

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**NANOCÁPSULAS CONTENDO RESVERATROL: REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO
PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS**

MARIA TALITA PACHECO DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARIA TALITA PACHECO DE OLIVEIRA

Nanocápsulas contendo resveratrol: redução da inflamação pulmonar aguda induzida por LPS

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

Orientador (es): Dra. Andressa Bernardi

Dr. Marco Aurélio Martins

Rio de Janeiro

2019

Pacheco de Oliveira, Maria Talita .

Nanocápsulas contendo resveratrol: redução da inflamação pulmonar aguda induzida por LPS / Maria Talita Pacheco de Oliveira. - Rio de Janeiro, 2019.

138 f.; il.

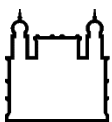
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Andressa Bernardi.

Co-orientador: Marco Aurélio Martins.

Bibliografia: f. iv-139

1. Nanotecnologia. 2. Resveratrol. 3. Síndrome do desconforto respiratório agudo. 4. Nanocápsulas poliméricas. 5. Inflamação. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARIA TALITA PACHECO DE OLIVEIRA

**NANOCÁPSULAS CONTENDO RESVERATROL:
REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS**

Orientador (es): Dra. Andressa Bernardi

Dr. Marco Aurélio Martins

Aprovada em: 06/02/2019

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Patricia Torres Bozza – Presidente

Profa. Dra. Ariane de Jesus Sousa Batista

Profa. Dra. Manuella Lanzetti Daher de Deus

Profa. Dra. Tatiana Maron Gutierrez

Prof. Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque

Rio de Janeiro, fevereiro de 2019

À minha família, meus pais, Margarete e Emmanoel, minha irmã, Maria Lívia e a minha sobrinha amada e paciente, Alice, pelo longo tempo em que estive ausente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço pela vida, pelas condições físicas, mentais e espirituais de realizar mais um sonho e por todo amor e proteção que recebi em forma de pessoas, de palavras, de fé e de esperança.

Aos meus orientadores, Andressa e Marco, por terem me aceitado como orientanda e confiado a mim a responsabilidade de conduzir um projeto de doutorado. Meu muito obrigada por todos os ensinamentos, pela troca de experiência, pelo investimento, pelas advertências, pela presença, pelas correções, pela paciência, pelos 4 anos de trabalho e muito aprendizado. Três gerações e culturas diferentes, três formas distintas de trabalhar e de pensar, porém um único objetivo alcançado com sucesso! Obrigada!

Minha gratidão imensa à comunidade do Laboratório de Inflamação, a todos que passaram por lá e aos que ainda estão. Agradeço por toda a ajuda nos experimentos, pelo incentivo, pela amizade, pelas conversas (científicas ou não), pela companhia nas refeições, pelo os ouvidos, pelos abraços, pelo apoio diário.... Não teria conseguido sem todos vocês. Amanda Cotias, Amanda Chaves, Nathália Magalhães, Letícia Lima, Natália Barreto, Dani Insuella, Fernanda Verdini, Aryella, Thamiris, Jullian, Diego, Yago, Hyago, Ana Paula e os que muitos outros que já não estão mais no laboratório, mas que participaram de alguma forma.

Aos pesquisadores, Vinicius, Magda, Patrícia, Tatiana Paula, Maximiliano, obrigada pelas dicas, pela ajuda na bancada, pelas conversas e cafés, pelos ensinamentos e pela amizade. À Carol Azevedo por toda ajuda e amizade. À Carol Arantes, Joyce, Camilla pela ajuda e colaboração de sempre. Ao Jorginho, por facilitar nosso dia-a-dia. Agradeço a Osirene, ou simplesmente, Dadá, pelo seu trabalho dedicado e extremamente competente como secretária e resolvedora de todos os problemas. Eterna gratidão à Ana Lúcia Pires, por muito mais que biossegurança e organização, mas pela amizade, pela confiança, pelas caronas, pelos desabafos e conselhos, pelas trocas de ideias, pelo espaço na sua vida e na sua família.

Aos demais estudantes, bolsistas, estagiários, técnicos e pesquisadores do Pavilhão Ozório de Almeida, minha segunda casa nos últimos anos, que compartilharam essa experiência ao meu lado. Ao pessoal que cuida do nosso ambiente, dos materiais, do prédio e da burocracia, principalmente, Tati, Cátia, Renato, Valéria, Fabrício, Taís, Alexandre, Andreia e Carla. Agradeço aos bioteristas, ao veterinário e a cada animal que deu a vida pela causa científica, em nome de um mundo com mais conhecimento e saúde.

