnica de ELISA em homogenatos de pulmão obtidos 18 h após a provocação antigênica. Especial ênfase foi dada a algumas citocinas relevantes no contexto da inflamação pulmonar induzida por LPS. A quantificação dos mediadores inflamatórios no tecido pulmonar, apresentada na Figura 4.11, mostrou que a instilação com LPS resultou em aumento na produção de IL-1 β (Figura 4.11A), KC/CXCL1 (Figura 4.11B), MCP-1/CCL2 (Figura 4.11C) e RANTES/CCL5 (Figura 4.11D), em comparação com o grupo salina. As mesmas figuras mostraram ainda que o tratamento com JME-173 nanoencapsulado (50 mg/Kg) reduziu os níveis desses mediadores inflamatórios, enquanto que o tratamento com a molécula livre ou com o veículo nanocápsulas brancas não impactou sobre a redução dos níveis das citocinas analisadas.

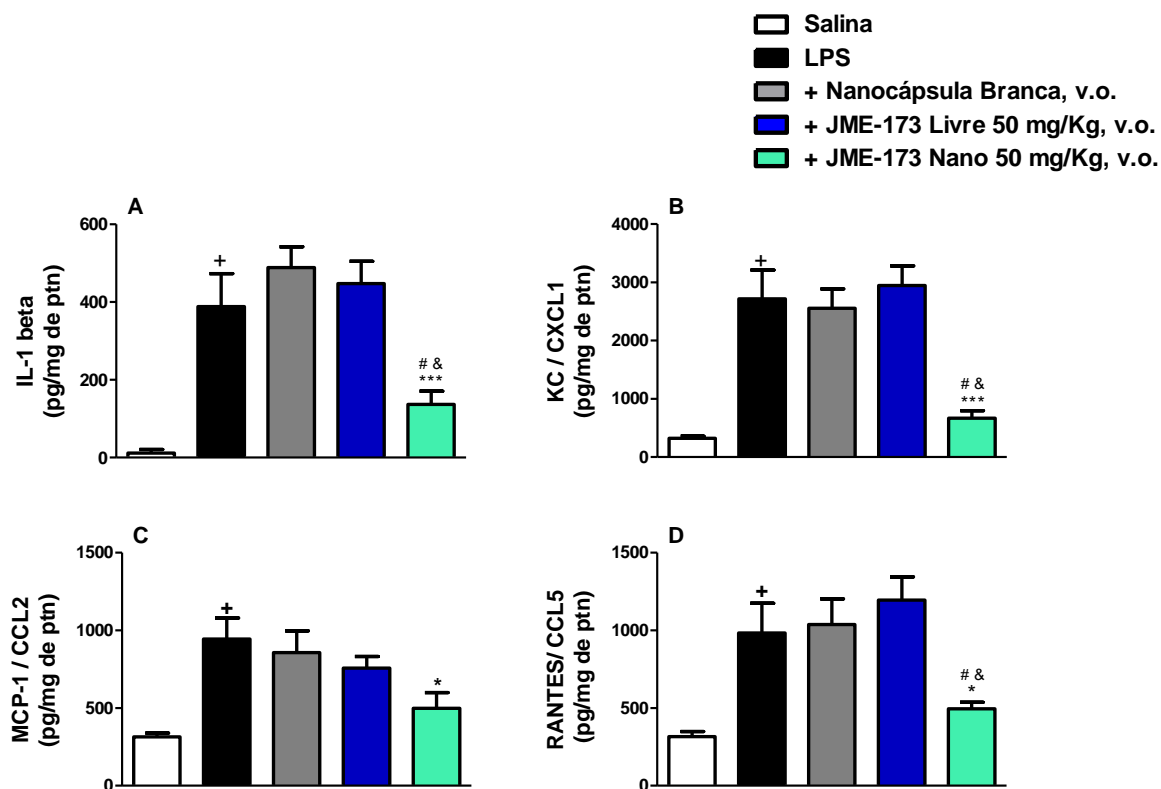


Figura 4.11 – Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos, 18 horas após a instilação com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 livre ou nanoencapsulado (50 mg/Kg) ou com nanocápsulas branca 4 horas antes da instilação com LPS. A análise foi realizada pela técnica de ELISA em homogenatos do tecido pulmonar. Foram quantificados os níveis de IL-1 β (A); KC/CXCL1 (B); MCP-1/CCL2 (C) e Rantes/CCL5 (D). Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 7-10 animais. ⁺ $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com salina; ^{*} $p < 0,05$; ^{***} $p < 0,001$ em relação ao grupo desafiado com LPS. [&] $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com nanocápsulas branca. [#] $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com JME-173 livre.

4.3.4. Efeito comparativo do tratamento com JME-173 livre ou nanoencapsulado (50 mg/kg) sobre a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas induzida por provocação com LPS

Avaliamos o efeito do tratamento com JME-173 sobre a hiperresponsividade brônquica, através de pletismografia barométrica de corpo inteiro, 18 h após o último desafio. Os dados apresentados na Figura 4.12 indicaram que aerolizações com concentrações crescentes de metacolina revelaram um marcado estado de hiper-reatividade brônquica, indicado pelo aumento de elastância pulmonar, nos animais desafiados com LPS, em comparação aos desafiados com salina. O tratamento com nanocápsulas brancas, utilizada como controle veículo, não apresentou efeito na redução de elastância pulmonar, enquanto que o tratamento com JME-173 livre ou nanoencapsulado, na dose de 50 mg/Kg, inibiram, de maneira significativa, tal fenômeno.

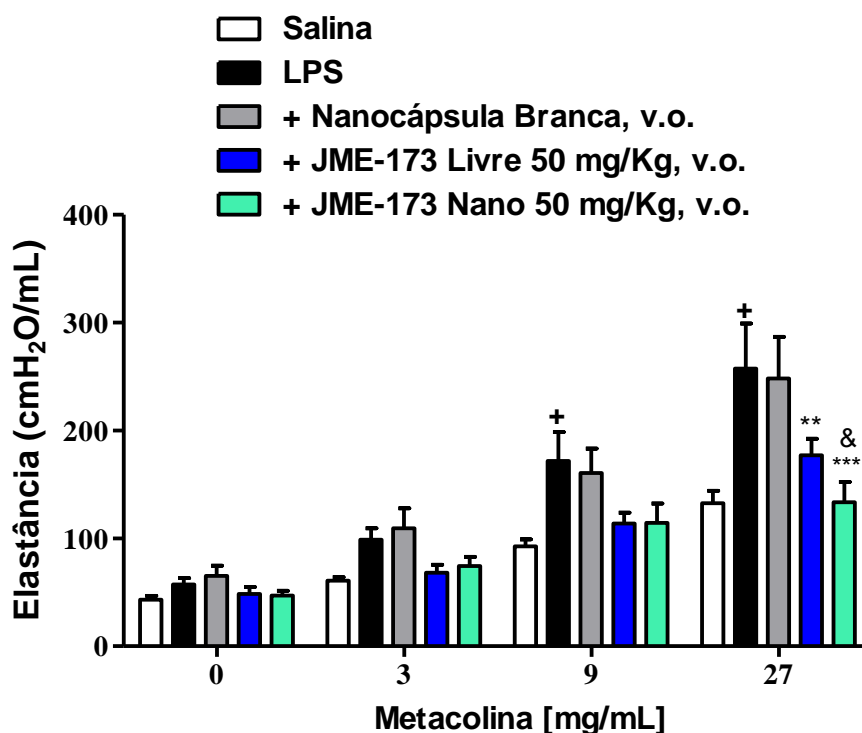


Figura 4.12 – Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre a hiper-reatividade das vias aéreas, 18 horas após provocação com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 livre ou nanoencapsulado (50 mg/Kg) ou com nanocápsulas branca 4 horas antes da instilação com LPS. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 10 animais. $+p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com salina; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ em relação ao grupo desafiado com LPS. $&p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com nanocápsulas branca.

4.3.5 - Efeito do tratamento com JME-173 (8 e 25 mg/Kg) nanoencapsulado sobre o influxo de células inflamatórias no BAL

Tendo em vista os resultados positivos obtidos com a administração de 50 mg/Kg de JME-173 nanoencapsulado sobre alterações cruciais na inflamação pulmonar induzida por LPS, avaliamos o efeito de doses menores do composto (8 e 25 mg/Kg) sobre tais parâmetros. A análise do influxo de células no BAL, mostrada na Figura 4.13A, indicou que o número aumentado de leucócitos totais, induzido pela instilação intranasal com LPS, não foi revertido pelo tratamento com as nanocápsulas branca, nem após tratamentos com JME-173 livre em ambas as doses testadas. Entretanto, o tratamento com o princípio ativo nanoencapsulado, nas doses de 8 e 25 mg/Kg, continuou evidenciando efeito de inibição praticamente total do infiltrado de leucócitos no BAL. A análise diferencial evidenciou que somente o tratamento com nanocápsulas contendo JME-173, em ambas as doses utilizadas, reverteu de maneira significativa o aumento de neutrófilos (Figura 4.13B) e de macrófagos (Figura 4.13C), quando comparado ao grupo de animais instilados com LPS sem tratamento.

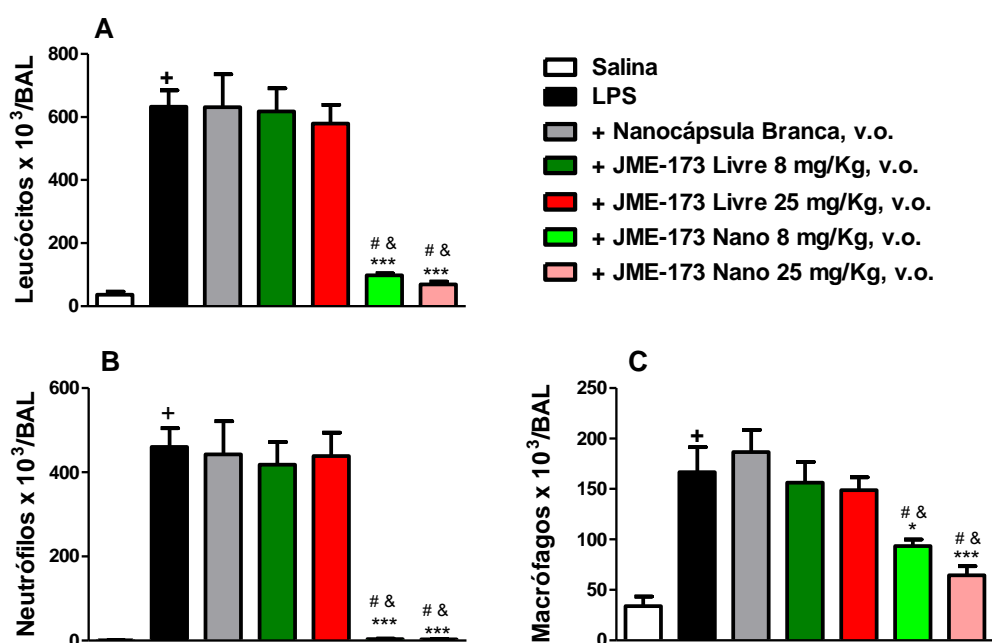


Figura 4.13 – Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre o influxo de células inflamatórias no BAL de camundongos instilados com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 livre ou nanoencapsulado (8 ou 25 mg/Kg) ou com nanocápsulas branca 4 horas antes da instilação com LPS. A análise quantitativa de leucócito total (A), foi realizada por microscopia ótica com auxílio da câmara de Neubauer, enquanto que a análise do número de neutrófilos (B) e macrófagos (C) foi realizada em citoesfregaços corados com May Grunwald – Giemsa, 18 horas após a provocação com LPS. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 6-8 animais. ⁺ $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com salina; ^{*} $p < 0,05$; ^{***} $p < 0,001$ em relação ao grupo desafiado com LPS. [&] $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com nanocápsulas branca. [#] $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com a dose equivalente de JME-173 livre.

4.3.6. Efeito do tratamento com JME-173 (8 e 25 mg/Kg) nanoencapsulado sobre os níveis de MPO no tecido pulmonar

A avaliação dos níveis de MPO em amostras de homogenato de tecido pulmonar, 18 h após a instilação com o antígeno, indicou o aumento no quantitativo de neutrófilos no tecido pulmonar nos grupos LPS sem tratamento e tratados com nanocápsulas branca ou com JME-173 livre (8 e 25 mg/Kg) (Figura 4.14). A análise mostrou ainda que este aumento foi completamente abolido pela administração oral de JME-173 nanoencapsulado em ambas as doses administradas.

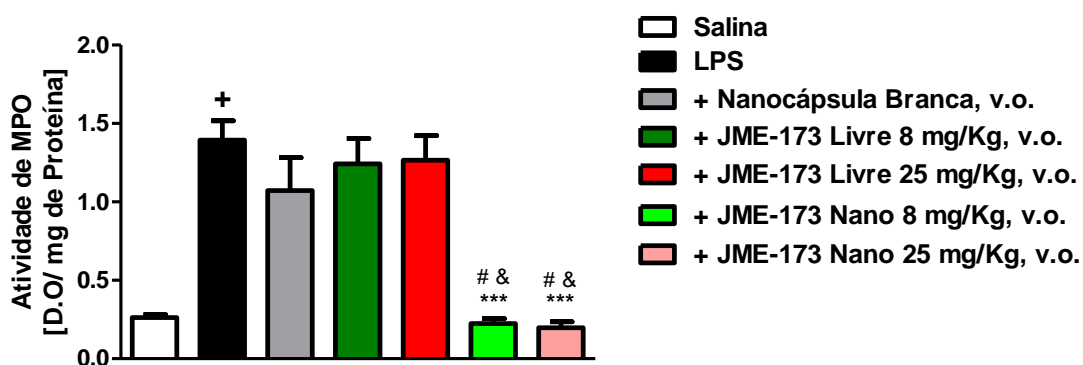


Figura 4.14 – Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre a atividade de MPO no pulmão de camundongos instilados com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 livre ou nanoencapsulado (8 ou 25 mg/Kg) ou com nanocápsulas branca 4 horas antes da instilação com LPS. A dosagem de MPO presente no tecido pulmonar foi realizada por ensaio enzimático, 18 horas após a provocação com LPS. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 6-7 animais. + p <0,05 em relação ao grupo desafiado com salina; *** p <0,001 em relação ao grupo desafiado com LPS. & p <0,05 em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com nanocápsulas branca. # p <0,05 em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com a dose equivalente de JME-173 livre.

4.3.7. Efeito do tratamento com JME-173 (8 e 25 mg/Kg) nanoencapsulado sobre a produção de citocinas induzida por provocação com LPS

No que concerne a quantificação de mediadores inflamatórios, os achados dos níveis de citocinas, apresentados na Figura 4.15, revelaram que o desafio com LPS promoveu um aumento significativo na produção de IL-1 β (Figura 4.15A), KC/CXCL1 (Figura 4.15B), MCP-1/CCL2 (Figura 4.15C) e RANTES/CCL5 (Figura 4.15D) no tecido pulmonar, em relação ao grupo controle, estimulado apenas com salina. A quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar mostrou também que o tratamento oral com JME-173 livre ou com nanocápsulas branca não inibiu, de maneira significativa, o aumento nos níveis dessas citocinas. O tratamento com nanocápsulas de JME-173, nas doses de 8 e 25 mg/Kg, apresentaram, mais uma vez, marcado efeito preventivo sobre aumento dos níveis dos mediadores inflamatórios induzido por LPS.

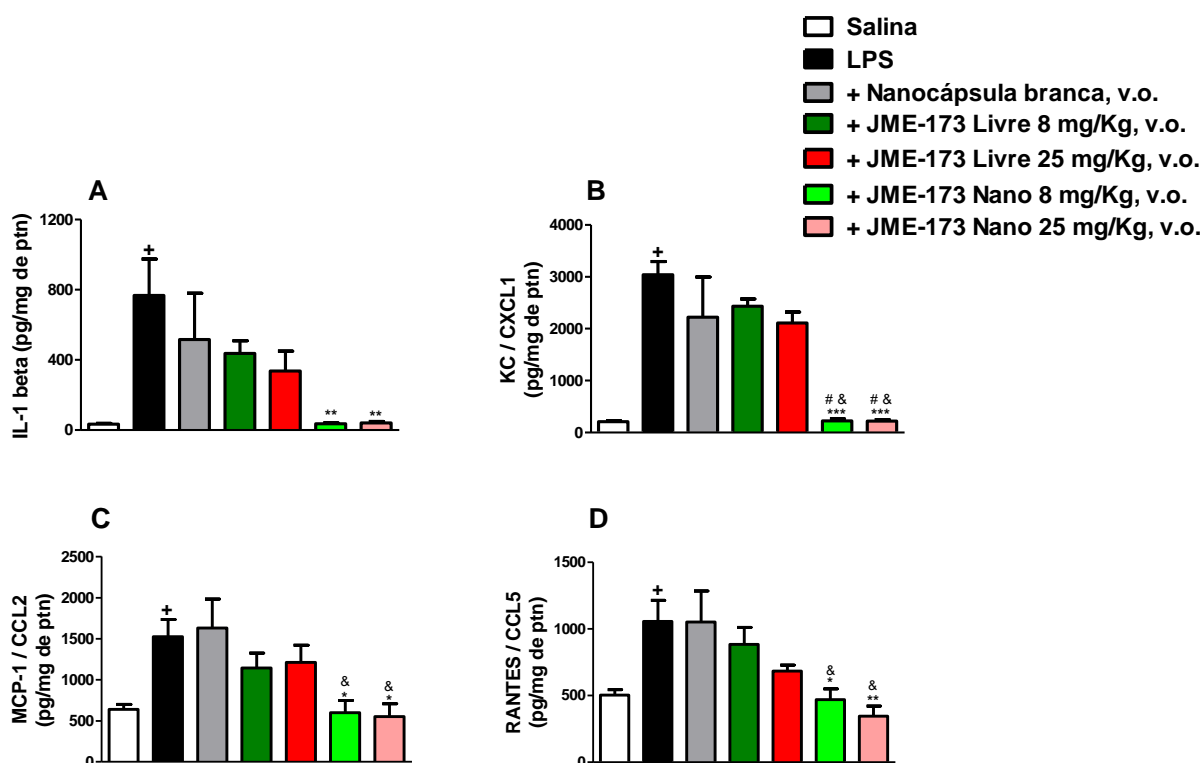


Figura 4.15 – Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos, 18 horas após a instilação com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 livre ou nanoencapsulado (8 ou 25 mg/Kg) ou com nanocápsulas branca 4 horas antes da instilação com LPS. A análise foi realizada pela técnica de ELISA em homogenatos do tecido pulmonar. Foram quantificados os níveis de IL-1 β (A); KC/CXCL1 (B); MCP-1/CCL2 (C) e Rantes/CCL5 (D). Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 3-7 animais. + p <0,05 em relação ao grupo desafiado com salina; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 em relação ao grupo desafiado com LPS. & p <0,05 em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com nanocápsulas branca. # p <0,05 em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com a dose equivalente de JME-173 livre.

4.3.8. Efeito do tratamento com JME-173 (8 e 25 mg/Kg) nanoencapsulado sobre a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas induzida por provocação com LPS

Os achados de alteração de função pulmonar mostrados na Figura 4.16 indicam que aerolizações com concentrações crescentes de metacolina resultaram no aumento significativo da elastância pulmonar do grupo desafiado com LPS, em comparação ao grupo desafiado com salina. Mais uma vez, o tratamento com JME-173 nanoencapsulado, em ambas dosagens empregadas (8 e 25 mg/Kg) inibiu o estado de hiper-reatividade observado no grupo estimulado com LPS, enquanto que os tratamentos com nanocápsulas brancas ou com JME-173 livre (8 e 25 mg/Kg) mostraram-se claramente inativos.

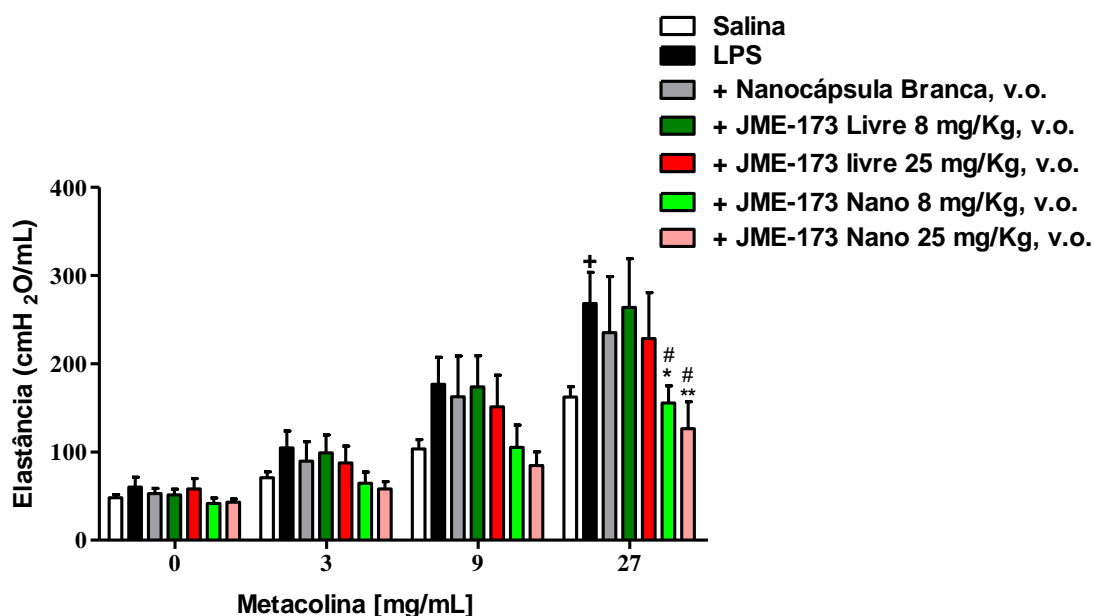


Figura 4.16 – Efeito do tratamento oral com JME-173 livre e nanoencapsulado sobre a hiper-reatividade das vias aéreas, 18 horas após provocação com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 livre ou nanoencapsulado (8 ou 25 mg/Kg) ou com nanocápsulas vazias 4 horas antes da instilação com LPS. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 7-8 animais. $+p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com salina; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ em relação ao grupo desafiado com LPS. $#p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com LPS e tratado com a dose equivalente de JME-173 livre.

4.4. Desenvolvimento e caracterização de formulação de nanocápsulas secas contendo JME-173

4.4.1. Preparo e caracterização físico-química

Apesar dos resultados promissores observados com a suspensão de JME-173, a formulação apresentou baixa estabilidade ao longo de semanas de preparação. De fato, foi possível observar que em menos de um mês após o seu preparo, a emulsão apresentou evidente separação de fases, de maneira irreversível. Devido às limitações encontradas com as suspensões de nanocápsulas contendo JME-173, utilizou-se uma técnica previamente validada (187), em *Mini Spray-Dryer* para a secagem destas formulações, objetivando uma formulação final na forma de pó seco. Para tanto, foram novamente preparadas suspensões de nanocápsulas de Eudragit® S-100 contendo JME-173, a partir do método de deposição interfacial de polímeros biodegradáveis, onde foi adicionado à suspensão resultante da nanoprecipitação o adjuvante de secagem, lactose (Figura 4.17) ou l-leucina (Figura 4.18) nas proporções de 0,5, 1 ou 1,5% (m/v) e levada diretamente ao *spray-dryer* para secagem, ocorrendo a remoção da acetona, etanol e da água em uma única etapa, conforme descrito em Materiais e métodos (item 3.1.3).

Os pós sub-micrométricos obtidos por *Spray-Dryer* foram colocados no dispersor do equipamento Mastersizer, utilizando salina como meio dispersante, e foram realizadas as medidas de diâmetro. A avaliação da distribuição de tamanho indicou que formulações contendo o adjuvante de secagem l-leucina a 0,5% (Figura 4.18A) apresentou maior quantidade de partículas com diâmetro majoritariamente nanométrico e menor faixa de partículas de tamanho micrométrico, quando comparadas às formulações com lactose 0,5% (Figura 4.17A), 1% (Figura 4.17B) ou 1,5% (Figura 4.17C), ou nas formulações contendo l-leucina a 1% (Figura 4.18B) ou 1,5% (Figura 4.18C). Tal dado demonstrou que formulações secas contendo a leucina 0,5% apresentaram melhor condição de secagem, sendo, portanto, selecionadas para o prosseguimento do trabalho.

A análise do teor experimental de JME-173 na formulação utilizando o adjuvante de secagem leucina a 0,5% foi avaliada por cromatografia. A análise da concentração de princípio ativo presente na formulação demonstrou que as formulações apresentaram teor médio de $79,3 \pm 1,9$ % de JME-173 (Tabela 4.5).

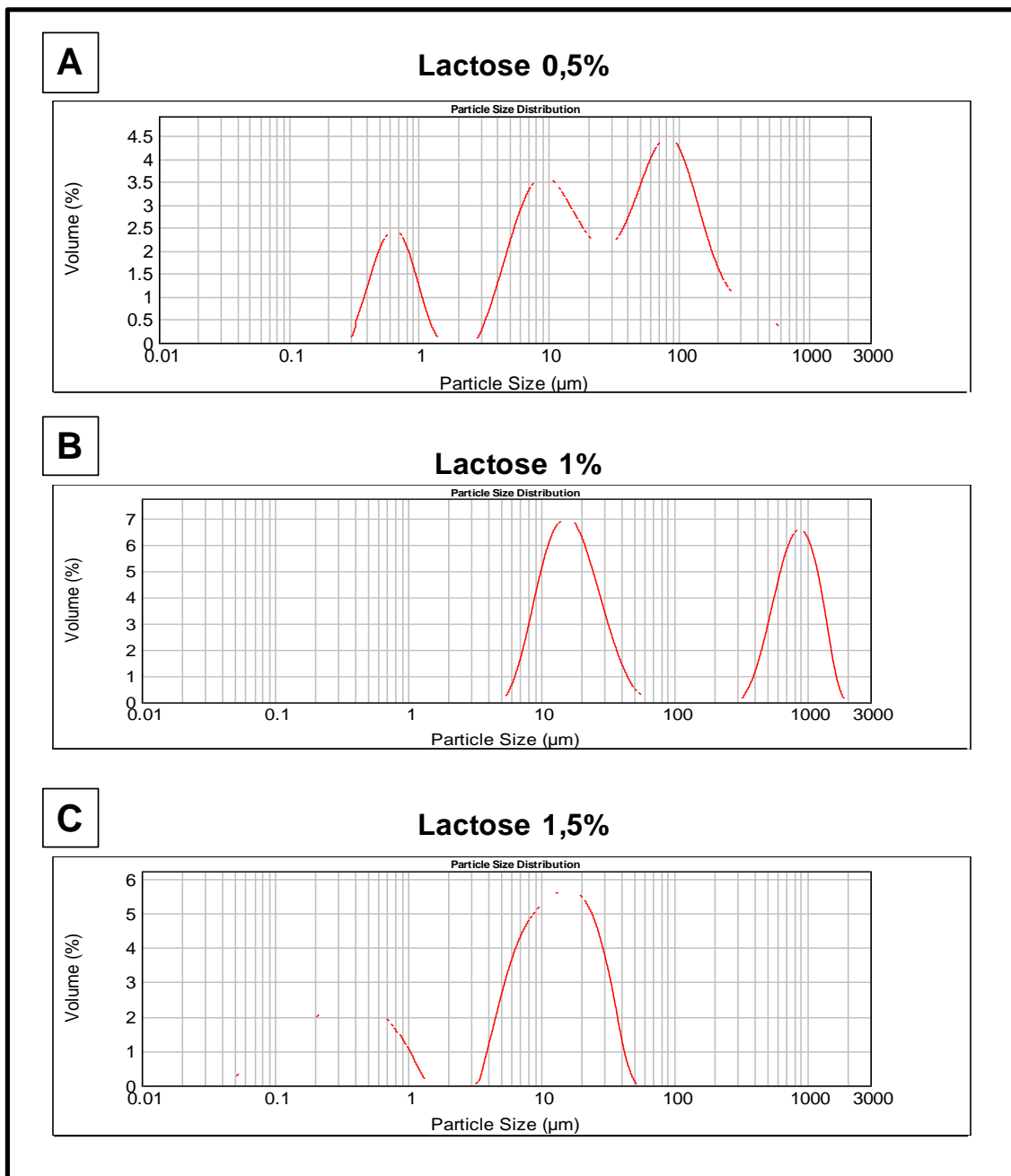


Figura 4.17 – Avaliação da distribuição de tamanho, através de difratometria a laser, de formulações secas de JME-173 nanoencapsulado, contendo o adjuvante de secagem lactose em diferentes proporções. A granulometria das partículas e o índice de polidispersão foram medidos em formulações secas contendo JME-173 nanoencapsulado, utilizando o adjuvante lactose nas proporções de 0,5% (A), 1% (B) ou 1,5% (C) (m/v), ressuspendida em salina, por difração de luz laser utilizando um analisador de partículas Malvern Mastersizer. O espectro de curva gaussiana polidispersa no intervalo de 0,01 a 3000 μm foi obtido para nanocápsulas recém preparadas a partir da média de 3 análises consecutivas da mesma amostra, e utilizado como referencial de distribuição de diâmetro.

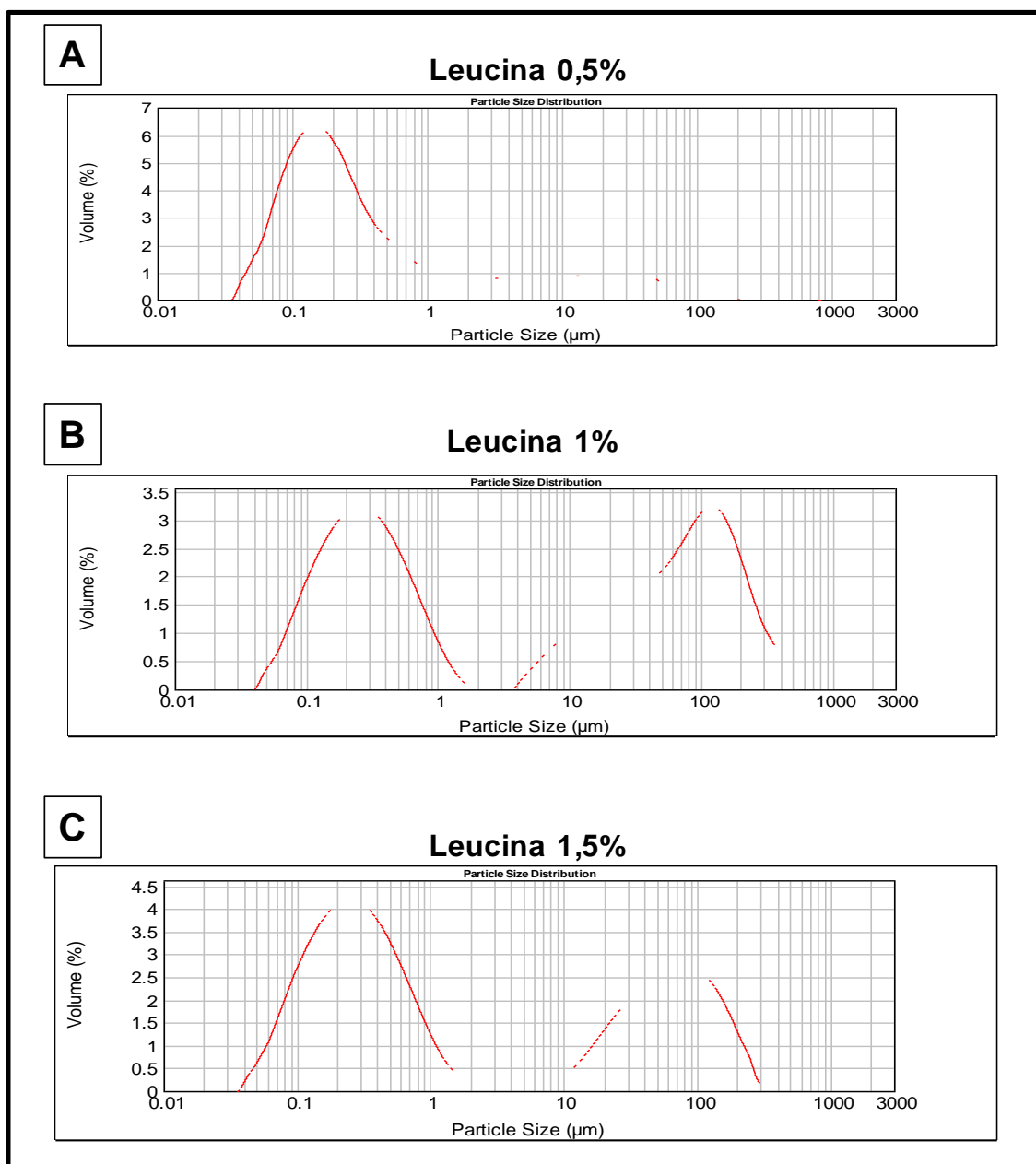


Figura 4.18 – Avaliação da distribuição de tamanho, através de difratometria a laser, de formulações secas de JME-173 nanoencapsulado, contendo o adjuvante de secagem l-leucina em diferentes proporções. A granulometria das partículas e o índice de polidispersão foram medidos em formulações secas contendo JME-173 nanoencapsulado, utilizando o adjuvante leucina nas proporções de 0,5% (A), 1% (B) ou 1,5% (C) (m/v), ressuspensa em salina, por difração de luz laser utilizando um analisador de partículas Malvern Mastersizer. O espectro de curva gaussiana polidispersa no intervalo de 0,01 a 3000 µm foi obtido para nanocápsulas recém preparadas a partir da média de 3 análises consecutivas da mesma amostra, e utilizado como referencial de distribuição de diâmetro.

Lote	Área sob a curva	Concentração (µg/mL)	Ponto médio da curva (µg/mL)	Teor de JME-173 na formulação
1	416335	112,828982	151,97	74,2 %
2	441575	119,7508776	151,97	78,8 %
3	461133	125,1145239	151,97	82,3 %
4	459047	124,5424528	151,97	82 %

Tabela 4.5 – Doseamento da concentração experimental de JME-173 presente na formulação seca de nanocápsulas. Nanocápsulas secas foram ressuspensas em salina e posteriormente rompidas através de sonicação e solubilização em acetoneitrila. O teor total de JME-173 presente na amostra foi obtido por HPLC. Os dados foram obtidos a partir da média de 6 amostras diferentes em cada lote.

4.5. Avaliação farmacológica da formulação seca de nanocápsulas contendo JME-173

4.5.1. Efeito da formulação seca de nanocápsulas de JME-173 sobre o acúmulo de leucócitos no lavado broncoalveolar e no pulmão após provocação com LPS

Com o objetivo de avaliar se a formulação seca de nanocápsulas, contendo JME-173, seria capaz de reter as propriedades anti-inflamatórias evidenciadas pela nanoformulação do composto preparado sob a forma de suspensão, realizamos um estudo comparativo do efeito de ambas as preparações sobre parâmetros importantes da inflamação pulmonar e hiperreatividade de vias aéreas induzidas por LPS. Para tanto, a formulação seca contendo JME-173 foi redispersa em salina imediatamente antes da administração por via oral aos camundongos, ocorrida 4 h antes da provocação com LPS. Os resultados indicam que os tratamentos com JME-173 nanoencapsulado (25 mg/Kg), sob a forma de suspensão ou pó redisperso, foram igualmente ativos no bloqueio do acúmulo de células inflamatórias no espaço bronchoalveolar (Figura 4.19A). Como claramente mostrado nas Figuras 4.19B e 4.19C, ambas as preparações praticamente aboliram o recrutamento de neutrófilos e macrófagos induzido por LPS nesse modelo. De forma semelhante, o tratamento com JME-173 nanoencapsulado em ambas as formulações também aboliu o aumento nos níveis de MPO no extrato pulmonar após provocação com LPS (Figura 4.20).