Aos pesquisadores que se dedicaram nas disciplinas, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e ao Instituto Osvaldo Cruz (IOC), principalmente à querida Julimar, sempre muito disposta a ajudar, e a todos que estão por trás do funcionamento e da organização. Obrigada à Fiocruz e a todos que fazem dessa instituição um local gerador de conhecimento e de possibilidades de uma vida melhor.

Agradeço as indispensáveis agências de fomento, Capes, CNPq e FAPERJ, pela bolsa que possibilitou a realização deste doutorado e toda estrutura e recursos humanos e materiais, assim como aos programas de incentivo e investimento ao ensino superior e à pesquisa científica do Governo Federal sob administração do Partido dos Trabalhadores, sem os quais eu não teria conseguido realizar o doutoramento.

Ao laboratório de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos da UFRGS, pela colaboração indispensável na realização desse trabalho.

À banca, Dra. Patricia Torres Bozza, Dra. Ariane de Jesus Sousa Batista, Dra. Manuella Lanzetti Daher de Deus, Dra. Tatiana Maron Gutierrez e Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque pelas excelentes observações, sugestões e correções que só enriqueceram esse trabalho. Em especial agradeço a Tati M., por ter aceito ser revisora da tese.

Aos meus amigos que fiz aqui, Ana Paula, Ohanna, Rayanna, Everton, Thaís, Marina, Lelê, Camilla, que participaram e ainda participam desse sonho e da minha vida. Obrigada pela amizade e por tudo que vocês fazem e fizeram por mim! Aos meus amigos da vida, Renatta, Giselli, Jonázia, Pedro, Elis, Mônica, Ana Luíza, Aline Lima, Lais Luah, Jacqueline Alves, Layanne, Diógenes, Victor Luis por estarem comigo em todos os momentos, principalmente na distância, sempre com muito amor e carinho.

Ao meu namorado, Jeffte Costa, pelo companheirismo, pela paciência, pelo carinho, pelo apoio, por segurar a barra dos dias difíceis e por estar ao meu lado nessa caminhada, mostrando todos os dias que eu posso ser feliz e que vale a pena continuar.

Agradeço a todos que me ajudaram a chegar e a estar aqui... São muitas pessoas, muitas experiências... Amigos da Congregação Espírita Francisco de Paula, dos trabalhos voluntários, da academia, terapias alternativas e tradicionais. Serei eternamente grata por tudo que recebi e espero um dia poder ajudar outras pessoas a realizarem seus sonhos.

À minha família, meus pais Margarete e Emmanoel, minha irmã, Maria Lívia, meu cunhado, Júnior e minha sobrinha Alice, que apoiaram incondicionalmente cada passo para que

eu pudesse estar aqui. Nos dias mais difíceis, saber que eles estão lá torcendo por mim e me esperando voltar me fizeram levantar e continuar.

Da mesma forma, agradeço a minha Família Pacheco, meus avós, principalmente minha vovó Maria que rezou todos os dias pela minha segurança e minha felicidade, aos meus tios, tias, primos, primas e agregados que são a melhor parte de mim e que me esperaram voltar sempre com muita alegria e me desejaram sucesso a cada partida.

Por fim, inesperadamente, agradeço a mim mesma por ter saído da minha zona de conforto, ter me arriscado no desconhecido e, principalmente, por não ter desistido nos dias mais difíceis (que foram muitos). Por ter aprendido a administrar a saudade, a solidão, a cuidar de mim mesma, a ter buscado motivos para continuar e por ter me dado a chance de provar que eu era capaz de chegar até o fim. Eu aprendi onde estão minhas raízes e que para lá posso voltar sempre, mas mais do que isto aprendi que posso ter sementes de amizade e de amor em todos os lugares que eu passar. Assim, resumo os últimos anos abaixo:

“Aqui, tenho sotaque bonitinho,
Em casa, tô falando estranho,
Aqui, eu tenho saudades de lá,
Lá, eu penso na rotina daqui,
Eu falo que vou embora,
Pedem logo pra eu ficar,
Eu digo que já tô chegando,
Mandam eu me apressar.”

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

— Chico Xavier

**NANOCÁPSULAS CONTENDO RESVERATROL: REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS.****RESUMO****TESE DE DOUTORADO****Maria Talita Pacheco De Oliveira**

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é caracterizada pelo aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, inflamação e comprometimento das propriedades mecânicas do pulmão. Apesar de extensa pesquisa, a SDRA ainda não possui tratamento específico, apresentando alta taxa de mortalidade. O resveratrol é um fitocomposto reconhecido pelo seu efeito anti-inflamatório, entretanto sua aplicação terapêutica apresenta limitações devido à sua baixa solubilidade, instabilidade e intenso metabolismo. O nosso objetivo foi utilizar nanocápsulas poliméricas contendo resveratrol (resveratrol-NC) para otimizar os efeitos do resveratrol no tratamento da lesão pulmonar aguda. As nanocápsulas contendo resveratrol foram preparadas pela técnica de deposição interfacial, utilizando o polímero PCL e apresentaram 241 ± 7 nm; $0,16 \pm 0,03$; $-14,1 \pm 2,3$ mV; $5,2 \pm 0,3$ e 1 mg/mL para as medidas de diâmetro, IPD, potencial zeta, pH e teor, respectivamente. Camundongos A/J foram tratados pela via oral preventivamente ou posterior à indução da inflamação com LPS. Alterações na elastância pulmonar, resposta inflamatória, estresse oxidativo e mecanismos moleculares foram avaliados 24 h após instilação intranasal de LPS. Nanocápsulas brancas (NC-brancas), utilizadas como controle, não apresentaram nenhuma alteração significativa. O resveratrol-NC (5 mg/kg) inibiu o acúmulo de leucócitos para o espaço broncoalveolar quando administrado 1, 4, 6 e 12 h antes da instilação com LPS, enquanto o resveratrol livre não inibiu a resposta em nenhum dos tempos avaliados. O pré-tratamento com o resveratrol-NC (2,5, 5 ou 10 mg/kg) inibiu a hiper-reatividade das vias aéreas enquanto apenas a dose de 10 mg/kg da molécula livre reduziu esta resposta. Apenas o pré-tratamento com resveratrol-NC, mas não com resveratrol livre preveniu a migração leucocitária no lavado broncoalveolar (LBA), os danos estruturais, o aumento dos níveis das citocinas inflamatórias, de malondialdeído (MDA) e da superóxido dismutase, diminuindo a fosforilação das proteínas ERK e Akt no tecido pulmonar. Em sequência, avaliamos o tratamento realizado 6 h após o estabelecimento da inflamação, buscando aproximação com as condições clínicas. De forma surpreendente o pós-tratamento com resveratrol-NC (5 mg/kg), mas não com a molécula livre, inibiu os parâmetros de hiper-reatividade das vias aéreas, resposta leucocitária no LBA, danos estruturais, aumento dos níveis de MDA e da atividade da catalase, reduzindo a fosforilação das proteínas pró-inflamatórias ERK, Akt e p38 MAPK e aumentando expressão do fator de transcrição NRF2 no tecido pulmonar. Os dados demonstram que o resveratrol-NC apresenta ambos efeitos preventivos quanto terapêuticos na lesão pulmonar induzida por LPS. A fim de compreender o motivo pelo qual encontramos efeito anti-inflamatório apenas no tratamento com resveratrol-NC e não da sua forma livre, quantificamos o resveratrol no tecido pulmonar. Os dados de HPLC demonstraram maiores quantidades da molécula nos animais que receberam o resveratrol-NC. Os dados nos permitem concluir que a utilização do resveratrol em nanocápsulas poliméricas é uma estratégia eficaz para melhorar a atividade anti-inflamatória e aumentar a biodisponibilidade do resveratrol administrado, mesmo em baixas doses, pela via oral. Embora mais estudos sejam necessários, os dados obtidos no presente estudo demonstram que o resveratrol nanoencapsulado pode ser uma alternativa terapêutica para a lesão pulmonar aguda.

**RESVERATROL-LOADED NANOCAPSULES: REDUCTION OF ACUTE PULMONARY INFLAMMATION INDUCED BY LPS.****ABSTRACT****TESE DE DOUTORADO****Maria Talita Pacheco De Oliveira**

The Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is characterized by increased permeability of the alveolar-capillary barrier, inflammation and lung impairment of mechanical properties. Despite extensive research, ARDS still does not have specific treatment, presenting a high mortality rate. Resveratrol is a phytochemical known for its anti-inflammatory effect; however its therapeutic application has limitations due to its low solubility, instability and intense metabolism. Our aim was to use polymeric nanocapsules containing resveratrol (resveratrol-NC) to optimize the effects of resveratrol in the treatment of acute lung injury. The nanocapsules containing resveratrol were prepared by the interfacial deposition technique using the PCL polymer and presented 241 ± 7 nm; 0.16 ± 0.03 ; -14.1 ± 2.3 mV; 5.2 ± 0.3 and 1 mg / mL of diameter, IPD, zeta potential, pH and content, respectively. A/J mice were treated orally preventively or after the induction of inflammation with LPS. Changes in pulmonary elastance, inflammatory response, oxidative stress and molecular mechanisms were evaluated 24 h after intranasal instillation of LPS. Unloaded nanocapsules (NC-brancas) were used as controls and did not present any significant effects. Resveratrol-NC (5 mg/kg) inhibited leukocyte accumulation into the bronchoalveolar space when administered at 1, 4, 6 and 12 h prior to instillation with LPS, while free resveratrol did not inhibit the response at any of the times assessed. Pretreatment with resveratrol-NC (2.5, 5 or 10 mg / kg) inhibited airway hyperreactivity, while only 10 mg/kg dose of the free molecule reduced this response. Only pre-treatment with resveratrol-NC, but not with the free resveratrol, prevented leukocyte migration in bronchoalveolar lavage (BAL), structural damage, increased levels of inflammatory cytokines, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase, decreasing the phosphorylation of ERK and Akt proteins in lung tissue. In sequence, we evaluated the treatment performed 6 h after the establishment of the inflammation, seeking approximation with the clinical conditions. Surprisingly, post-treatment with resveratrol-NC (5mg / kg), but not with the free molecule inhibited hyperreactivity of airways, leukocyte response in BAL, structural damage, increased MDA levels and catalase activity, reducing the phosphorylation of ERK, Akt and p38 MAPK proinflammatory proteins and increasing expression of NRF2 transcription factor in lung tissue. The data demonstrate that resveratrol-NC exhibits both therapeutic and preventive effects on LPS-induced lung injury. In order to understand why we only found anti-inflammatory effect with resveratrol-NC and not with its free form, we quantified resveratrol in lung tissue. HPLC data demonstrated higher amounts of the molecule in animals receiving resveratrol-NC. The data allow us to conclude that the use of resveratrol in polymeric nanocapsules is an effective strategy to improve anti-inflammatory activity and increase the bioavailability of resveratrol administered, even at low doses, by the oral route. Although more studies are needed, data obtained in the present study demonstrate that nanoencapsulated resveratrol may be a therapeutic alternative for acute lung injury.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- °C - Graus Celsius
- AECC - *American-European Consensus Conference*
- AHR - *Airway hyperresponsiveness* (Hiper-reatividade das vias aéreas)
- AIDS - *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
- Akt - *Serine/threonine-specific protein kinase* (proteína cinase específica de serina / treonina)
- AMPK- *AMP-activated protein kinase* (Proteína cinase ativada por AMP)
- ANOVA - *Analysis of variance* (Análise de variância)
- API - *Activator protein 1* (Proteína ativadora 1)
- ASC - *Apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain*
- ATS - *American Thoracic Society*
- BCA - *Bincinonic acid* (Ácido bicincônico)
- BSA - *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)
- CCL-2 - *C-C motif chemokine ligand 2* (Ligante de quimiocina (motivo C-C) 2)
- CCR1 - *C-C chemokine receptor type 1* (Receptor de quimiocina C-C tipo 1)
- CD14 - *Cluster of differentiation 14* (Cluster de diferenciação 14)
- CEUA - Comissão de ética de animais
- cm/H₂O - Centímetro de água
- CO₂ - Dióxido de carbono
- Cu₊₁ - Íon cobre (I)
- Cu⁺¹ íon cobre (I) ()
- CXCL-1 - *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (Ligante de quimiocina (motivo C-X-C) 1)
- CXCL-2 - *Chemokine (C-X-C motif) ligand 2* (Ligante de quimiocina (motivo C-X-C) 2)
- CXCL8 - *Chemokine (C-X-C motif) ligand 8* (Ligante de quimiocina (motivo C-X-C) 8)
- DAMP - *Damage-associated molecular pattern* (Padrão molecular associado a dano)
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- ECL - *Enhanced chemiluminescence*
- EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid* (Etileno Diamino Tricloro Acético)
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)
- EPM - Erro padrão da média
- EPRM - Efeito de Permeabilidade e Retenção Melhorada
- ERK - *extracellular signal regulated kinase* (Cinases reguladas por sinais extracelulares)
- ERN - Espécies reativas de nitrogênio
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- ESICM - *European society of intensive care medicine* (Sociedade europeia de medicina intensiva)
- FDA - *Food and Drug Administration* (administração de alimentos e medicamentos)
- FiO₂ - Fração de oxigênio inspirado
- Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