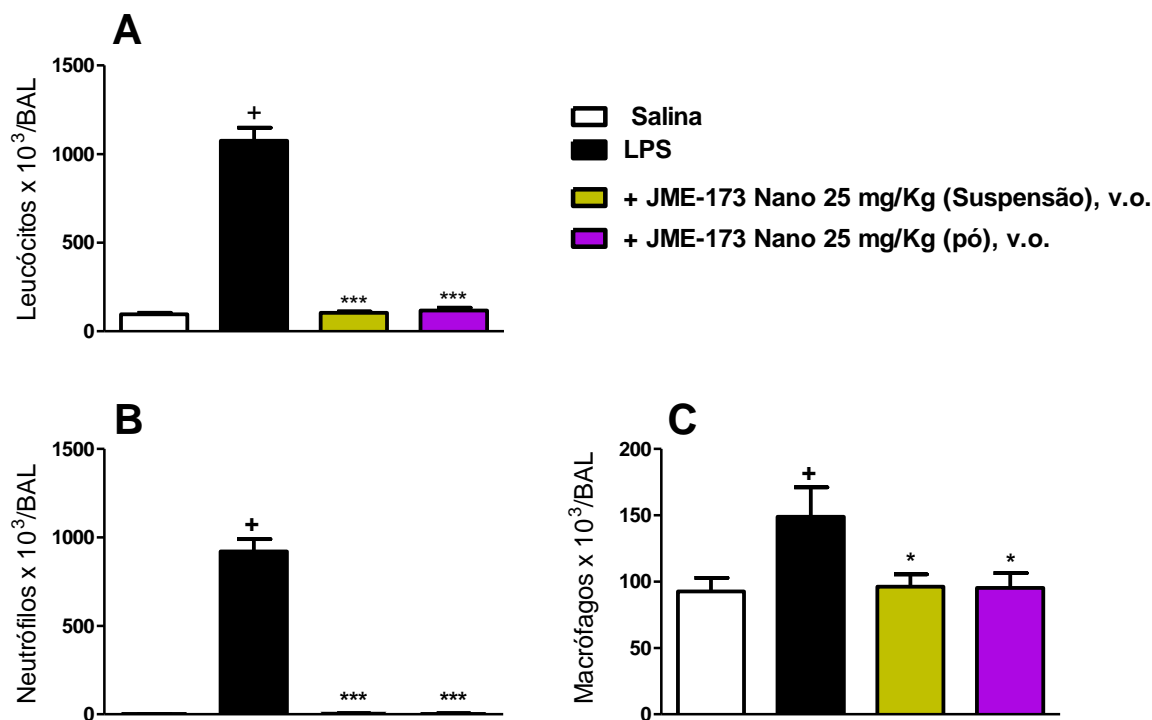


Figura 4.19 – Efeito do tratamento oral com JME-173 25 mg/Kg nanoencapsulado sobre o influxo de células inflamatórias no BAL de camundongos instilados com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 nanoencapsulado na dose de 25 mg/Kg (suspensão ou pó redisperso), 4 horas antes da instilação com LPS. A análise quantitativa de leucócito total (A), foi realizada por microscopia ótica com auxílio da câmara de Neubauer, enquanto que a análise do número de neutrófilos (B) e macrófagos (C) foi realizada em citoesfregaços corados com May Grunwald – Giemsa, 18 horas após a provocação com LPS. Os resultados são expressos como Média ± Erro Padrão da Média de 9-10 animais. + $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com salina; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo desafiado com LPS.

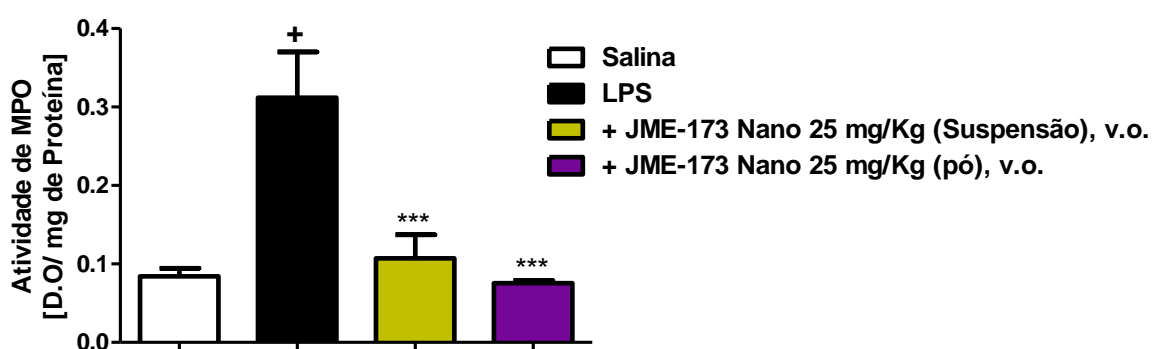


Figura 4.20 – Efeito do tratamento oral com JME-173 (25 mg/Kg) nanoencapsulado sobre a atividade de MPO no pulmão de camundongos provocados com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 nanoencapsulado (25 mg/Kg) (suspensão ou pó redisperso), 4 h antes da instilação com LPS. A dosagem de MPO presente no tecido pulmonar foi realizada por ensaio enzimático, 18 h após a provocação com LPS. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 10 animais. + p <0,05 em relação ao grupo desafiado com salina; *** p <0,001 em relação ao grupo desafiado com LPS.

4.5.2. Efeito do tratamento com JME-173 (25 mg/Kg) nanoencapsulado administrado sob a forma de pó redisperso sobre os níveis de citocinas após provocação com LPS

Comparamos ainda o efeito do tratamento com JME-173 nanoencapsulado, tanto suspensão quanto pó redisperso, sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias no pulmão dos camundongos instilados com LPS. Os dados revelaram que as formulações, tanto suspensão quanto pó redisperso reduziram, de maneira semelhante, os níveis aumentados de IL-1 β (Figura 4.21A), KC (Figura 4.21B) e MCP-1 (Figura 4.21C), se comparado ao grupo de animais não tratados e expostos ao estímulo inflamatório.

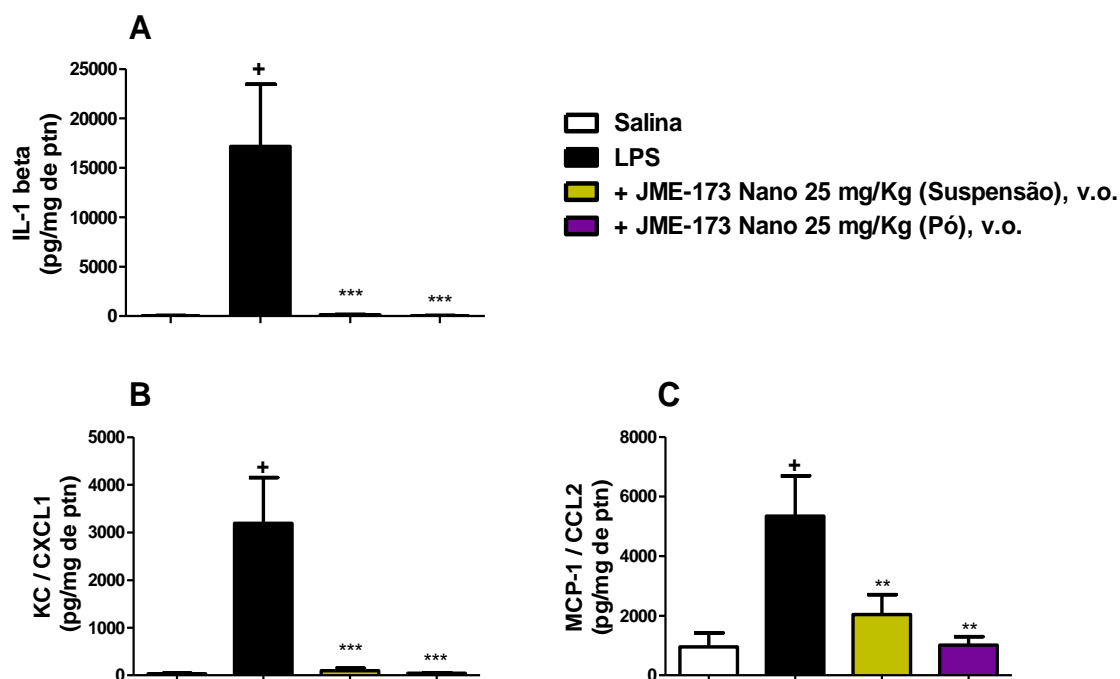


Figura 4.21 – Efeito do tratamento oral com JME-173 25 mg/Kg nanoencapsulado sobre os níveis de citocinas no pulmão de camundongos, 18 horas após a instilação com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 nanoencapsulado na dose de 25 mg/Kg (suspensão ou pó redisperso), 4 horas antes da instilação com LPS. A análise foi realizada pela técnica de ELISA em homogenatos do tecido pulmonar. Foram quantificados os níveis de IL-1 β (A); KC/CXCL1 (B) e MCP-1/CCL2 (C). Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 8 animais. + p <0,05 em relação ao grupo desafiado com salina; ** p <0,01 *** p <0,001 em relação ao grupo desafiado com LPS.

4.5.3. Efeito do tratamento com JME-173 nanoencapsulado suspensão e pó ressuspendido sobre a hiper-reatividade das vias aéreas induzida por provocação com LPS

Por fim, avaliamos o efeito das formulações de nanocápsulas, contendo JME-173, sobre a hiper-reatividade de vias aéreas observada nos animais instilados com LPS, após exposição ao broncoconstrictor metacolina. Observamos que a administração oral de JME-173 nanoencapsulado, sob a forma de pó redisperso na dosagem de 25 mg/Kg, foi equieficaz à nanoformulação preparada sob a forma de suspensão. Ambas aboliram a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas induzida por LPS (Figura 4.22).

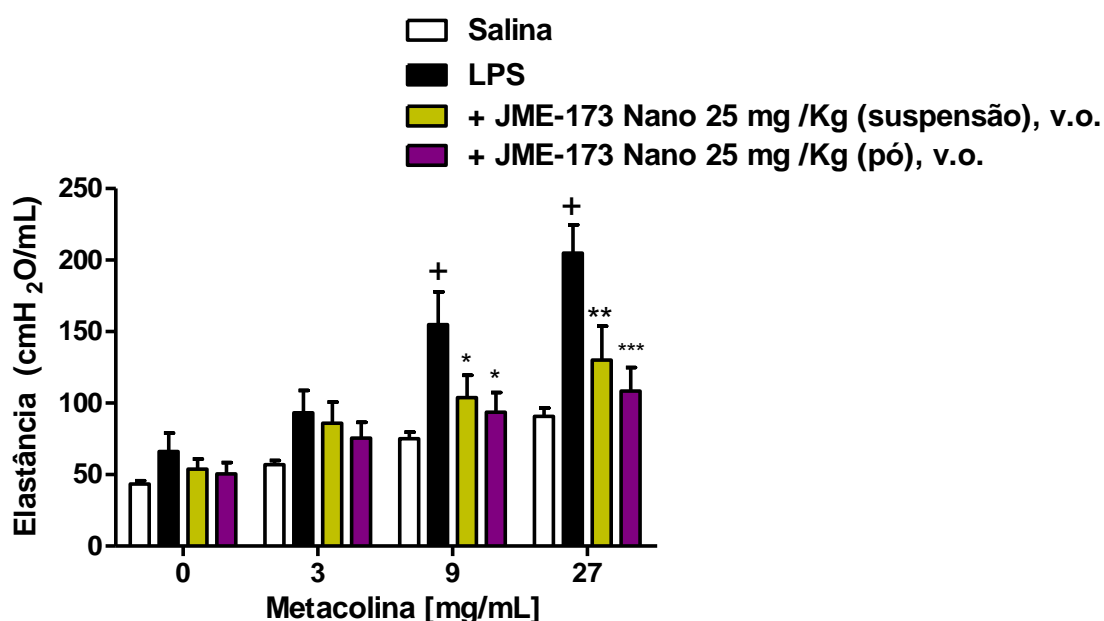


Figura 4.22 – Efeito do tratamento oral com JME-173 25 mg/Kg nanoencapsulado sobre a hiper-reatividade das vias aéreas, 18 horas após provocação com LPS. Camundongos A/J foram tratados com JME-173 nanoencapsulado na dose de 25 mg/Kg (suspensão ou pó redisperso), 4 horas antes da instilação com LPS. Os resultados são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média de 10 animais. + p <0,05 em relação ao grupo desafiado com salina; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 em relação ao grupo desafiado com LPS.

5. DISCUSSÃO

Doenças inflamatórias pulmonares são importantes problemas de saúde pública devido à alta prevalência, morbidade e mortalidade. Elas apresentam elevados custos sociais e econômicos, além da terapia, na maioria dos casos, ser pouco eficiente (8, 16, 193). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstram que análogos não anestésicos da mexiletina, apresentam propriedades combinadas de relaxamento de vias aéreas e bloqueio da resposta inflamatória pulmonar, quando administrados localmente, sugerindo tratar-se de autênticos protótipos na terapia contra doenças inflamatórias pulmonares. No entanto, o desafio consiste na otimização da atividade farmacológica do composto quando administrado por via oral. Sabe-se que a via oral melhora significativamente a adesão do paciente à terapia, sendo os medicamentos administrados oralmente responsáveis por mais de 50% das vendas no mercado farmacêutico global (169). As nanopartículas são dispositivos eficazes e versáteis para a entrega de drogas podendo atuar sobre diversas propriedades cruciais da molécula livre, tais como solubilidade, farmacocinética, biodistribuição e estabilidade *in vivo*, permitindo, em muitos casos, a administração do princípio ativo por vias que eram anteriormente ineficientes (194). No presente estudo, desenvolvemos, caracterizamos físico-quimicamente e avaliamos o efeito do tratamento oral com JME-173 nanoencapsulado, sob a forma de suspensão, sobre alterações patológicas cruciais observadas no pulmão de camundongos submetidos à provocação intranasal com LPS. Trata-se de um modelo de lesão pulmonar aguda caracterizado por inflamação pulmonar, tipicamente neutrofílica, e hiper-reatividade de vias aéreas. Além disso, iniciamos o desenvolvimento e a caracterização físico-química de uma formulação de nanocápsulas, contendo JME-173, sob a forma de pó seco, comparando os efeitos com o seu equivalente na forma de suspensão líquida, novamente tomando por base as alterações inflamatórias e de hiper-reatividade pulmonar induzidas pela provocação com LPS em camundongos.

A avaliação de possíveis efeitos tóxicos em sistemas *in vivo* é essencial para o processo de investigação de candidatos a fármacos. Nesse sentido, estudos pré-clínicos de toxicidade em roedores são interessantes na composição do *dossiê* de avaliação dos potenciais efeitos adversos de um produto em investigação (195). Os dados do nosso estudo revelaram que a administração repetitiva de alta dose diária de JME-173 (100 mg/kg, oral), por 6 semanas, não alterou parâmetros hematológicos e bioquímicos chaves, como o número de células no sangue e os níveis de moléculas marcadoras de lesão em órgãos vitais como rins, fígado ou vesícula biliar, indicando que o composto não apresenta potencial atividade tóxica nas condições empregadas. Tais dados vão ao encontro de estudos preditivos de toxicidade *in*

silico, realizados previamente em nosso laboratório, os quais apontaram para um escore de drogabilidade superior aquele estimado para o protótipo Mexiletina, utilizado clinicamente no tratamento de arritmias e dor neuropática (126). Entretanto, observou-se que o tratamento diário por 6 semanas com JME-173 (100 mg/Kg) resultou em perda de cerca de 10-15% do peso corporal dos animais. Conforme descrito na literatura, em análises de toxicidade de compostos é preconizado que perdas de peso a partir de 20-25% são consideradas efetivamente críticas (196, 197). Nesse sentido, embora nossos resultados apresentem valores de perda de peso que se encontram dentro do limite aceitável para tal parâmetro, novos experimentos são necessários para melhor entendimento do mecanismo envolvido nesse efeito. É do nosso interesse, por exemplo, elucidar se a perda de peso dos animais está associada a aspectos como diminuição de ingesta (ração e água), ou ainda a outros fatores metabólicos. De qualquer forma, observações macroscópicas de alguns tecidos e órgãos, realizadas 24 h após o último tratamento, revelaram a ausência de sinais de lesão no estômago, intestinos, fígado e rins, reforçando a ausência de toxicidade oral do JME-173 (dados não mostrados).

O método utilizado para o preparo das formulações foi o de deposição interfacial de polímeros biodegradáveis pré-formados, proposto por Fessi e colaboradores (186). Tal técnica é amplamente descrita na literatura por apresentar vantagens como ausência de monômeros tóxicos residuais e de reações cruzadas com o fármaco, além de ser mais facilmente controlável e de alto rendimento. O método é descrito também por apresentar elevadas taxas de encapsulação de princípios ativos com propriedades hidrofóbicas (198-200), sendo, por tal razão, um método adequado para nanoencapsulação do JME-173, composto altamente lipofílico. Em relação ao preparo das nanocápsulas, avaliamos dois diferentes polímeros (PCL e Eudragit® S-100) em proporções diferentes de JME-173 e TCM, visando selecionar a melhor condição de encapsulação. Os dados de distribuição de tamanho revelaram que as nanocápsulas, utilizando Eudragit® S-100 como polímero, em todas as proporções de JME-173:TCM testadas, apresentaram melhores resultados, se comparado com as formulações preparadas com PCL, indicando tal polímero como o ideal para a nanoencapsulação de JME-173. Estudos anteriores já indicaram que as propriedades dos polímeros utilizados no preparo de nanopartículas podem influenciar em características-chaves, como o seu diâmetro (201). De fato, um estudo de 2003 de Chernysheva e colaboradores demonstrou que através do preparo de nanopartículas sob controle rigoroso de parâmetros físico-químicos como concentração de polímeros, tipo de solvente orgânico e tempo de evaporação, a utilização de Eudragit® resultou em nanopartículas com diâmetro médio de 280-290 nm, enquanto que a utilização de PCL resultou em partículas maiores, com o tamanho médio de 450 nm (202),

corroborando assim o diâmetro menor das nanocápsulas revestidas com Eudragit® S-100 encontradas em nosso estudo. Um achado do mesmo grupo revelou que o diâmetro menor de nanopartículas apresentado pela utilização de Eudragit® pode ser explicado pela atração eletrostática de longo alcance entre os grupos trimetil amônio catiônicos e carbonila polares desse polímero, os quais não estão presentes na estrutura da PCL (203).