g - unidade da força centrífuga relativa (*Relative Centrifugal Force*- RCF)
g - Grama
GLP-1 - *Glucagon-like peptide-1* (Peptídeo humano semelhante ao glucagon 1)
H&E - Hematoxilina-Eosina
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ - Ácido sulfúrico
HOCl - ácido hipocloroso
HPLC - *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HTAB - Brometo de cetil dimetil etil amônio
i.m. - Intramuscular
i.p. - Intrapertoneal
ICAM-1- *Intercellular Adhesion Molecule 1* (Molécula de adesão intercelular-1)
IKKs - *Inhibitory kappa B Kinases*
IL-10 - Interleucina 10
IL-1 β - Interleucina 1-beta
IL-6 - Interleucina 6
IL-8 - Interleucina 8
iNOS - *Inducible nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintase induzível)
IRF3 - *Interferon regulatory transcription factor 3* (Fator regulatório de interferon-3)
IRF4 - *Interferon regulatory transcription factor 4* (Fator regulador do interferon-4)
JAK - *Janus kinase* (Janus cinase)
JNK - *c-Jun NH2-terminal kinase* (c-Jun NH₂-terminal cinase)
KC - *Keratinocyte-derived chemokine* (Quimiocina derivada de queratinócitos)
KCl - Cloreto de potássio
Kg - quilograma
Kg/cm² - quilograma-força por centímetro quadrado
KPE - Fosfato de potássio EDTA
KPO₄ - Fosfato de potássio
LBA - Lavado broncoalveolar
LBP - *Lipopolysaccharide Binding protein* (Proteína de ligação ao lipopolissacarídeo)
LPS - Lipopolissacarídeo
LTB₄ - Leucotrieno B₄
M - Concentração em molar
MAPK - *Mitogen-activated protein kinase* (Proteína cinase ativada por mitógenos)
MCP-1 - *Monocyte Chemoattractant protein-1* (Proteína quimiotática de monócito-1)
MD-2 - *Myeloid differentiation protein 2* (Proteína mielóide diferenciadora 2)
MDA - Malondialdeído
mg - Miligrama
MIP-1 α - *Macrophage inflammatory protein* (Proteína Inflamatória de Macrófagos 1-alfa)
MIP-2 - *Macrophage inflammatory protein 2* (Proteína Inflamatória de Macrófagos-2)
mL - Mililitro
mm - Milímetro

mM - Milimolar
mmHg - Milímetros de mercúrio
MMP - metaloproteinase da matriz
MPO - Mieloperoxidase
mRNA - RNA mensageiro
mTOR- *Mammalian target of rapamycin* (Alvo mamífero da rapamicina)
mV - Milivolt
MyD88 - *Myeloid differentiation primary response 88* (Resposta primária de diferenciação de mielóides 88)
N - Normal
NaCl - Cloreto de sódio
NC - Nanocápsulas
NET - *Neutrophil extracellular traps* (Armadilha extracelular de neutrófilos)
NF- κ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Fator Nuclear kappa de aumento de cadeia leve de linfócitos B ativados)
ng - Nanograma
NLRP3 - *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*
nm - Nanometro
nM - Nanomolar
NO - Óxido nítrico
NRF2 - *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Fator nuclear derivado de eritróide 2 - tipo 2)
 O_2^- - radical aniônico superóxido
OH $^-$ - radical hidroxila
ONOO $^-$ - peroxinitrato
p38 MAPK - *Mitogen-activated protein kinases 38* (Proteína cinases ativadas por mitógeno)
PAMP - *Pathogen-associated molecular pattern* (Padrão molecular associado a patógeno)
PaO $_2$ - Pressão parcial de oxigênio arterial
PBS - *Phosphate buffered saline* (Salina Tampão Fosfato)
PCL - Poli(ϵ -caprolactona)
PDGF - *Platelet-derived growth factor* (Fator de crescimento derivado de plaquetas)
PEEP - *Positive end-expiratory pressure* (Pressão positiva expiratória final)
PEG - Poli(etilenoglicol)
pg - Picograma
PGA - Poli(ácido glicólico)
PGE $_2$ - Prostaglandina E $_2$
pH - Potencial hidrogeniônico
PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase* (Fosfoinosítideo 3-cinase)
PKB - *Protein kinase B* (Proteína cinase B)
PLA - Poli(ácido láctico)
PLGA - Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PRR - *Pattern recognition receptors* (Receptor de reconhecimento de padrão)

RANTES - *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted* (Regulada por ativação, expressa e secretada por célula T normal)

rpm – Rotações por minuto

SCCM - Society of Critical Care Medicine

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SDS-PAGE - Dodecil-sulfato de sódio de gel de poliacrilamida

SFB - *Fetal Bovine Serum* (Soro Fetal Bovino)

SNAF - Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos

SOD - Superóxido dismutase

STAT - *Signal transducer and activator of transcription* (Transdutor de sinal e ativador de transcrição)

TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances* (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

TGF β - *Transforming growth factor beta* (Fator de crescimento transformador beta)