Diversos estudos na literatura demonstram que, além dos polímeros, os outros constituintes utilizados no preparo da formulação influenciam de maneira significativa nas características gerais das nanocápsulas. Por exemplo, o óleo inerte deve ser um solvente adequado para o princípio ativo, prevenindo a sua difusão e cristalização durante a preparação das nanocápsulas, sem degradar o polímero. O Miglyol®, constituído por uma mistura de triglicerídeos de cadeia média, foi utilizado em nosso sistema, devido ao diâmetro de nanocápsulas, geralmente pequenas, obtidas com a sua utilização (200, 204). Da mesma maneira, para se obter dispersões aquosas estáveis de nanocápsulas, é necessário incluir uma quantidade mínima de um tensoativo do tipo óleo-em-água. Utilizamos o Polissorbato 80 em nosso sistema, baseado em suas propriedades de redução de dimensões e aumento de estabilidade da dispersão coloidal, descritas na literatura (204). Além disso, já é descrito na literatura que, dependendo das propriedades físicas e da capacidade de dissolver o polímero e o fármaco, um solvente orgânico pode afetar diretamente o tamanho da partícula, o que, por sua vez, pode influenciar o desempenho geral da formulação (205). Os solventes utilizados no nosso estudo foram o etanol e acetona, os quais atuaram, principalmente, solubilizando os componentes oleosos em uma mistura e facilitando a dispersão do óleo como gotículas minúsculas na fase aquosa (206).

A caracterização físico-química de nanocápsulas recém-preparadas se faz necessária para o controle de qualidade do material desenvolvido. Além disso, é importante conhecer o sistema de nanopartículas com que se está trabalhando, uma vez que já é descrito na literatura que características como tamanho, pH e carga superficial, podem afetar a sua estabilidade física e influenciar na taxa de liberação da substância incorporada, além de atuar na interação com o meio biológico (207, 208).

Estudos relacionados com o diâmetro das partículas indicam que o tamanho e a forma podem influenciar na sua toxicidade ao afetar sítios de deposição, eliminação do organismo ou resultar em respostas biológicas como inflamação (209). De fato, um estudo de Carlson e colaboradores mostrou que a administração de nanopartículas de prata, com diâmetro de 15 nm, em cultura celular de macrófago resulta em uma atividade citotóxica, induzida, pelo menos em parte, por uma resposta pró-oxidante, enquanto que a administração das mesmas

nanopartículas com 50 nm, não induz tal resposta (210). Além disso, o monitoramento de mudanças na distribuição de tamanho das nanocápsulas também é importante pois pode indicar a tendência à agregação e/ou sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo (199). A espectroscopia de correlação de fótons (ou espalhamento de luz dinâmica) e difração de raios laser são técnicas muito utilizadas para a análise de tamanho e distribuição de diâmetro de partículas. Uma vantagem clara da difratometria laser é a cobertura de faixa ampla de diâmetro nanométrico para milimétrico, apesar de ser uma técnica menos precisa e menos sensível que a espectrometria de correlação de fótons. Portanto, é altamente recomendado o uso de ambos os métodos simultaneamente para uma análise mais precisa do diâmetro das partículas preparadas (208, 211, 212). Neste trabalho, o sistema de desenvolvimento permitiu a formação de nanocápsulas contendo JME-173 exibindo diâmetro médio de 120 a 180 nm quando avaliado por difratometria de laser e espectrometria de correlação de fótons, respectivamente. Em ambas as análises, as nanocápsulas apresentaram um baixo índice de polidispersão, indicando uma distribuição homogênea no diâmetro das partículas. Nossos dados estão em conformidade com os estudos de Frank e colaboradores, os quais demonstraram, através de espectroscopia de correlação de fótons, a obtenção de nanocápsulas com diâmetro médio de 185 nm, utilizando o Eudragit® S-100 como polímero, pelo método de deposição interfacial de polímero biodegradáveis pré-formados (213). Em estudo realizado por outro grupo de pesquisa, também foi possível observar que suspensão de nanopartículas constituídas por Eudragit® S-100 apresentou diâmetro médio de 172 nm (214), valores estes muito próximos ao encontrado em nosso estudo.

O potencial zeta reflete o potencial elétrico presente na superfície de partículas, sendo um parâmetro muito importante, pois permite previsões sobre a estabilidade de armazenamento de uma dispersão coloidal. Em geral, a agregação das partículas tem menos probabilidade de ocorrer por partículas altamente carregadas, positiva ou negativamente, devido à repulsão elétrica (199, 208, 211). Os dados do presente estudo demonstraram que nanocápsulas contendo JME-173 e revestidas por Eudragit® S-100 apresentaram um potencial zeta de -39 mV. É descrito na literatura que os polímeros constituintes das nanopartículas são componentes com grande capacidade de influenciar o potencial zeta de nanocápsulas presentes na formulação (199). De fato, foi possível observar em nosso estudo que as nanocápsulas exibiram uma carga de superfície altamente negativa, o que pode ser atribuído a característica do polímero utilizado, mais especificamente, o ácido metacrílico presente na composição do Eudragit® S-100 (213). Ademais, Prakash e colaboradores demonstraram que nanopartículas contendo um princípio ativo extraído a partir das folhas da planta medicinal indiana *Andrographis paniculata*, revestidas com Eudragit® S-100,

apresentaram um potencial zeta entre -28.5 a -33.4 mV, valores esses que variam de acordo com a proporção polímero/droga utilizado. Esses dados corroboram com os nossos achados, demonstrando a carga de superfície negativa característica do polímero empregado (215).

A cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada para análise do teor total do fármaco presente em uma formulação e para a análise da taxa de princípio ativo nanoencapsulado (211). O método apresenta vantagens devido à capacidade de separação de múltiplos componentes durante a análise de amostras, além de ser uma técnica simples, robusta, reprodutível, de alta sensibilidade e precisão, mesmo para pequenas quantidades de produtos de degradação produzidos (216, 217). A análise da concentração total de princípio ativo, realizada por cromatografia, nos mostrou que a formulação apresentou valor total de JME-173 de 94%, enquanto que a análise da taxa de composto nanoencapsulado, realizada através da quantificação do centrifugado filtrado da formulação, evidenciou uma eficiência de encapsulação de 97%. Estudos de Prakash e colaboradores demonstraram valor máximo de eficiência de encapsulação de 76% ao utilizar o polímero Eudragit® S-100 para encapsulação de um extrato de folhas da planta medicinal indiana *Andrographis paniculata* (215). A diferença nos valores encontrados em relação ao nosso estudo pode ser explicada pelo trabalho de Vineela e colaboradores, onde alterações na proporção entre Eudragit® S-100, composto e solvente orgânico, resultaram em taxas de encapsulação que variaram de 65 a 96%, indicando a importância na escolha da concentração de cada constituinte na formulação (218). Além disso, outra característica importante que pode estar associada a diferença encontrada entre os estudos consiste na natureza do princípio ativo utilizado, uma vez que a massa molar, taxa de hidrofobicidade, os segmentos das cadeias macromoleculares, cristalinidade, dentre outros fatores podem influenciar diretamente o seu potencial de encapsulação (219). Entretanto, é importante ressaltar que uma eficiência de encapsulação de 97% é um valor bastante satisfatório, estando de acordo com o que é preconizado pelas agências reguladoras para este tipo de análise.

A estabilidade físico-química das nanocápsulas pode ser monitoradas a partir de variações do pH no decorrer do tempo, uma vez que alterações desse parâmetro indicam a degradação de polímero ou outros ingredientes da formulação (199, 211). Nossos dados demonstram que a formulação apresentou pH médio de 3,8. O estudo de Schaffazick e colaboradores em que a formulação de nanocápsulas de melatonina, utilizando o Eudragit® S-100 como polímero, resultou em uma formulação com pH de 3,9, dão suporte aos nossos achados (220). Além disso, já é bem descrito na literatura que compostos revestidos por Eudragit® S-100 apresentam liberação de forma pH-dependente. Em um ambiente ácido,

característico na região do estômago, os grupos carboxila das cadeias de ácido metacrílico do polímero são protonados e as cadeias laterais não são carregadas. Após alcançar regiões como a do colón, onde se encontram valores de pH neutro ou básico, os grupos carboxila desprotonam e, devido ao aumento das cargas repulsivas negativas nas cadeias laterais, o polímero incha, liberando todo o conteúdo que estava presente em seu interior (194). Esse mecanismo de liberação justifica o pH ácido encontrado na formulação.

Visando analisar se a incorporação do JME-173 em nanocápsulas resultaria em aumento de seu efeito farmacológico, avaliamos o impacto de sua administração em animais submetidos à inflamação pulmonar por exposição à LPS. Tal modelo foi escolhido nesta triagem inicial por apresentar vantagens diversas, incluindo o fato de já ser bem estabelecido na literatura, e de fácil reprodutibilidade (190, 221, 222). Além disso, o desenvolvimento de uma lesão pulmonar estável, utilizando endotoxina, leva normalmente algumas horas, tornando o protocolo de grande valia em ensaios rápidos, visando triagem e escolha de doses de drogas em estudos de triagem (223).

Trabalhos prévios demonstram que a instilação de LPS resulta em um aumento no número de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, no pulmão de camundongos (224, 225). Durante a fase aguda da inflamação, os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a seguir um gradiente de estímulos inflamatórios e migrar para os sítios de inflamação, liberando proteases que contribuirão para a degradação dos componentes da matriz extracelular, aumentando a resposta inflamatória, ou ainda, liberando citocinas que irão favorecer o recrutamento e acúmulo de mais leucócitos (226). Por outro lado, os macrófagos alveolares fornecem a primeira linha de defesa contra organismos e irritantes inalados, desempenhando papel importante no desenvolvimento de lesão pulmonar, através da secreção exacerbada de mediadores como oxidantes e proteinases (227). Os resultados apresentados no presente estudo mostraram que o tratamento oral com JME-173 nanoencapsulado reduziu o influxo de neutrófilos e macrófagos recolhidos no BAL, enquanto que o tratamento com o composto livre não foi capaz de interferir no aumento do infiltrado inflamatório. Evidências crescentes sugerem que anestésicos locais apresentam efeito protetor sobre a resposta inflamatória em doenças que apresentam esse perfil (228, 229). Esse pressuposto é confirmado pelo estudo de Mikawa e colaboradores demonstrando que o pré-tratamento com lidocaína atenuou significativamente a lesão pulmonar induzida por endotoxina de *E. coli* em coelhos, através da diminuição do acúmulo de células polimorfonucleares e produção de ânions superóxidos por essas células (106). Além disso, estudos sugerem que a mexiletina pode atuar na inibição da geração de radicais livres, além de retardar a produção do ânion

superóxido por neutrófilos ativados, inibindo assim o potencial pró-inflamatório dessas células (227). Em outro estudo, onde foi utilizado um modelo de inflamação induzida por endotoxina de *E. coli* em ratos, Schmidt e colaboradores relataram que o pré-tratamento com lidocaína atenuou o aumento da ativação, aderência, função metabólica e migração de monócitos para os sítios inflamados (230). Esses estudos estão alinhados com os nossos achados, reforçando que, apesar de não apresentar mais atividade anestésica, o análogo JME-173, quando nanoformulado, mantém a atividade anti-inflamatória presente nessa classe de agentes.

Outro ponto interessante, o efeito anti-inflamatório observado com a administração do composto nanoencapsulado não foi reproduzido pelo tratamento com a mesma substância na forma livre, sugerindo que a formulação de nanopartículas resultou, de fato, em um aumento da biodisponibilidade de JME-173 no organismo. Entretanto, experimentos visando à quantificação, através de HPLC, do JME-173 no tecido pulmonar devem ser realizados para suportar esta hipótese. Baseado na literatura, podemos sugerir que esse aumento da biodisponibilidade é decorrente, dentre outros fatores, da proteção polimérica da droga contra elementos destrutivos e também do aumento da absorção da droga dentro do trato gastrointestinal (174, 231, 232). São descritos na literatura, diversos mecanismos envolvendo a absorção gastrointestinal de nanopartículas, como por exemplo o aumento da muco adesão, transporte por canais celulares, captura por células epiteliais intestinais e captura por linfonodos no íleo (placas de Peyer) (233). Além disso, o tamanho das nanopartículas é um fator importante na absorção gastrointestinal, uma vez que o estudo de Win e colaboradores demonstrou que nanopartículas poliméricas de 100 nm apresentaram absorção 10-250 vezes maior que partículas de 500 nm, 1 µm, e 10 µm (234). A partir desses achados, é possível sugerir que as nanocápsulas contendo JME-173 apresentam maior absorção pelo trato gastrointestinal, resultando no aumento da biodisponibilidade do princípio ativo e, conseqüentemente, aumento no efeito terapêutico, no entanto mais estudos são necessários para se confirmar tal hipótese. Além disso, a hipótese de que a interação polímero-composto pode resultar em mudanças no perfil do mecanismo de ação do JME-173, ou outros mecanismos ainda desconhecidos, não podem ser descartadas.

Visando avaliar se o efeito protetor do tratamento com JME-173 nanoencapsulado sobre o aumento de neutrófilos encontrados no BAL é refletido sobre a presença dessas células no tecido pulmonar, avaliamos a repercussão da administração do composto sobre os níveis de MPO no pulmão. A MPO é a proteína mais abundante presente nos grânulos intracelulares de neutrófilos, constituindo cerca de 5% de sua massa seca (235). Devido a essa

característica, estudos prévios indicam que essa proteína poderia ser utilizado como um bom marcador para determinação da presença de neutrófilos em tecidos (236). Já está bem descrito na literatura que a instilação com LPS é capaz de induzir o aumento na atividade de MPO em camundongos (224, 225). Nosso estudo demonstrou que, de forma semelhante ao observado em relação à contagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar, somente o tratamento com JME-173 nanoencapsulado inibiu, de maneira significativa, o aumento de MPO presente no pulmão. Esse dado é consistente com o estudo de Chevalier e colaboradores onde observou-se achados similares após tratamento com o anestésico lidocaína, levando à redução da atividade de MPO em modelo de inflamação do colón aguda, em ratos (237). Em conjunto, nossos achados indicam que a atividade de MPO pulmonar está de fato correlacionada com a presença de neutrófilos no BAL, assim como confirmam o efeito protetor sobre o tecido pulmonar do tratamento com JME-173 reduzindo o infiltrado desse tipo celular.

Durante a resposta a patógenos, as citocinas atuam nas interações e comunicações entre células e no desencadeamento e perpetuação da inflamação, enquanto as quimiocinas coordenam o recrutamento, e ativação de leucócitos a partir de um gradiente de concentração (238, 239). Estudos em modelos animais demonstram níveis aumentados de IL-1 β , KC/CXCL1, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5, após a exposição ao LPS (240). A IL-1 β é uma citocina inicialmente descoberta como responsável por induzir febre, no entanto, atualmente se sabe que esse mediador é na verdade capaz de iniciar diversas outras respostas imunológicas, incluindo o influxo e ativação de neutrófilos, indução da produção de outras citocinas, proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (241). Enquanto que a MCP-1, ou CCL2, é uma quimiocina produzida por uma variedade de células, tanto constitutivamente quanto após a indução por citocinas, exercendo uma ação potente sobre o recrutamento de monócitos durante a infecção ou sob outras condições inflamatórias (238). Os nossos resultados demonstraram que a nanoencapsulação do JME-173, administrado oralmente, resultou na redução dos níveis de ambos os mediadores inflamatórios em camundongos instilados com LPS. A inibição da secreção de IL-1 β e MCP-1/CCL2, através do uso de anestésicos locais, já esta descrita em estudos na literatura. De fato, o estudo de Suzuki e colaboradores, demonstrando a ação da lidocaína sobre a redução desses mediadores, *in vitro*, dá suporte aos nossos achados (242). Estudos *in vivo* também apontam para uma redução importante na liberação de mediadores inflamatórios após o tratamento com lidocaína. Em um experimento onde investigou-se a liberação de citocinas após lesão pulmonar aguda induzida por hiperoxia em coelhos, o pré-tratamento intravenoso com lidocaína atenuou significativamente a liberação dentre outras citocinas, de IL-1 β do pulmão dos animais, acompanhado pela redução do influxo e diminuição da inflamação (108). KC, ou CXCL1,

uma quimiocina murina homóloga à IL-8 humana, tem sido implicada em uma série de condições fisiopatológicas inflamatórias experimentais, exercendo seu efeito principalmente na quimiotaxia de neutrófilos a partir da ligação aos receptores CXCR1 e CXCR2 (243, 244). A quimiocina RANTES, ou CCL5, também apresenta papel relevante na mediação da resposta inflamatória, através da atividade quimiotática de células como macrófagos, monócitos e linfócitos T, via receptores CCR1, CCR3 e CCR5. Observamos em nosso estudo que o tratamento com JME-173 nanoencapsulado reduziu os níveis de KC/CXCL1 e RANTES/CCL5 no tecido pulmonar. Os estudos demonstrando que o bloqueio da ligação do RANTES/CCL5 ao receptor de CCR5 resulta em uma marcada diminuição da infiltração de monócitos em um modelo de glomerulonefrite experimental e que o bloqueio de CXCR1/CXCR2 inibe a adesão de neutrófilos aos microvasos sinoviais e, conseqüentemente, a sua migração para os sítios de inflamação em modelo experimental de artrite, confirmam a ação direta de ambas as quimiocinas sobre essas células (245, 246). Em conjunto, os dados indicam que a inibição de KC/CXCL1, RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2 e IL-1 β podem estar diretamente relacionadas com a diminuição de neutrófilos e macrófagos encontrados no BAL de camundongos instilados com LPS e tratados com JME-173 nanoencapsulado.