TIRAP - *Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein* (Proteína adaptadora que contém o domínio TIR)

TLR-4 - *Toll-like receptor 4* (Receptor do tipo Toll-4)

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor-alpha* (Fator de Necrose Tumoral alfa)

TRAM - *Translocating chain-associating membrane* (Proteína de membrana associada à cadeia de translocação)

TRIF - *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (Domínio TIR contendo adaptador do Indutor de Interferon)

U - Unidade enzimática

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UTI - Unidade de terapia intensiva

UV - Radiação ultravioleta

v/v - volume/volume

VCAM-1 -*Vascular cell adhesion protein 1* (Proteína 1 de adesão celular vascular)

μ g - Micrograma

μ L - Microlitro

μ m - micrômetro

μ M - Micromolar

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. Fisiopatologia da SDRA..... | 24 |
| Figura 1.2. Resposta imune do LPS através da sinalização TLR4-MD2..... | 30 |
| Figura 1.3 Formas isoméricas do resveratrol, <i>cis</i> e <i>trans</i> | 34 |
| Figura 1.4. Esquema dos efeitos do resveratrol em vias inflamatórias..... | 35 |
| Figura 1.5 Destino in vivo do resveratrol após administração oral..... | 42 |
| Figura 1.6. Tamanhos relativos de nanopartículas em comparação com estruturas conhecidas.... | 44 |
| Figura 1.7. Exemplos de nanocarreadores..... | 48 |
| Figura 5.1. Representação gráfica de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico carregadas com <i>trans</i> -resveratrol..... | 55 |
| Figura 5.2. Representação do protocolo de pré-tratamento..... | 58 |
| Figura 5.3. Representação do protocolo de pós-tratamento..... | 58 |
| Figura 6.1. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC na migração leucocitária para os pulmões em diferentes tempos..... | 67 |
| Figura 6.2. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC na hiper-responsividade das vias aéreas..... | 68 |
| Figura 6.3. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC na migração de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar e tecido pulmonar e atividade da MPO..... | 70 |
| Figura 6.4. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC no dano histológico pulmonar..... | 72 |
| Figura 6.5. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC nos níveis de citocinas no tecido pulmonar..... | 75 |
| Figura 6.6. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC no estresse oxidativo..... | 76 |
| Figura 6.7. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC na sinalização molecular..... | 78 |
| Figura 6.8. Efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC na hiper-reatividade pulmonar, migração leucocitária e atividade de MPO..... | 80 |
| Figura 6.9. Efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC no dano tecidual..... | 82 |
| Figura 6.10. Efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC nos níveis de citocinas teciduais..... | 84 |

| | |
|---|-----|
| Figura 6.11. Efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC no estresse oxidativo..... | 85 |
| Figura 6.12. Efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC sinalização molecular..... | 87 |
| Figura 6.13. Quantificação do resveratrol no tecido pulmonar..... | 88 |
| Figura 8.1. Representação gráfica da comparação entre o tratamento da lesão pulmonar aguda induzida por LPS..... | 104 |
| Figura 8.2. Resumo dos efeitos benéficos do resveratrol-NC na inflamação pulmonar aguda.... | 106 |
| Tabela 5.1. Critérios para análise semiquantitativa por escore..... | 61 |
| Tabela 6.1. Valores da caracterização físico-química das formulações (resveratrol-NC e NC-brancas)..... | 66 |
| Tabela 8.1. Resumo dos dados obtidos no pré- e pós-tratamento com ambos resveratrol livre ou nanoencapsulado..... | 105 |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 20 |
| 1.1. Síndrome do desconforto respiratório agudo | 20 |
| 1.1.1. Histórico e definição..... | 20 |
| 1.1.2. Etiologia | 21 |
| 1.1.3. Epidemiologia e incidência | 21 |
| 1.1.4. Fisiopatologia | 23 |
| 1.1.5. Modelos Experimentais | 28 |
| 1.1.5.1. Mecanismos moleculares desencadeados pelo LPS | 30 |
| 1.1.6. Tratamento..... | 31 |
| 1.1.6.1. Novas perspectivas de tratamento | 32 |
| 1. 2. Resveratrol..... | 33 |
| 1.2.1. Histórico e características físico-químicas | 33 |
| 1.2.2. Mecanismos moleculares..... | 35 |
| 1.2.3. Efeitos biológicos | 37 |
| 1.2.4. Tolerância e efeitos adversos..... | 38 |
| 1.2.5. Doenças pulmonares..... | 39 |
| 1.2.6. Biodisponibilidade e metabolismo | 41 |
| 1.3. Nanotecnologia..... | 43 |
| 1.3.1. Aspectos gerais da nanotecnologia e nanomedicina | 43 |
| 1.3.2. Sistemas nanocarreadores de fármacos | 45 |
| 1.3.2.1. Tipos de nanocarreadores: nanocápsulas poliméricas | 47 |
| 1.3.3. Nanotecnologia aplicada a doenças pulmonares | 49 |
| 1.3.4. Nanotecnologia e resveratrol | 51 |
| 2. Justificativa..... | 53 |
| 3. Hipótese | 53 |
| 4. Objetivos..... | 54 |
| 4.1 Objetivos gerais | 54 |
| 4.2. Objetivos específicos/metas: | 54 |
| 5. Materiais e métodos..... | 55 |