Estudos em modelos experimentais demonstram que o aumento no número de leucócitos e teor de mediadores pró-inflamatórios no pulmão de camundongos expostos ao LPS é, geralmente, acompanhado por uma resposta de hiper-reatividade brônquica. Em geral, essa resposta pode permanecer estável, aumentar após a exposição a agentes sensibilizadores, ou ainda ser inibida através da ação de agentes terapêuticos ou de forma espontânea (247). Observamos em nosso estudo que o tratamento com JME-173 nanoencapsulado, em todas as doses avaliadas, foi capaz de reverter o estado de hiper-reatividade brônquica, como verificado pelo aumento nos índices de elastância pulmonar nos animais estimulados com LPS e expostos à metacolina. De maneira semelhante, Nishina e colaboradores observaram que o tratamento com lidocaína restabeleceu a complacência pulmonar, a qual se encontrava diminuída em coelhos após aspiração de ácido clorídrico (HCl) (105). De forma interessante, observamos ainda que a administração do composto livre na maior dose (50 mg/Kg) também resultou na diminuição da AHR, apesar de não alterar os parâmetros associados à inflamação induzida pela exposição ao LPS. O influxo de células inflamatórias e a ação de seus mediadores nas vias respiratórias são frequentemente associados à hiper-reatividade brônquica, tanto em humanos quanto em modelos animais, sugerindo uma relação direta entre ambos os parâmetros. Este pressuposto, no entanto, é discutível, uma vez que relatos na literatura demonstram tais elementos atuando de forma dissociada. Leckie e colaboradores, expõem em seu estudo que a administração de anticorpos monoclonais anti-IL-5 inibe o perfil

inflamatório, sem interferir contudo sobre a hiper-reatividade em pacientes asmáticos (248). Estudos demonstram também, que o bloqueio de algumas proteínas como Rho-cinase ou fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) em camundongos resulta na inibição de inflamação, mas não da hiper-reatividade de vias aéreas, ou vice-versa (249, 250). Além disso, a terapia atual utilizada na clínica, visando minimizar as alterações patológicas associadas à asma, consiste no uso combinado de medicamentos anti-inflamatórios em associação com agentes broncodilatadores, demonstrando que a redução de células inflamatórias não influencia diretamente no relaxamento das vias aéreas dos pacientes (251). Essas evidências, em conjunto, sugerem a possível dissociação existente no efeito do JME-173 sobre a AHR e inflamação encontrado em nosso estudo, sendo possível sugerir que o composto apresenta uma atividade de relaxamento das vias aéreas mais eficiente que a sua atividade anti-inflamatória. De fato, estudos anteriores já demonstraram a importante atividade do protótipo mexiletina, sobre o relaxamento das vias aéreas, resultando, inclusive, no bloqueio do reflexo de broncoconstrição em asmáticos (128, 252).

Apesar dos resultados promissores obtidos com a nanoencapsulação do JME-173 em ensaios biológicos, a formulação em forma de suspensão apresentou baixa estabilidade, sendo possível observar a formação de precipitados na parede dos frascos após alguns dias de seu preparo, o que foi seguido por evidente perda da atividade farmacológica frente à resposta inflamatória pulmonar e hiper-reatividade brônquica causadas por LPS. Essa observação demonstra a instabilidade física da formulação em função do tempo de armazenamento, contrastando com dados da literatura demonstrando que nanopartículas utilizando o Eudragit® S-100 como polímero resultam em formulações com estabilidade média de 3,5 meses (220). Acreditamos que interações envolvendo o pH do princípio ativo com o polímero possam ter influenciado na baixa estabilidade apresentada pela formulação. Essa afirmação é possível uma vez que o JME-173 encontrava-se na forma de base livre antes de ser nanoencapsulado. Considerando que o Eudragit® S-100 apresenta grupos carboxila que deprotonam, liberando o conteúdo em seu interior em ambientes com pH a partir de 7 – 7.2, o pH básico do JME-173 poderia estar atuando na degradação do polímero ao longo do tempo (194). De fato, ao avaliarmos as formulações degradadas observamos que o pH anteriormente ácido (em média 3,8) se encontrava em escala básica (aproximadamente 7,8), reforçando a nossa hipótese. Além disso, limitações associadas à estabilidade de formulações líquidas são bem caracterizadas e descritas na literatura, consistindo principalmente na agregação das partículas, estabilidade química do polímero, do princípio ativo ou de outras matérias-primas e liberação prematura da substância ativa, além da susceptibilidade a proliferação microbiana, limitando assim a sua aplicabilidade industrial (199). Considerando que estes problemas

físico-químicos e microbiológicos possam ser evitados através da eliminação do componente aquoso da formulação, vem crescendo o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas de nanopartículas na forma sólida (199). Esse processo pode ser conseguido através de liofilização ou *spray-drying* da formulação, sendo o método de *spray-drying* mais indicado para nanocápsulas, devido a seu baixo custo, processo rápido e possibilidade de modular as características físico-químicas do pó (253). Em nosso estudo, o processo de secagem foi realizado em formulações preparadas pelo método de deposição interfacial de polímeros biodegradáveis pré-formados, onde foi testada a adição dos adjuvantes de secagem l-leucina ou lactose à suspensão resultante da nanoprecipitação e posterior secagem por *spray-drying*. O uso do adjuvante l-leucina apresentou melhor resultado como adjuvante carreador de partículas. O dado de diâmetro de partículas demonstrou, conforme esperado, uma população de tamanho majoritariamente nanométrico com a utilização de tal adjuvante. Estudos na literatura indicam que, de fato, a l-leucina é capaz de reduzir as forças de adesão (propriedade antiaderente) das partículas, o que facilita a desaglomeração das nanocápsulas em meio aquoso (254, 255). Além disso, foi observado uma população em pequena quantidade de partículas de tamanho micrométrico, sendo possível sugerir que essa população é constituída, principalmente, de resquícios do adjuvante usado em nossa formulação. Quando avaliado o efeito do tratamento com nanopartículas no modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS, foi possível observar que a administração de nanocápsulas na forma de pó redisperso, após um mês de seu preparo, reduziu, de maneira significativa, os leucócitos no BAL, a AHR, além dos níveis de MPO e citocinas pró-inflamatórias em camundongos, efeito este semelhante ao encontrado com a administração da formulação na forma líquida. Esses dados abrem a possibilidade da investigação de nanocápsulas contendo JME-173 na forma seca no tratamento de doenças inflamatórias pulmonares crônicas, uma vez que apresentam uma interessante estabilidade e possibilidade de seu uso farmacêutico compartimentados como cápsulas e comprimidos de ampla aplicação industrial (199). No entanto, estudos mais aprofundados também se fazem necessários no sentido da melhor caracterização da formulação seca, não apenas quanto a estabilidade temporal efetiva, como também em relação à própria forma de administração, distribuição, eliminação, além de seus efeitos em outros modelos de inflamação pulmonar, utilizando protocolos de administrações por períodos mais prolongados.

6. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o tratamento *in vivo* com JME-173 livre (100 mg/Kg) não apresenta indícios de atividade tóxica. Além disso, foi possível a nanoencapsulação do análogo visando a aplicação biológica, dado confirmado pelos resultados de caracterização físico-química. Foi observado também que o tratamento, em baixas doses, com suspensão de nanocápsulas contendo JME-173, mas não do composto em sua forma livre, apresenta efeito anti-inflamatório, evidenciado pela redução do número de neutrófilos e macrófagos nas vias aéreas e pela diminuição dos níveis de MPO e mediadores pró-inflamatórios como KC/CXCL1, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 e IL-1 β no tecido pulmonar, além de abolir o estado de hiper-reatividade brônquica induzido por LPS (Figura 6.1). Por fim, os achados envolvendo nanocápsulas de JME-173 submetidas à técnica de secagem em *spray drier* indicam fortemente que esta formulação apresenta estabilidade físico-química de armazenamento otimizada, além de manter a atividade observada nas nanocápsulas de JME-173 sob a forma de suspensão.

Em suma, concluímos que a utilização de nanocápsulas como carreador potencializa as propriedades anti-inflamatória e de relaxamento das vias aéreas do análogo JME-173 administrado por via oral.

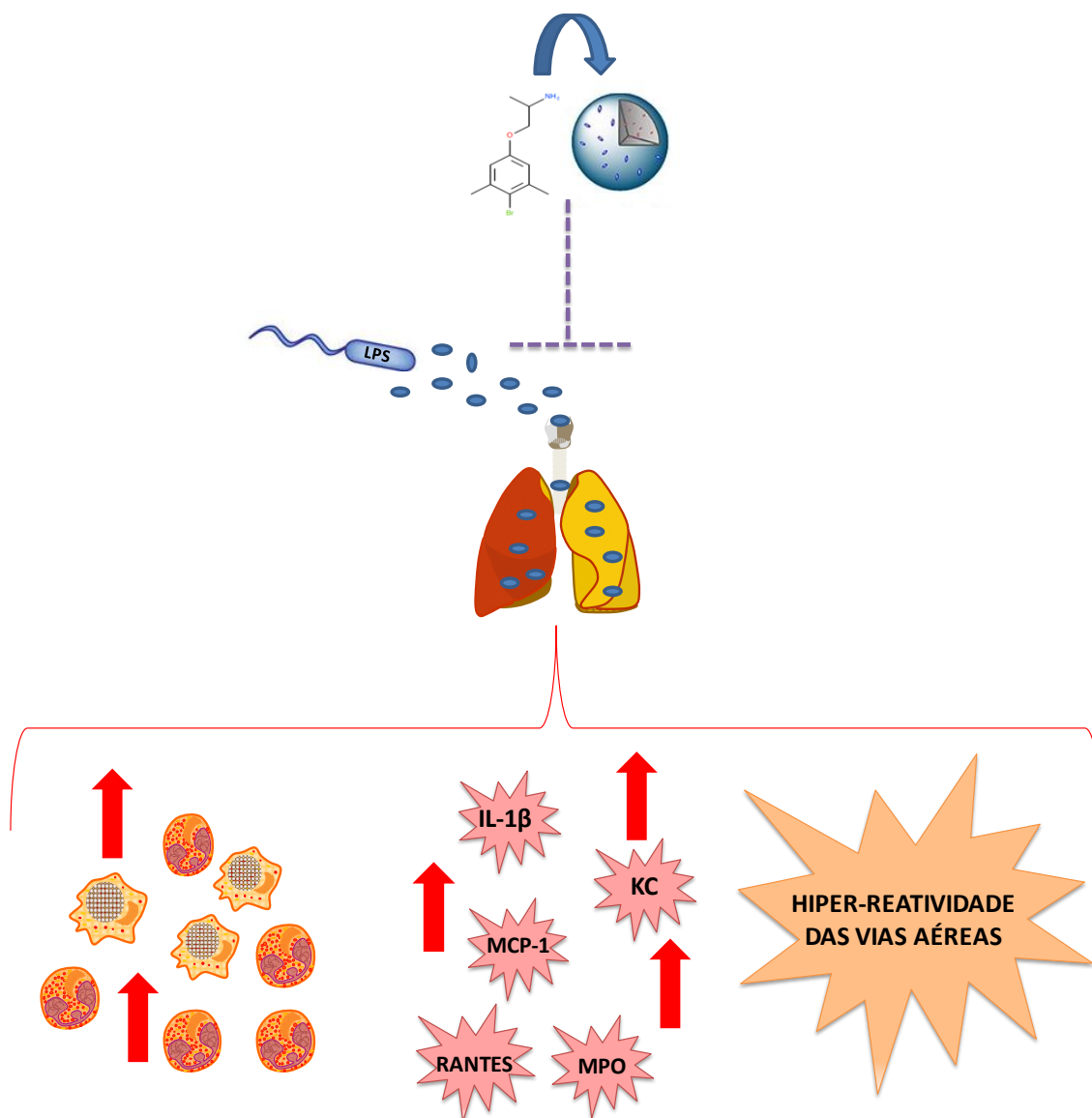


Figura 6.1 - Efeito anti-inflamatório e broncorelaxador do tratamento com JME-173 nanoencapsulado, avaliado em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS. O tratamento oral com nanocápsulas contendo o análogo não anestésico da mexiletina JME-173, resultou na inibição de alterações patológicas cruciais como a diminuição do número aumentado de macrófagos e neutrófilos, redução dos níveis elevados de MPO, IL-1 β , KC, MCP-1 e RANTES, além da hiper-reatividade das vias aéreas decorrentes da instilação intranasal de LPS em camundongos.

7. REFERÊNCIAS

1. Barnes Peter J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clinical Science* (2017) **131**(13):1541-58. doi: 10.1042/cs20160487.
2. Cutts S, Talboys R, Paspula C, Prempeh EM, Fanous R, Ail D. Adult respiratory distress syndrome. *The Annals of The Royal College of Surgeons of England* (2017) **99**(1):12-6. doi: 10.1308/rcsann.2016.0238. PubMed PMID: 27513791.
3. Yeh GY, Horwitz R. Integrative Medicine for Respiratory Conditions. *Medical Clinics of North America* (2017) **101**(5):925-41. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2017.04.008>.
4. Holt PG, Sly PD. Viral infections and atopy in asthma pathogenesis: new rationales for asthma prevention and treatment. *Nat Med* (2012) **18**(5):726-35.
5. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* (2008) **8**(3):183-92.
6. Ware LB, Matthay MA. The Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine* (2000) **342**(18):1334-49. doi: 10.1056/nejm200005043421806. PubMed PMID: 10793167.
7. Carr TF, Bleeker E. Asthma heterogeneity and severity. *The World Allergy Organization Journal* (2016) **9**(1):41. doi: 10.1186/s40413-016-0131-2. PubMed PMID: PMC5129643.
8. GOLD. Global Strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. (2017).
9. Kim WJ, Yim J-J, Kim DK, Lee MG, Rosiello R, Fuhlbrigge A, et al. Respiratory Symptoms and Other Respiratory Illnesses in Severe COPD Cases from Korea, Poland, and United States *B49 COPD: SYMPTOM AND CLINICAL ASSESSMENT*. American Thoracic Society International Conference Abstracts. American Thoracic Society (2017). p. A3663-A.
10. Han S, Mallampalli RK. The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* (2015) **194**(3):855-60. doi: 10.4049/jimmunol.1402513. PubMed PMID: PMC4299926.
11. Ponce-Gallegos MA, Ramírez-Venegas A, Falfán-Valencia R. Th17 profile in COPD exacerbations. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (2017) **12**:1857-65. doi: 10.2147/copd.s136592. PubMed PMID: PMC5491572.
12. Phung TTB, Suzuki T, Phan PH, Kawachi S, Furuya H, Do HT, et al. Pathogen screening and prognostic factors in children with severe ARDS of pulmonary origin. *Pediatr Pulmonol* (2017) **13**(10):23694.

13. Postma DS, Reddel HK, ten Hacken NH, van den Berge M. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: similarities and differences. *Clin Chest Med* (2014) **35**(1):143-56. Epub 2014/02/11. doi: 10.1016/j.ccm.2013.09.010 S0272-5231(13)00140-8 [pii]. PubMed PMID: 24507842.
14. Kubo M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunol Rev* (2017) **278**(1):162-72.
15. Pham T, Rubenfeld GD. Fifty Years of Research in ARDS. The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome. A 50th Birthday Review. *Am J Respir Crit Care Med* (2017) **195**(7):860-70. Epub 2017/02/06. doi: 10.1164/rccm.201609-1773CP. PubMed PMID: 28157386.
16. GINA. Global strategy for asthma management and prevention. (2017).
17. Cisneros C, Díaz-Campos RM, Marina N, Melero C, Padilla A, Pascual S, et al. Accreditation of specialized asthma units for adults in Spain: an applicable experience for the management of difficult-to-control asthma. *Journal of Asthma and Allergy* (2017) **10**:163-9. doi: 10.2147/jaa.s131506. PubMed PMID: PMC5431694.
18. Qu J, Li Y, Zhong W, Gao P, Hu C. Recent developments in the role of reactive oxygen species in allergic asthma. *Journal of Thoracic Disease* (2017) **9**(1):E32-E43. doi: 10.21037/jtd.2017.01.05. PubMed PMID: PMC5303105.
19. SBPT. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol* (2012) **38**.
20. Graudenz GS, Carneiro DP, Vieira RdP. Trends in asthma mortality in the 0- to 4-year and 5- to 34-year age groups in Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* (2017) **43**:24-31.
21. Lakshmi SP, Reddy AT, Reddy RC. Emerging pharmaceutical therapies for COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (2017) **12**:2141-56. doi: 10.2147/copd.s121416. PubMed PMID: PMC5531723.
22. Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov* (2013) **12**(7):543-59. Epub 2013/08/27. PubMed PMID: 23977698.
23. Diaz-Guzman E, Mannino DM. Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* (2014) **35**(1):7-16. Epub 2014/02/11. doi: 10.1016/j.ccm.2013.10.002 S0272-5231(13)00144-5 [pii]. PubMed PMID: 24507833.
24. Menezes M, Noal, Fiterman, Cukier, Chatkin, et al. Tratamento farmacológico da DPOC. *J Bras Pneumol* (2011) **37**(4):527-43.
25. Rabahi MF. Epidemiologia da DPOC: Enfrentando Desafios. *Pulmão* (2013) **22**(2):4-8.