| | |
|--|----|
| 5.1. Preparo das nanocápsulas contendo resveratrol | 55 |
| 5.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo resveratrol | 56 |
| 5.3. Animais..... | 56 |
| 5.4. Procedimento de indução da inflamação pulmonar aguda | 57 |
| 5.5. Intervenção terapêutica..... | 57 |
| 5.6. Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas | 58 |
| 5.7. Avaliação de migração de leucócitos para o pulmão: lavado broncoalveolar e perfusão pulmonar..... | 59 |
| 5.8. Quantificação de proteínas no tecido pulmonar | 60 |
| 5.9. Avaliação da atividade da mieloperoxidase | 60 |
| 5.10. Análise histopatológica semiquantitativa da inflamação no tecido pulmonar | 61 |
| 5.11. Quantificação de citocinas no tecido pulmonar..... | 61 |
| 5.12. Análises de estresse oxidativo | 62 |
| 5.12.1. Medição dos níveis de malondialdeído | 62 |
| 5.12.2. Quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase | 63 |
| 5.12.3. Quantificação da atividade da enzima Catalase | 63 |
| 5.13. Western blotting | 63 |
| 5.14. Quantificação de resveratrol no tecido pulmonar..... | 64 |
| 5.14. Análise estatística | 65 |
| 6. Resultados..... | 66 |
| 6.1. Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas | 66 |
| 6.2. Protocolo de pré-tratamento | 67 |
| 6.2.1. Análise da migração leucocitária em diferentes tempos | 67 |
| 6.2.2. Avaliação da hiper-reatividade das vias aéreas | 68 |
| 6.2.3. Quantificação do influxo leucocitário para o pulmão | 69 |
| 6.2.4. Análise histopatológica | 70 |
| 6.2.5. Avaliação dos níveis de citocinas no tecido pulmonar..... | 74 |
| 6.2.6. Análise do estresse oxidativo | 76 |
| 6.2.7. Avaliação dos mecanismos de sinalização | 77 |
| 6.3. Protocolo de pós-tratamento..... | 79 |
| 6.3.1. Avaliação da hiper-reatividade pulmonar e infiltração leucocitária..... | 79 |
| 6.3.2. Análise histopatológica | 81 |

| | |
|--|-----|
| 6.3.3. Avaliação dos níveis de citocinas no tecido pulmonar..... | 83 |
| 6.3.4. Análise do estresse oxidativo | 85 |
| 6.3.5. Avaliação dos mecanismos de sinalização | 86 |
| 6.3.6. Quantificação do resveratrol no tecido pulmonar..... | 88 |
| 7. Discussão | 89 |
| 8. Conclusões..... | 104 |
| 9. Perspectivas | 107 |
| 10. Referências bibliográficas | 108 |

1. Introdução

1.1. Síndrome do desconforto respiratório agudo

1.1.1. Histórico e definição

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) foi descrita pela primeira vez em 1967, por Ashbaugh (1), como uma forma de insuficiência respiratória que se assemelhava à síndrome do desconforto respiratório em lactentes. Em 1994, a American-European Consensus Conference (AECC) definiu a SDRA como o início agudo de hipoxemia com infiltrados bilaterais em radiografia frontal de tórax, sem evidência clínica de hipertensão atrial esquerda (2), sendo a primeira definição, em consenso, aceita entre especialistas. Segundo os critérios da AECC, o grau de hipoxemia para o diagnóstico da SDRA era obtido quando a razão da pressão parcial de oxigênio arterial normalizada pela fração de oxigênio inspirado ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) era igual ou menor que 200 mmHg. Entretanto, dificuldades para padronização de critérios explícitos foram considerados limitantes no diagnóstico da síndrome, por exemplo, o tempo de início relativo à lesão ou doença que causa a SDRA, o uso da razão $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e confiabilidade para avaliação da radiografia de tórax (3-5).