26. Maca J, Jor O, Holub M, Sklienka P, Bursa F, Burda M, et al. Past and Present ARDS Mortality Rates: A Systematic Review. *Respir Care* (2017) **62**(1):113-22. Epub 2016/11/03. doi: 10.4187/respcare.04716
respcare.04716 [pii]. PubMed PMID: 27803355.
27. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* (2016) **315**(8):788-800. Epub 2016/02/24. doi: 10.1001/jama.2016.0291
2492877 [pii]. PubMed PMID: 26903337.
28. Fialkow L, Farenzena M, Wawrzyniak IC, Brauner JS, Vieira SRR, Vigo A, et al. Mechanical ventilation in patients in the intensive care unit of a general university hospital in southern Brazil: an epidemiological study. *Clinics* (2016) **71**:144-51.
29. Franca SA, Toufen CJ, Hovnanian ALD, Albuquerque ALP, Borges ER, Pizzo VRP, et al. The epidemiology of acute respiratory failure in hospitalized patients: A Brazilian prospective cohort study. *Journal of Critical Care* **26**(3):330.e1-e8. doi: 10.1016/j.jcrc.2010.10.010.
30. Azevedo LC, Park M, Salluh JI, Rea-Neto A, Souza-Dantas VC, Varaschin P, et al. Clinical outcomes of patients requiring ventilatory support in Brazilian intensive care units: a multicenter, prospective, cohort study. *Crit Care* (2013) **17**(2):R63. Epub 2013/04/06. doi: 10.1186/cc12594
cc12594 [pii]. PubMed PMID: 23557378; PubMed Central PMCID: PMC3672504.
31. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol* (2015) **16**(1):45-56. doi: 10.1038/ni.3049.
32. Pelaia G, Vatrella A, Busceti MT, Gallelli L, Calabrese C, Terracciano R, et al. Cellular Mechanisms Underlying Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in Asthma. *Mediators of Inflammation* (2015) **2015**:879783. doi: 10.1155/2015/879783. PubMed PMID: PMC4386709.
33. Salter B, Pray C, Radford K, Martin JG, Nair P. Regulation of human airway smooth muscle cell migration and relevance to asthma. *Respiratory Research* (2017) **18**:156. doi: 10.1186/s12931-017-0640-8. PubMed PMID: PMC5559796.
34. Joshi KS, Nesari TM, Dedge AP, Dhumal VR, Shengule SA, Gadgil MS, et al. Dosha phenotype specific Ayurveda intervention ameliorates asthma symptoms through cytokine modulations: Results of whole system clinical trial. *Journal of Ethnopharmacology* (2017) **197**:110-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.071>.
35. Pelaia G, Canonica GW, Matucci A, Paolini R, Triggiani M, Paggiaro P. Targeted therapy in severe asthma today: focus on immunoglobulin E. *Drug Des Devel Ther* (2017) **11**:1979-87.
36. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* (2012) **18**(5):673-83. Epub 2012/05/09. doi: 10.1038/nm.2731

nm.2731 [pii]. PubMed PMID: 22561831.

37. Al Said A, Cushen B, Costello RW. Targeting patients with asthma for omalizumab therapy: choosing the right patient to get the best value for money. *Therapeutic Advances in Chronic Disease* (2017) **8**(2-3):31-45. doi: 10.1177/2040622317690494. PubMed PMID: PMC5354131.
38. Palomares Ó, Sánchez-Ramón S, Dávila I, Prieto L, Pérez de Llano L, Lleonart M, et al. dIvergEnt: How IgE Axis Contributes to the Continuum of Allergic Asthma and Anti-IgE Therapies. *International Journal of Molecular Sciences* (2017) **18**(6):1328. doi: 10.3390/ijms18061328. PubMed PMID: PMC5486149.
39. Fehrenbach H, Wagner C, Wegmann M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell and Tissue Research* (2017) **367**(3):551-69. doi: 10.1007/s00441-016-2566-8. PubMed PMID: PMC5320023.
40. Becerra-Díaz M, Wills-Karp M, Heller NM. New perspectives on the regulation of type II inflammation in asthma. *F1000Research* (2017) **6**:1014. doi: 10.12688/f1000research.11198.1. PubMed PMID: PMC5497827.
41. Cardet JC, Israel E. Update on reslizumab for eosinophilic asthma. *Expert opinion on biological therapy* (2015) **15**(10):1531-9. doi: 10.1517/14712598.2015.1090972. PubMed PMID: PMC5161345.
42. McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in Medicine* (2017) **4**:93. doi: 10.3389/fmed.2017.00093. PubMed PMID: PMC5491677.
43. Al-Moamary MS, Alhaider SA, Idrees MM, Al Ghobain MO, Zeitouni MO, Al-Harbi AS, et al. The Saudi Initiative for Asthma - 2016 update: Guidelines for the diagnosis and management of asthma in adults and children. *Annals of Thoracic Medicine* (2016) **11**(1):3-42. doi: 10.4103/1817-1737.173196. PubMed PMID: PMC4748613.
44. Westerik JAM, Metting EI, van Boven JFM, Tiersma W, Kocks JWH, Schermer TR. Associations between chronic comorbidity and exacerbation risk in primary care patients with COPD. *Respiratory Research* (2017) **18**:31. doi: 10.1186/s12931-017-0512-2. PubMed PMID: PMC5294875.
45. Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clin Sci (Lond)* (2014) **126**(4):253-65. Epub 2013/10/23. doi: 10.1042/CS20130182 CS20130182 [pii]. PubMed PMID: 24144354; PubMed Central PMCID: PMC3878607.
46. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* (2014) **35**(1):71-86. Epub 2014/02/11. doi: 10.1016/j.ccm.2013.10.004 S0272-5231(13)00146-9 [pii]. PubMed PMID: 24507838.
47. Costa CH, Rufino R, Lapa e Silva JR. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. *Rev Assoc Med Bras* (2009) **55**(3):347-54.

48. Murarescu ED, Mitrofan EC, Mihailovici MS. Chronic obstructive pulmonary disease in a new concept. *Rom J Morphol Embryol* (2007) **48**(3):207-14. Epub 2007/10/05. PubMed PMID: 17914487.
49. Villar J, Schultz MJ, Kacmarek RM. The LUNG SAFE: a biased presentation of the prevalence of ARDS! *Critical Care* (2016) **20**(1):108. doi: 10.1186/s13054-016-1273-x.
50. Henderson WR, Chen L, Amato MB, Brochard LJ. Fifty Years of Research in ARDS. Respiratory Mechanics in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* (2017). Epub 2017/03/18. doi: 10.1164/rccm.201612-2495CI. PubMed PMID: 28306327.
51. Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* (2016) **140**(4):345-50. doi: 10.5858/arpa.2015-0519-RA. PubMed PMID: 27028393.
52. Fujishima S. Pathophysiology and biomarkers of acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care* (2014) **2**(1):32. Epub 2014/12/19. doi: 10.1186/2052-0492-2-32 37 [pii]. PubMed PMID: 25520844; PubMed Central PMCID: PMC4267590.
53. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* (2012) **122**(8):2731-40. doi: 10.1172/jci60331. PubMed PMID: PMC3408735.
54. Umbrello M, Formenti P, Bolgiaghi L, Chiumello D. Current Concepts of ARDS: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences* (2017) **18**(1):64. doi: 10.3390/ijms18010064. PubMed PMID: PMC5297699.
55. Laycock HaR, A. Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome: A Review Article. *British Journal of Medical Practitioners* (2010) **3**(2):33-9.
56. Fanelli V, Ranieri VM. Mechanisms and clinical consequences of acute lung injury. *Ann Am Thorac Soc* (2015) **12** Suppl 1:S3-8. Epub 2015/04/02. doi: 10.1513/AnnalsATS.201407-340MG. PubMed PMID: 25830831.
57. Correa Junior MD, Couri LM, Soares JL. Current concepts on the assessment of fetal lung maturity. *Femina* (2014) **42**.
58. Rocco PRM, Nieman GF. ARDS: what experimental models have taught us. *Intensive Care Medicine* (2016) **42**(5):806-10. doi: 10.1007/s00134-016-4268-9.
59. Chapman DG, Tully JE, Nolin JD, Jansen-Heininger YM, Irvin CG. Animal Models of Allergic Airways Disease: Where Are We and Where to Next? *Journal of cellular biochemistry* (2014) **115**(12):2055-64. doi: 10.1002/jcb.24881. PubMed PMID: PMC4199895.
60. Moran CJ, Ramesh A, Brama PAJ, O'Byrne JM, O'Brien FJ, Levingstone TJ. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *Journal of Experimental Orthopaedics* (2016) **3**:1. doi: 10.1186/s40634-015-0037-x. PubMed PMID: PMC4703594.

61. Reiss LK, Uhlig U, Uhlig S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. *European Journal of Cell Biology* (2012) **91**(6–7):590-601. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.11.004>.
62. Ballard-Croft C, Wang D, Sumpter LR, Zhou X, Zwischenberger JB. Large-Animal Models of Acute Respiratory Distress Syndrome. *The Annals of Thoracic Surgery* (2012) **93**(4):1331-9. doi: [10.1016/j.athoracsur.2011.06.107](https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2011.06.107).
63. Chen H, Bai C, Wang X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. *Expert Review of Respiratory Medicine* (2010) **4**(6):773-83. doi: [10.1586/ers.10.71](https://doi.org/10.1586/ers.10.71).
64. Larsson L, Szponar B, Pehrson C. Tobacco smoking increases dramatically air concentrations of endotoxin. *Indoor Air* (2004) **14**(6):421-4. doi: [10.1111/j.1600-0668.2004.00290.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2004.00290.x).
65. Huang G, Xu X-C, Zhou J-S, Li Z-Y, Chen H-P, Wang Y, et al. Neutrophilic Inflammation in the Immune Responses of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Lessons from Animal Models. *Journal of Immunology Research* (2017) **2017**:7915975. doi: [10.1155/2017/7915975](https://doi.org/10.1155/2017/7915975). PubMed PMID: PMC5426078.
66. Ghorani V, Boskabady MH, Khazdair MR, Kianmeher M. Experimental animal models for COPD: a methodological review. *Tob Induc Dis* (2017) **15**(25):017-0130.
67. Liu J, Pang Z, Wang G, Guan X, Fang K, Wang Z, et al. Advanced Role of Neutrophils in Common Respiratory Diseases. *Journal of Immunology Research* (2017) **2017**:6710278. doi: [10.1155/2017/6710278](https://doi.org/10.1155/2017/6710278). PubMed PMID: PMC5447318.
68. Billington CK, Penn RB, Hall IP. $\beta(2)$ -agonists. *Handbook of experimental pharmacology* (2017) **237**:23-40. doi: [10.1007/164_2016_64](https://doi.org/10.1007/164_2016_64). PubMed PMID: PMC5480238.
69. Anderson GP. Advances in understanding COPD. *F1000Research* (2016) **5**:F1000 Faculty Rev-2392. doi: [10.12688/f1000research.7018.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.7018.1). PubMed PMID: PMC5040155.
70. Ruthman CA, Festic E. Emerging Therapies for the Prevention of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Therapeutic advances in respiratory disease* (2015) **9**(4):173-87. doi: [10.1177/1753465815585716](https://doi.org/10.1177/1753465815585716). PubMed PMID: PMC4659368.
71. Cazzola M, Page CP, Rogliani P, Matera MG. beta2-agonist therapy in lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* (2013) **187**(7):690-6. Epub 2013/01/26. doi: [10.1164/rccm.201209-1739PP](https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1739PP) rccm.201209-1739PP [pii]. PubMed PMID: 23348973.
72. Barnes PJ. Biochemical basis of asthma therapy. *J Biol Chem* (2011) **286**(38):32899-905. Epub 2011/07/30. doi: [10.1074/jbc.R110.206466](https://doi.org/10.1074/jbc.R110.206466) R110.206466 [pii]. PubMed PMID: 21799015; PubMed Central PMCID: PMC3190895.
73. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol Rev* (2011) **242**(1):31-50. Epub 2011/06/21. doi: [10.1111/j.1600-065X.2011.01020.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01020.x). PubMed PMID: 21682737.

74. Wang J, Wang R, Wang H, Yang X, Yang J, Xiong W, et al. Glucocorticoids Suppress Antimicrobial Autophagy and Nitric Oxide Production and Facilitate Mycobacterial Survival in Macrophages. *Scientific Reports* (2017) **7**:982. doi: 10.1038/s41598-017-01174-9. PubMed PMID: PMC5430514.
75. Scheschowitsch K, Leite JA, Assreuy J. New Insights in Glucocorticoid Receptor Signaling—More Than Just a Ligand-Binding Receptor. *Frontiers in Endocrinology* (2017) **8**:16. doi: 10.3389/fendo.2017.00016. PubMed PMID: PMC5292432.
76. Garabedian MJ, Harris CA, Jeanneteau F. Glucocorticoid receptor action in metabolic and neuronal function. *F1000Research* (2017) **6**:1208. doi: 10.12688/f1000research.11375.1. PubMed PMID: PMC5531160.
77. Fietz ER, Keenan CR, López-Campos G, Tu Y, Johnstone CN, Harris T, et al. Glucocorticoid resistance of migration and gene expression in a daughter MDA-MB-231 breast tumour cell line selected for high metastatic potential. *Scientific Reports* (2017) **7**:43774. doi: 10.1038/srep43774. PubMed PMID: PMC5338339.
78. Gendron D, Lemay AM, Tremblay C, Lai L, Langlois A, Bernatchez E, et al. Treatment with a sphingosine analog after the inception of house dust mite-induced airway inflammation alleviates key features of experimental asthma. *Respir Res* (2015) **16**(1):7. Epub 2015/02/04. doi: s12931-015-0180-z [pii] 10.1186/s12931-015-0180-z. PubMed PMID: 25645346.
79. Liao W, Dong J, Peh HY, Tan LH, Lim KS, Li L, et al. Oligonucleotide Therapy for Obstructive and Restrictive Respiratory Diseases. *Molecules* (2017) **22**(1). Epub 2017/01/21. doi: E139 [pii] 10.3390/molecules22010139 molecules22010139 [pii]. PubMed PMID: 28106744.
80. Caplan A, Fett N, Rosenbach M, Werth VP, Micheletti RG. Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: A comprehensive review: A review of glucocorticoid pharmacology and bone health. *J Am Acad Dermatol* (2017) **76**(1):1-9. Epub 2016/12/18. doi: S0190-9622(16)30044-5 [pii] 10.1016/j.jaad.2016.01.062. PubMed PMID: 27986132.
81. Jin Z, Lin H, Srinivasan S, Nwachukwu JC, Bruno N, Griffin PR, et al. Synthesis of novel steroidal agonists, partial agonists, and antagonists for the glucocorticoid receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2017) **27**(2):347-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.007>.
82. Meduri GU, Golden E, Freire AX, Taylor E, Zaman M, Carson SJ, et al. Methylprednisolone Infusion in Early Severe ARDS: Results of a Randomized Controlled Trial. *Chest* (2007) **131**(4):954-63. doi: <https://doi.org/10.1378/chest.06-2100>.
83. The National Heart Lung, Network BIARDSCT. Efficacy and Safety of Corticosteroids for Persistent Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine* (2006) **354**(16):1671-84. doi: 10.1056/NEJMoa051693. PubMed PMID: 16625008.

84. Spadaccini M, D'Alessio S, Peyrin-Biroulet L, Danese S. PDE4 Inhibition and Inflammatory Bowel Disease: A Novel Therapeutic Avenue. *International Journal of Molecular Sciences* (2017) **18**(6):1276. doi: 10.3390/ijms18061276. PubMed PMID: PMC5486098.
85. Yang J-X, Hsieh K-C, Chen Y-L, Lee C-K, Conti M, Chuang T-H, et al. Phosphodiesterase 4B negatively regulates endotoxin-activated interleukin-1 receptor antagonist responses in macrophages. *Scientific Reports* (2017) **7**:46165. doi: 10.1038/srep46165. PubMed PMID: PMC5382768.
86. GOLD. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease - updated 2014. *Global initiative for chronic obstructive lung disease report* (2014).
87. Calverley P. Current drug treatment, chronic and acute. *Clin Chest Med* (2014) **35**(1):177-89. Epub 2014/02/11. doi: 10.1016/j.ccm.2013.09.009 S0272-5231(13)00139-1 [pii]. PubMed PMID: 24507845.
88. Krishnamoorthy V, Chung L. Bench-to-bedside: The use of local anesthetics to attenuate inflammation in acute respiratory distress syndrome. *International Journal of Critical Illness and Injury Science* (2014) **4**(2):98-100. doi: 10.4103/2229-5151.134143. PubMed PMID: PMC4093975.
89. Fozzard HA, Lee PJ, Lipkind GM. Mechanism of Local Anesthetic Drug Action on Voltage-Gated Sodium Channels. *Current Pharmaceutical Design* (2005) **11**(21):2671-86. doi: 10.2174/1381612054546833.
90. Wang D, Wu X, Li J, Xiao F, Liu X, Meng M. The effect of lidocaine on early postoperative cognitive dysfunction after coronary artery bypass surgery. *Anesth Analg* (2002) **95**(5):1134-41.
91. Pelz K, Wiedmann-Al-Ahmad M, Bogdan C, Otten J-E. Analysis of the antimicrobial activity of local anaesthetics used for dental analgesia. *Journal of Medical Microbiology* (2008) **57**(1):88-94. doi: doi:10.1099/jmm.0.47339-0.
92. Sakaguchi M, Kuroda Y, Hirose M. The antiproliferative effect of lidocaine on human tongue cancer cells with inhibition of the activity of epidermal growth factor receptor. *Anesth Analg* (2006) **102**(4):1103-7.
93. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: A new therapeutic indication? *Anesthesiology* (2000) **93**(3):858-75. PubMed PMID: 10969322.
94. Moore PA, Hersh EV. Local Anesthetics: Pharmacology and Toxicity. *Dental Clinics of North America* (2010) **54**(4):587-99. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.06.015>.
95. Daykin H. The efficacy and safety of intravenous lidocaine for analgesia in the older adult: a literature review. *British Journal of Pain* (2017) **11**(1):23-31. doi: 10.1177/2049463716676205. PubMed PMID: PMC5370626.

96. Nietgen GW, Chan CK, Durieux ME. Inhibition of lysophosphatidate signaling by lidocaine and bupivacaine. *Anesthesiology* (1997) **86**(5):1112-9.
97. Olschewski A, Bräu ME, Olschewski H, Hempelmann G, Vogel W. ATP-Dependent Potassium Channel in Rat Cardiomyocytes Is Blocked by Lidocaine. *Possible Impact on the Antiarrhythmic Action of Lidocaine* (1996) **93**(4):656-9. doi: 10.1161/01.cir.93.4.656.
98. Krodel EK, Becjman RA, Cohen JB. Identification of a Local Anesthetic Binding Site in Nicotinic Post-Synaptic Membranes Isolated from *Torpedo marmorata* Electric Tissue. *Molecular Pharmacology* (1979) **15**(2):294-312.
99. Scholz A, Kuboyama N, Hempelmann G, Vogel W. Complex blockade of TTX-resistant Na⁺ currents by lidocaine and bupivacaine reduce firing frequency in DRG neurons. *J Neurophysiol* (1998) **79**(4):1746-54.
100. Hollmann MW, Fischer LG, Byford AM, Durieux ME. Local anesthetic inhibition of m1 muscarinic acetylcholine signaling. *Anesthesiology* (2000) **93**(2):497-509. Epub 2000/07/26. PubMed PMID: 10910501.
101. Hattori M, Dohi S, Nozaki M, Niwa M, Shimonaka H. The inhibitory effects of local anesthetics on superoxide generation of neutrophils correlate with their partition coefficients. *Anesth Analg* (1997) **84**(2):405-12.
102. Schreiner A, Hopen G. Adhesion and locomotion of human leukocytes in vitro; importance of protein coating; effect of lidocain, ethanol and endotoxin. *Acta Pathol Microbiol Scand C* (1979) **87**(5):333-40. PubMed PMID: 117672.
103. Hollmann MDMarkus W, Gross A, Jelacin N, Durieux MDPDMarcel E. Local Anesthetic Effects on Priming and Activation of Human Neutrophils. *Anesthesiology* (2001) **95**(1):113-22.
104. Schiffer CA, Sanel FT, Young VB, Aisner J. Reversal of granulocyte adherence to nylon fibers using local anesthetic agents: possible application to filtration leukapheresis. *Blood* (1977) **50**(2):213-25.
105. Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Shiga M, Maekawa N, Obara H. Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology* (1998) **88**(5):1300-9.
106. Mikawa MDK, Maekawa MDN, Nishina MDK, Takao MDY, Yaku MDH, Obara MDH. Effect of Lidocaine Pretreatment on Endotoxin-induced Lung Injury in Rabbits. *Anesthesiology* (1994) **81**(3):689-99.
107. Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, Cassuto J, Thomsen P. Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB₄ release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* (1993) **37**(2):159-65.
108. Takao Y, Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, Obara H. Lidocaine attenuates hyperoxic lung injury in rabbits. *Acta Anaesthesiol Scand* (1996) **40**(3):318-25.

109. Van Der Wal S, Vaneker M, Steegers M, Van Berkum B, Kox M, Van Der Laak J, et al. Lidocaine increases the anti-inflammatory cytokine IL-10 following mechanical ventilation in healthy mice. *Acta Anaesthesiol Scand* (2015) **59**(1):47-55. Epub 2014/10/15. doi: 10.1111/aas.12417. PubMed PMID: 25312651.
110. Hunt LW, Frigas E, Butterfield JH, Kita H, Blomgren J, Dunnette SL, et al. Treatment of asthma with nebulized lidocaine: A randomized, placebo-controlled study. *J Allergy Clin Immunol* (2004) **113**(5):853-9. PubMed PMID: 15131566.
111. Tanaka A, Minoguchi K, Oda N, Yokoe T, Matsuo H, Okada S, et al. Inhibitory effect of lidocaine on T cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2002) **109**(3):485-90. PubMed PMID: 11897996.
112. Rosario NA, Riedi CA, Farias L. Lidocaine nebulization for treatment of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* (2000) **85**(3):245-6. PubMed PMID: 11030282.
113. Okada S, Hagan JB, Kato M, Bankers-Fulbright JL, Hunt LW, Gleich GJ, et al. Lidocaine and its analogues inhibit IL-5-mediated survival and activation of human eosinophils. *J Immunol* (1998) **160**(8):4010-7. PubMed PMID: 9558110.
114. Hunt LW, Swedlund HA, Gleich GJ. Effect of nebulized lidocaine on severe glucocorticoid-dependent asthma. *Mayo Clin Proc* (1996) **71**(4):361-8. PubMed PMID: 8637259.
115. Saito K, Sato N, Shimono N, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. A pregnant woman with severe asthma effectively treated by inhalational lidocaine therapy. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* (2006) **44**(11):828-32. PubMed PMID: 17144581.
116. Groeben H, Grosswendt T, Silvanus MT, Pavlakovic G, Peters J. Airway anesthesia alone does not explain attenuation of histamine-induced bronchospasm by local anesthetics: A comparison of lidocaine, ropivacaine, and dyclonine. *Anesthesiology* (2001) **94**(3):423-8. PubMed PMID: 11374600.
117. Enright PL, McNally JF, Souhrada JF. Effect of lidocaine on the ventilatory and airway responses to exercise in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* (1980) **122**(6):823-8. PubMed PMID: 7458056.
118. Fish JE, Peterman VI. Effects of inhaled lidocaine on airway function in asthmatic subjects. *Respiration* (1979) **37**(4):201-7. PubMed PMID: 472500.
119. Weiss EB, Patwardhan AV. The response to lidocaine in bronchial asthma. *Chest* (1977) **72**(4):429-38. PubMed PMID: 332458.
120. Miller WC, Awe R. Effect of nebulized lidocaine on reactive airways. *Am Rev Respir Dis* (1975) **111**(6):739-41. PubMed PMID: 1137242.
121. da Costa JC, Olsen PC, de Azeredo Siqueira R, de Frias Carvalho V, Serra MF, Alves LA, et al. JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic

- inflammation in rats. *J Allergy Clin Immunol* (2007) **119**(1):219-25. PubMed PMID: 17208605.
122. Olsen PC, Coelho LP, da Costa JC, Cordeiro RS, Silva PM, Martins MA. Two for one: cyclic AMP mediates the anti-inflammatory and anti-spasmodic properties of the non-anesthetic lidocaine analog JMF2-1. *Eur J Pharmacol* (2012) **680**(1-3):102-7. Epub 2012/02/15. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.01.040 S0014-2999(12)00110-0 [pii]. PubMed PMID: 22329902.
123. Costa JC, Neves JS, de Souza MV, Siqueira RA, Romeiro NC, Boechat N, et al. Synthesis and antispasmodic activity of lidocaine derivatives endowed with reduced local anesthetic action. *Bioorg Med Chem Lett* (2008) **18**(3):1162-6. PubMed PMID: 18083513.
124. Olsen PC, Ferreira TP, Serra MF, Farias-Filho FA, Fonseca BP, Viola JP, et al. Lidocaine-derivative JMF2-1 prevents ovalbumin-induced airway inflammation by regulating the function and survival of T cells. *Clin Exp Allergy* (2011) **41**(2):250-9. Epub 2010/09/30. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03580.x. PubMed PMID: 20874831.
125. Serra MF, Neves JS, Couto GC, Cotias AC, Pao CR, Olsen PC, et al. JM25-1, a Lidocaine Analog Combining Airway Relaxant and Antiinflammatory Properties: Implications for New Bronchospasm Therapy. *Anesthesiology* (2016) **124**(1):109-20. doi: 10.1097/ALN.0000000000000919. PubMed PMID: 26669988.
126. Jarvis B, Coukell AJ. Mexiletine. A review of its therapeutic use in painful diabetic neuropathy. *Drugs* (1998) **56**(4):691-707. Epub 1998/11/07. PubMed PMID: 9806111.
127. Monk JP, Brogden RN. Mexiletine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in the treatment of arrhythmias. *Drugs* (1990) **40**(3):374-411. Epub 1990/09/01. PubMed PMID: 2226221.
128. Groeben H, Foster WM, Brown RH. Intravenous lidocaine and oral mexiletine block reflex bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* (1996) **154**(4 Pt 1):885-8. Epub 1996/10/01. doi: 10.1164/ajrccm.154.4.8887580. PubMed PMID: 8887580.
129. Zemenick RB. Lidocaine and oral mexiletine block reflex bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* (1997) **156**(5):1703-4. Epub 1997/12/31. PubMed PMID: 9372699.
130. Carvalho KIM. Estudo do potencial antiasmático de novos derivados do anestésico local mexiletina Estudo do potencial antiasmático de novos derivados do anestésico local mexiletina Rio de Janeiro: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (2016).
131. Poonia N, Kharb R, Lather V, Pandita D. Nanostructured lipid carriers: versatile oral delivery vehicle. *Future Science OA* (2016) **2**(3):FSO135. doi: 10.4155/fsoa-2016-0030. PubMed PMID: PMC5137980.
132. Contreras JE, Rodriguez EA, Taha-Tijerina J. Nanotechnology applications for electrical transformers—A review. *Electric Power Systems Research* (2017) **143**:573-84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.epsr.2016.10.058>.

133. Chiumello D, Brioni M. Severe hypoxemia: which strategy to choose. *Critical Care* (2016) **20**:132. doi: 10.1186/s13054-016-1304-7. PubMed PMID: PMC4891828.
134. Lamb KD. Year in Review 2014: Mechanical Ventilation. *Respiratory Care* (2015) **60**(4):606-8. doi: 10.4187/respcare.04112.
135. Cannon JW, Gutsche JT, Brodie D. Optimal Strategies for Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *Critical Care Clinics* (2017) **33**(2):259-75. doi: 10.1016/j.ccc.2016.12.010.
136. Khan I, Khan M, Umar MN, Oh DH. Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. *IET Nanobiotechnol* (2015) **9**(6):396-400.
137. Badrealam KF, M. Nanoscale drug delivery systems: An updated view. (2014. In: *Nanobiotechnology* [Internet]. Manchester: Phoenix, D.A. and Ahmed, W.; [180-204].
138. Bilia AR, Piazzini V, Guccione C, Risaliti L, Asprea M, Capecchi G, et al. Improving on Nature: The Role of Nanomedicine in the Development of Clinical Natural Drugs. *Planta Med* (2017) **83**(5):366-81.
139. Bangham AD, Standish MM, Weissmann G. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *J Mol Biol* (1965) **13**(1):253-9.
140. Sessa G, Weissmann G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res* (1968) **9**(3):310-8.
141. Khanna SC, Jecklin T, Speiser P. Bead polymerization technique for sustained-release dosage form. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1970) **59**(5):614-8. doi: 10.1002/jps.2600590508.
142. Khanna SC, Speiser P. Epoxy resin beads as a pharmaceutical dosage form I: Method of preparation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1969) **58**(9):1114-7. doi: 10.1002/jps.2600580916.
143. Giovinazzo H, Kumar P, Sheikh A, Brooks KM, Ivanovic M, Walsh M, et al. Technetium Tc 99m sulfur colloid phenotypic probe for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of PEGylated liposomal doxorubicin in women with ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* (2016) **77**(3):565-73.
144. Singh A. Review: Application of Nanomaterial in Different Areas. *International Journal of New Technology and Research* (2017) **3**(2):3.
145. Siafaka PI, Ustundag Okur N, Karavas E, Bikiaris DN. Surface Modified Multifunctional and Stimuli Responsive Nanoparticles for Drug Targeting: Current Status and Uses. *Int J Mol Sci* (2016) **17**(9).
146. Conte R, Marturano V, Peluso G, Calarco A, Cerruti P. Recent Advances in Nanoparticle-Mediated Delivery of Anti-Inflammatory Phytocompounds. *International*

- Journal of Molecular Sciences* (2017) **18**(4):709. doi: 10.3390/ijms18040709. PubMed PMID: PMC5412295.
147. Ediriwickrema A, Saltzman WM. Nanotherapy for Cancer: Targeting and Multifunctionality in the Future of Cancer Therapies. *ACS Biomaterials Science & Engineering* (2015) **1**(2):64-78. doi: 10.1021/ab500084g. PubMed PMID: PMC4426346.
148. Nehoff H, Parayath NN, Domanovitch L, Taurin S, Greish K. Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *International Journal of Nanomedicine* (2014) **9**:2539-55. doi: 10.2147/ijn.s47129. PubMed PMID: PMC4039421.
149. Paris JL, de la Torre P, Victoria Cabanas M, Manzano M, Grau M, Flores AI, et al. Vectorization of ultrasound-responsive nanoparticles in placental mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Nanoscale* (2017) **9**(17):5528-37. Epub 2017/04/13. doi: 10.1039/c7nr01070b. PubMed PMID: 28402365.
150. Northfelt DW, Martin FJ, Working P, Volberding PA, Russell J, Newman M, et al. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Pharmacol* (1996) **36**(1):55-63.
151. Caster JM, Patel AN, Zhang T, Wang A. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* (2017) **9**(1). Epub 2016/06/18. doi: 10.1002/wnan.1416. PubMed PMID: 27312983.
152. Andre EM, Passirani C, Seijo B, Sanchez A, Montero-Menei CN. Nano and microcarriers to improve stem cell behaviour for neuroregenerative medicine strategies: Application to Huntington's disease. *Biomaterials* (2016) **83**:347-62.
153. Coniot J, Silva JM, Fernandes JG, Silva LC, Gaspar R, Brocchini S, et al. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Front Chem* (2014) **2**(105).
154. Lee JJ, Saiful Yazan L, Che Abdullah CA. A review on current nanomaterials and their drug conjugate for targeted breast cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine* (2017) **12**:2373-84. doi: 10.2147/ijn.s127329. PubMed PMID: PMC5376210.
155. Gehrcke M, Giuliani LM, Ferreira LM, Barbieri AV, Sari MHM, da Silveira EF, et al. Enhanced photostability, radical scavenging and antitumor activity of indole-3-carbinol-loaded rose hip oil nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C* (2017) **74**:279-86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.006>.
156. Sánchez-Moreno P, Ortega-Vinuesa JL, Martín-Rodríguez A, Boulaiz H, Marchal-Corrales JA, Peula-García JM. Characterization of Different Functionalized Lipidic Nanocapsules as Potential Drug Carriers. *International Journal of Molecular Sciences* (2012) **13**(2):2405-24. doi: 10.3390/ijms13022405. PubMed PMID: PMC3292030.

157. Wibowo D, Hui Y, Middelberg APJ, Zhao C-X. Interfacial engineering for silica nanocapsules. *Advances in Colloid and Interface Science* (2016) **236**:83-100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.08.001>.
158. Sun H, Yarovoy I, Capeling M, Cheng C. Polymers in the Co-delivery of siRNA and Anticancer Drugs for the Treatment of Drug-resistant Cancers. *Top Curr Chem* (2017) **375**(2):017-0113.
159. Yurgel V, Collares T, Seixas F. Developments in the use of nanocapsules in oncology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2013) **46**(6):486-501. doi: 10.1590/1414-431x20132643. PubMed PMID: PMC3854440.
160. Martin C, Aibani N, Callan JF, Callan B. Recent advances in amphiphilic polymers for simultaneous delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. *Ther Deliv* (2016) **7**(1):15-31.
161. Frank LA, Contri RV, Beck RC, Pohlmann AR, Guterres SS. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* (2015) **7**(5):623-39.
162. Beck RC, Ourique AF, Guterres SS, Pohlmann AR. Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents. *Recent Pat Drug Deliv Formul* (2012) **6**(3):195-208.
163. Faridi Esfanjani A, Jafari SM. Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids Surf B Biointerfaces* (2016) **146**:532-43.
164. Nandiyanto ABD, Okuyama K. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. *Advanced Powder Technology* (2011) **22**(1):1-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.appt.2010.09.011>.
165. Al-Khattawi A, Bayly A, Phillips A, Wilson D. The design and scale-up of spray dried particle delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* (2017):1-17. doi: 10.1080/17425247.2017.1321634.
166. Abedalwafa M, Wang F, Wang L, Li C. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review. *Rev Adv Mater Sci* (2013) **34**:123-40.
167. Yan XQ, Shi YL, Jiang QF, Ping GF, Deng ZJ. Design of Amphiphilic PCL-PEG-PCL block Copolymers as Vehicles of Ginkgolide B and their brain-targeting studies. *J Biomater Sci Polym Ed* (2017) **22**:1-34.
168. Rigo LA, Carvalho-Wodarz CS, Pohlmann AR, Guterres SS, Schneider-Daum N, Lehr CM, et al. Nanoencapsulation of a glucocorticoid improves barrier function and anti-inflammatory effect on monolayers of pulmonary epithelial cell lines. *Eur J Pharm Biopharm* (2017) **13**(16):30498-2.

169. Desai PM, Date AA, Patravale VB. Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations - opportunities and limitations. *Drug Discov Today Technol* (2012) **9**(2):e71-e174. Epub 2012/07/01. doi: 10.1016/j.ddtec.2011.12.001 S1740-6749(11)00034-5 [pii]. PubMed PMID: 24064268.
170. Hua S, Marks E, Schneider JJ, Keely S. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: selective targeting to diseased versus healthy tissue. *Nanomedicine* (2015) **11**(5):1117-32.
171. Miller DS, Parsons AM, Bresland J, Herde P, Pham DM, Tan A, et al. A simple and inexpensive enteric-coated capsule for delivery of acid-labile macromolecules to the small intestine. *Journal of Zhejiang University Science B* (2015) **16**(7):586-92. doi: 10.1631/jzus.B1400290. PubMed PMID: PMC4506949.
172. Jones CR, Hatley OJD, Ungell A-L, Hilgendorf C, Peters SA, Rostami-Hodjegan A. Gut Wall Metabolism. Application of Pre-Clinical Models for the Prediction of Human Drug Absorption and First-Pass Elimination. *The AAPS Journal* (2016) **18**(3):589-604. doi: 10.1208/s12248-016-9889-y. PubMed PMID: PMC5256607.
173. Jain D, Panda AK, Majumdar DK. Eudragit S100 entrapped insulin microspheres for oral delivery. *AAPS PharmSciTech* (2005) **6**(1):E100-E7. doi: 10.1208/pt060116. PubMed PMID: PMC2750417.
174. Karn PR, Vanic Z, Pepic I, Skalko-Basnet N. Mucoadhesive liposomal delivery systems: the choice of coating material. *Drug Dev Ind Pharm* (2011) **37**(4):482-8. Epub 2010/10/22. doi: 10.3109/03639045.2010.523425. PubMed PMID: 20961263.
175. Paolino D, Vero A, Cosco D, Pecora TMG, Cianciolo S, Fresta M, et al. Improvement of Oral Bioavailability of Curcumin upon Microencapsulation with Methacrylic Copolymers. *Frontiers in Pharmacology* (2016) **7**:485. doi: 10.3389/fphar.2016.00485. PubMed PMID: PMC5174134.
176. Iyer R, Hsia CCW, Nguyen KT. Nano-Therapeutics for the Lung: State-of-the-Art and Future Perspectives. *Current Pharmaceutical Design* (2015) **21**(36):5233-44. PubMed PMID: PMC4739652.
177. Braakhuis HM, Kloet SK, Kezic S, Kuper F, Park MVDZ, Bellmann S, et al. Progress and future of in vitro models to study translocation of nanoparticles. *Archives of Toxicology* (2015) **89**:1469-95. doi: 10.1007/s00204-015-1518-5. PubMed PMID: PMC4551544.
178. Lu X, Zhu T, Chen C, Liu Y. Right or Left: The Role of Nanoparticles in Pulmonary Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* (2014) **15**(10):17577-600. doi: 10.3390/ijms151017577. PubMed PMID: PMC4227179.
179. Barreto E, Serra MF, Dos Santos RV, Dos Santos CE, Hickmann J, Cotias AC, et al. Local Administration of Gold Nanoparticles Prevents Pivotal Pathological Changes in Murine Models of Atopic Asthma. *J Biomed Nanotechnol* (2015) **11**(6):1038-50.

180. Rodrigues NF, van Tilburg Bernardes E, Rocha RP, da Costa LC, Coutinho AC, dos Santos Muniz M, et al. Bovine serum albumin nanoparticle vaccine reduces lung pathology induced by live *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Vaccine* (2013) **31**(44):5062-6. Epub 2013/09/12. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.08.078 S0264-410X(13)01190-0 [pii]. PubMed PMID: 24021308.
181. Lu N, Li R, Liu Q, Hu B, Xu X, Ji C, et al. Antitumor and antimetastatic effects of pemetrexed-loaded targeted nanoparticles in B16 bearing mice. *Drug Deliv* (2016) **23**(7):2566-74. Epub 2016/10/18. doi: 10.3109/10717544.2015.1033794. PubMed PMID: 26000825.
182. Ashish A, Hiralal S, Prajkta L, Dheeraj T, Dinesh K. Pulmonary Drug Delivery System. *International Journal of PharmTech Research* (2012) **4**(1):13.
183. Song M, Li L, Zhang Y, Chen K, Wang H, Gong R. Carboxymethyl- β -cyclodextrin grafted chitosan nanoparticles as oral delivery carrier of protein drugs. *Reactive and Functional Polymers* (2017) **117**:10-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.05.008>.
184. Lim SB, Rubinstein I, Sadikot RT, Artwohl JE, Önyüksel H. A Novel Peptide Nanomedicine Against Acute Lung Injury: GLP-1 in Phospholipid Micelles. *Pharmaceutical research* (2011) **28**(3):662-72. doi: 10.1007/s11095-010-0322-4. PubMed PMID: PMC3789646.
185. Chu D, Gao J, Wang Z. Neutrophil-Mediated Delivery of Therapeutic Nanoparticles across Blood Vessel Barrier for Treatment of Inflammation and Infection. *ACS nano* (2015) **9**(12):11800-11. doi: 10.1021/acsnano.5b05583. PubMed PMID: PMC4699556.
186. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* (1989) **55**(1):R1-R4. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0).
187. Ortiz M. Dry powders inhalers (dpi) obtidos a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo budesonida: Caracterização, avaliação in vivo em modelos animais de asma e da toxicidade in vitro em cultura celular. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (2016).
188. Bernardi A, Frozza RL, Hoppe JB, Salbego C, Pohlmann AR, Battastini AM, et al. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. *Int J Nanomedicine* (2013) **8**:711-28.
189. Carvalho EM, Brito GAC, Pessoa BBGP, Ribeiro RA, Capaz FR. Long-term ethanol intoxication reduces inflammatory responses in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2005) **38**:81-9.
190. D`Almeida APL, Oliveira MTPd, Souza ÉTd, Coutinho DdS, Ciambarella BT, Gomes CR, et al. α -bisabolol-loaded lipid-core nanocapsules reduce lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. *Dove Medical Press* (2017) **12**:13.

191. Coutinho DS, Anjos-Valotta EA, do Nascimento CVMF, Pires ALA, Napimoga MH, Carvalho VF, et al. 15-Deoxy-Delta-12,14-Prostaglandin J2 Inhibits Lung Inflammation and Remodeling in Distinct Murine Models of Asthma. *Frontiers in Immunology* (2017) **8**(740). doi: 10.3389/fimmu.2017.00740.
192. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* (1985) **150**(1):76-85.
193. Ruhl AP, Huang M, Colantuoni E, Karmarkar T, Dinglas VD, Hopkins RO, et al. Healthcare utilization and costs in ARDS survivors: a 1-year longitudinal national US multicenter study. *Intensive Care Medicine* (2017) **43**(7):980-91. doi: 10.1007/s00134-017-4827-8.
194. Vollrath A, Schubert S, Windhab N, Biskup C, Schubert US. Labeled Nanoparticles Based on Pharmaceutical EUDRAGIT(R) S 100 Polymers. *Macromol Rapid Commun* (2010) **31**(23):2053-8. Epub 2011/05/14. doi: 10.1002/marc.201000373. PubMed PMID: 21567630.
195. Parasuraman S. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* (2011) **2**(2):74-9. doi: 10.4103/0976-500x.81895. PubMed PMID: PMC3127354.
196. Robinson S, Chapman K, Hudson S, Sparrow S, Spencer-Briggs D, Danks A, et al. National Centre for the replacement, refinement and reduction of animals in research. Guidance on dose level selection for regulatory general toxicology studies for pharmaceuticals. (2009).
197. Olfert E, Bhasin J, Latt R, Macallum E, McCutcheon K, Rainnie D, et al. Canadian Council on Animal Care. Guidelines on: Choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. (1998).
198. Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* (1998) **24**(12):1113-28. Epub 1999/01/07. doi: 10.3109/03639049809108571. PubMed PMID: 9876569.
199. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LdL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* (2003) **26**:726-37.
200. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* (2001) **70**(1-2):1-20. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4).
201. Leroueil-Le Verger M, Fluckiger L, Kim Y-I, Hoffman M, Maincent P. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (1998) **46**(2):137-43. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00015-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00015-0).

202. Chernysheva YV, Babak VG, Kildeeva NR, Boury F, Benoit JP, Ubrich N, et al. Effect of the type of hydrophobic polymers on the size of nanoparticles obtained by emulsification–solvent evaporation. *Mendeleev Communications* (2003) **13**(2):65-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1070/MC2003v013n02ABEH001690>.
203. Babak VG, Baros F, Boulanouar O, Boury F, Fromm M, Kildeeva NR, et al. Impact of bulk and surface properties of some biocompatible hydrophobic polymers on the stability of methylene chloride-in-water mini-emulsions used to prepare nanoparticles by emulsification–solvent evaporation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2007) **59**(2):194-207. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.05.010>.
204. Souto EB, Severino P, Santana MHA. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. *Polímeros* (2012) **22**:101-6.
205. Sahana DK, Mittal G, Bhardwaj V, Kumar MN. PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *J Pharm Sci* (2008) **97**(4):1530-42.
206. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* (2002) **19**(2):99-134. PubMed PMID: 12197610.
207. Fonseca C, Simoes S, Gaspar R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J Control Release* (2002) **83**(2):273-86. Epub 2002/10/05. doi: S0168365902002122 [pii]. PubMed PMID: 12363453.
208. Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* (2001) **47**(2-3):165-96. Epub 2001/04/20. doi: S0169-409X(01)00105-3 [pii]. PubMed PMID: 11311991.
209. Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol Sci* (2006) **90**(2):296-303. Epub 2006/01/13. doi: kfj099 [pii] 10.1093/toxsci/kfj099. PubMed PMID: 16407094.
210. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* (2008) **112**(43):13608-19. Epub 2008/10/04. doi: 10.1021/jp712087m. PubMed PMID: 18831567.
211. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights* (2007) **2**:147-57. Epub 2007/01/01. PubMed PMID: 21901071; PubMed Central PMCID: PMC3155227.
212. Xu R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology* (2008) **6**(2):112-5. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.partic.2007.12.002>.

213. Frank LA, Sandri G, D'Autilia F, Contri RV, Bonferoni MC, Caramella C, et al. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. *Int J Nanomedicine* (2014) **9**:3151-61. Epub 2014/07/26. doi: 10.2147/IJN.S62599 ijn-9-3151 [pii]. PubMed PMID: 25061292; PubMed Central PMCID: PMC4085301.
214. Ahuja M, Dhake AS, Sharma SK, Majumdar DK. Diclofenac-loaded Eudragit S100 nanosuspension for ophthalmic delivery. *J Microencapsul* (2011) **28**(1):37-45. Epub 2010/12/22. doi: 10.3109/02652048.2010.523794. PubMed PMID: 21171815.
215. Prakash SEL, Manavalan R. Development, characterisation and/toxicity evaluation of nanoparticles of andrographolide. (2012).
216. Luykx DM, Peters RJ, van Ruth SM, Bouwmeester H. A review of analytical methods for the identification and characterization of nano delivery systems in food. *J Agric Food Chem* (2008) **56**(18):8231-47. Epub 2008/09/02. doi: 10.1021/jf8013926. PubMed PMID: 18759445.
217. Bakshi M, Singh S. Development of validated stability-indicating assay methods--critical review. *J Pharm Biomed Anal* (2002) **28**(6):1011-40. Epub 2002/06/07. doi: S073170850200047X [pii]. PubMed PMID: 12049968.
218. Vineela C, Krishna S. Preparation of Ibuprofen-loaded Eudragit S100 nanoparticles by Solvent evaporation technique. *International Journal of Pharma Sciences and Research* (2014) **5**(7):375-84.
219. Papadimitriou S, Papageorgiou GZ, Kanaze FI, Georgarakis M, Bikiaris DN. Nanoencapsulation of Nimodipine in Novel Biocompatible Poly(propylene-co-butylene succinate) Aliphatic Copolyesters for Sustained Release. *Journal of Nanomaterials* (2009) **2009**:11. doi: 10.1155/2009/716242.
220. Schaffazick SR, Pohlmann AR, Mezzalira G, Guterres SS. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (2006) **17**:562-9.
221. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2008) **295**(3):L379-99. Epub 2008/07/16. doi: 10.1152/ajplung.00010.2008 00010.2008 [pii]. PubMed PMID: 18621912; PubMed Central PMCID: PMC2536793.
222. Faffe DS, Seidl VR, Chagas PS, Goncalves de Moraes VL, Capelozzi VL, Rocco PR, et al. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. *Eur Respir J* (2000) **15**(1):85-91. Epub 2000/03/04. PubMed PMID: 10678626.
223. Wang HM, Bodenstein M, Markstaller K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *Eur Surg Res* (2008) **40**(4):305-16. Epub 2008/03/20. doi: 10.1159/000121471 000121471 [pii]. PubMed PMID: 18349543.

224. Ma CH, Liu JP, Qu R, Ma SP. Tectorigenin inhibits the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice. *Chin J Nat Med* (2014) **12**(11):841-6. Epub 2014/12/07. doi: 10.1016/S1875-5364(14)60126-6
S1875-5364(14)60126-6 [pii]. PubMed PMID: 25480515.
225. Ohtake N, Suzuki R, Daikuhara H, Nakai Y, Yamamoto M, Amagaya S, et al. Modulation of lung local immune responses by oral administration of a herbal medicine Sho-saiko-to. *Int J Immunopharmacol* (2000) **22**(6):419-30. Epub 2000/03/23. doi: S0192-0561(00)00007-2 [pii]. PubMed PMID: 10727753.
226. Korkmaz B, Jenne DE, Gauthier F. Relevance of the mouse model as a therapeutic approach for neutrophil proteinase 3-associated human diseases. *International Immunopharmacology* (2013) **17**(4):1198-205. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.07.003>.
227. Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ. Role of Matrix Metalloproteinases in Models of Macrophage-Dependent Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (1999) **20**(6):1145-54. doi: 10.1165/ajrcmb.20.6.3482.
228. Pedersen JL, Callesen T, Moiniche S, Kehlet H. Analgesic and anti-inflammatory effects of lignocaine-prilocaine (EMLA) cream in human burn injury. *Br J Anaesth* (1996) **76**(6):806-10. Epub 1996/06/01. PubMed PMID: 8679354.
229. Beloeil H, Ababneh Z, Chung R, Zurakowski D, Mulkern RV, Berde CB. Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (Part 1): hyperalgesia, edema, and systemic cytokines. *Anesthesiology* (2006) **105**(1):128-38. Epub 2006/07/01. doi: 00000542-200607000-00022 [pii]. PubMed PMID: 16810004.
230. Schmidt MDW, Schmidt MDDH, Bauer MDH, Gebhard MDMM, Martin MDFE. Influence of Lidocaine on Endotoxin-induced Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion and Macromolecular Leakage in Vivo. *Anesthesiology* (1997) **87**(3):617-24.
231. Plapied L, Duhem N, des Rieux A, Pr eat V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* (2011) **16**(3):228-37. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2010.12.005>.
232. Hunter AC, Elsom J, Wibroe PP, Moghimi SM. Polymeric particulate technologies for oral drug delivery and targeting: a pathophysiological perspective. *Nanomedicine* (2012) **8 Suppl 1**:S5-20. Epub 2012/08/01. doi: 10.1016/j.nano.2012.07.005
S1549-9634(12)00406-6 [pii]. PubMed PMID: 22846372.
233. Tang J, Xu N, Ji H, Liu H, Wang Z, Wu L. Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment. *International Journal of Nanomedicine* (2011) **6**:2429-35. doi: 10.2147/ijn.s24185. PubMed PMID: PMC3205137.
234. Win KY, Feng SS. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* (2005) **26**(15):2713-22.

235. Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* (2011) **48**(1):8-19. doi: 10.3164/jcbtn.11-006FR. PubMed PMID: PMC3022070.
236. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. *J Investig Dermatol* (1982) **78**(3):206-9.
237. Chevalier E, Petoux F, Chovet M, Langlois A. Beneficial effect of trimebutine and N-monodesmethyl trimebutine on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Life Sci* (2004) **76**(3):319-29. Epub 2004/11/09. doi: S0024-3205(04)00815-X [pii] 10.1016/j.lfs.2004.08.011. PubMed PMID: 15531383.
238. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clinica Chimica Acta* (2010) **411**(21-22):1570-9. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.07.006.
239. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *International anesthesiology clinics* (2007) **45**(2):27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e. PubMed PMID: PMC2785020.
240. Marini JC, Broussard SR. Hyperammonemia increases sensitivity to LPS. *Mol Genet Metab* (2006) **88**(2):131-7. Epub 2006/02/25. doi: S1096-7192(06)00002-3 [pii] 10.1016/j.ymgme.2005.12.013. PubMed PMID: 16497529.
241. Keyel PA. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine* (2014) **69**(1):136-45. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.03.007.
242. Suzuki N, Hasegawa-Moriyama M, Takahashi Y, Kamikubo Y, Sakurai T, Inada E. Lidocaine attenuates the development of diabetic-induced tactile allodynia by inhibiting microglial activation. *Anesth Analg* (2011) **113**(4):941-6. Epub 2011/07/27. doi: 10.1213/ANE.0b013e31822827a2 ANE.0b013e31822827a2 [pii]. PubMed PMID: 21788310.
243. Gil S, Farnand AW, Altemeier WA, Gill SE, Kurdowska A, Krupa A, et al. Fas-deficient mice have impaired alveolar neutrophil recruitment and decreased expression of anti-KC autoantibody:KC complexes in a model of acute lung injury. *Respiratory Research* (2012) **13**(1):91-. doi: 10.1186/1465-9921-13-91. PubMed PMID: PMC3499442.
244. Manjavachi MN, Costa R, Quintao NL, Calixto JB. The role of keratinocyte-derived chemokine (KC) on hyperalgesia caused by peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology* (2014) **79**:17-27. Epub 2013/11/05. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.10.026 S0028-3908(13)00502-9 [pii]. PubMed PMID: 24184386.
245. Coelho FM, Pinho V, Amaral FA, Sachs D, Costa VV, Rodrigues DH, et al. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum* (2008) **58**(8):2329-37. Epub 2008/08/01. doi: 10.1002/art.23622. PubMed PMID: 18668539.

246. Panzer U, Schneider A, Wilken J, Thompson DA, Kent SB, Stahl RA. The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* (1999) **56**(6):2107-15. Epub 1999/12/14. doi: kid767 [pii] 10.1046/j.1523-1755.1999.00767.x. PubMed PMID: 10594786.
247. Boulet L-P. Physiopathology of airway hyperresponsiveness. *Curr Allergy Asthma Rep* (2003) **3**(2):166-71. doi: 10.1007/s11882-003-0030-9.
248. Leckie MJ, Brinke At, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *The Lancet* **356**(9248):2144-8. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03496-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03496-6).
249. Poynter ME, Cloots R, van Woerkom T, Butnor KJ, Vacek P, Taatjes DJ, et al. NF-kappa B activation in airways modulates allergic inflammation but not hyperresponsiveness. *J Immunol* (2004) **173**(11):7003-9. Epub 2004/11/24. doi: 173/11/7003 [pii]. PubMed PMID: 15557197; PubMed Central PMCID: PMC2830271.
250. Kasahara DI, Ninin FM, Wurmbrand AP, Liao JK, Shore SA. Abrogation of airway hyperresponsiveness but not inflammation by rho kinase insufficiency. *Clin Exp Allergy* (2015) **45**(2):457-70. Epub 2014/10/18. doi: 10.1111/cea.12438. PubMed PMID: 25323425.
251. Barnes PJ. Drugs for asthma. *British Journal of Pharmacology* (2006) **147**(Suppl 1):S297-S303. doi: 10.1038/sj.bjp.0706437. PubMed PMID: PMC1760737.
252. Brown RH, Robbins W, Staats P, Hirshman C. Prevention of Bronchoconstriction by an Orally Active Local Anesthetic. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1995) **151**(4):1239-43. doi: 10.1164/ajrccm/151.4.1239.
253. Tewa-Tagne P, Briançon S, Fessi H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: Formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* (2006) **325**(1-2):63-74. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.06.025>.
254. Islam N, Cleary MJ. Developing an efficient and reliable dry powder inhaler for pulmonary drug delivery--a review for multidisciplinary researchers. *Med Eng Phys* (2012) **34**(4):409-27. Epub 2012/01/27. doi: 10.1016/j.medengphy.2011.12.025 S1350-4533(12)00003-3 [pii]. PubMed PMID: 22277307.
255. Raula J, Kuivanen A, Lähde A, Jiang H, Antopolsky M, Kansikas J, et al. Synthesis of L-leucine nanoparticles via physical vapor deposition at varying saturation conditions. *Journal of Aerosol Science* (2007) **38**(12):1172-84. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaerosci.2007.08.009>.