Apenas em 2011, a European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) reuniu uma comissão internacional com especialistas para revisar a definição da SDRA (6). A definição de Berlim, como ficou conhecida, foi endossada pela American Thoracic Society (ATS) e pela Society of Critical Care Medicine (SCCM) e está atualmente em vigor (3, 7). Com essa revisão foi possível contornar várias das limitações da definição apresentada pela AECC, não obstante, características clínicas necessárias para estabelecer o diagnóstico da SDRA, como a causa do edema pulmonar e a análise das radiografias de tórax ainda podem apresentar vieses na interpretação clínica, levando à falha no reconhecimento da SDRA e subtratamento da síndrome (8).

De acordo com a definição de Berlim, A SDRA é definida como uma forma aguda de lesão pulmonar difusa que ocorre em pacientes com fator de risco predisponente, atendendo aos seguintes critérios: (i) início dentro de uma semana de um insulto clínico conhecido e/ou novo ou a piora dos sintomas respiratórios; (ii) presença de opacidades bilaterais na radiografia de tórax, não totalmente explicada por derrame, por colapso pulmonar ou por nódulos; (iii) diagnóstico de insuficiência respiratória não totalmente explicado por insuficiência cardíaca e/ou sobrecarga de fluidos e (iv) presença de hipoxemia, definida por um limiar específico da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$

medida com um requerimento mínimo da PEEP (pressão expiratória final positiva) ≥ 5 cmH₂O, identificando assim três categorias de gravidade: leve ($200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mm Hg}$), moderada ($100 \text{ mm Hg} < \text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mm Hg}$) e grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mm Hg}$) (6, 7).

1.1.2. Etiologia

As causas da SDRA não são bem compreendidas e abrangem um amplo espectro de etiologias, as quais podem ser divididas em causas pulmonares ou diretas e causas extrapulmonares ou indiretas (9). A lesão direta ocorre quando a agressão atinge o pulmão através das vias aéreas ou por traumatismo no tórax, enquanto que a lesão indireta ocorre quando o agente causador da lesão atinge os pulmões pela corrente sanguínea (10).

As causas diretas incluem infecções virais, fúngicas ou bacterianas pulmonares, aspiração de conteúdo gástrico, trauma torácico com contusão pulmonar, hemorragia alveolar, aspiração de mecônio (crianças), quase-afogamento, cirurgia torácica, hiperóxia e inalação de fumaça ou outros produtos tóxicos. As causas indiretas incluem sepse, choque hipovolêmico, trauma não-torácico, transfusões múltiplas, reação a drogas, queimaduras, circulação extracorpórea, choque não-cardiogênico e pancreatite (3, 11).

Os fatores de risco para SDRA demonstram um padrão consistente de, primariamente, pacientes com pneumonia (35-50 %), seguidos por sepse não-pulmonar (30 %), aspiração (10 %) e trauma (10 %) (8). Além desses fatores de risco clínicos, a alta ocorrência da SDRA tem sido associada também a fatores de risco demográficos e ambientais como, idade avançada, raça não-branca e algumas variantes genéticas (9).

1.1.3. Epidemiologia e incidência

Apesar da robusta quantidade de pesquisa conduzida desde a sua descrição, a SDRA possui muitas questões epidemiológicas básicas sem solução, apresentando dados heterogêneos e estimativa de incidência subestimada (3, 11). Diferenças na disponibilidade de metodologias de diagnóstico, nos recursos da área da saúde, nas práticas de internação hospitalar e nas redes de medicamentos emergenciais impactam, claramente, no reconhecimento de doenças críticas como a SDRA (9).

Países cujos os sistemas médicos e de transporte de emergência são mais desenvolvidos poderão ter mais casos da SDRA relacionada a trauma e queimadura, porque os pacientes

sobrevivem por tempo suficiente para adquiri-la. Por outro lado, países que limitam o acesso à UTI para pacientes idosos ou oferecem mais opções de cuidados paliativos podem ter taxas menores de incidência da SDRA. Portanto, é difícil separar os fatores geográficos da variação nos serviços de saúde que podem levar a diferenças na epidemiologia da SDRA (12). Além disto, a falta de testes padrão-ouro ou de um biomarcador específico compromete o diagnóstico preciso, causando uma ampla variação na incidência da SDRA mundial (12).

Observa-se uma enorme diversidade intercontinental da incidência da SDRA, variando de 17,9, 34 e 78,9 a cada 100.000 pessoas/ano, na Europa (13), Austrália (14) e EUA (15), respectivamente. Além disso, são encontradas oscilações no mesmo continente, variando de 10,6, 17,9 e 25,5 a cada 100.000 pessoas/ano na Finlândia (16), Escandinávia (13) e Espanha (17), respectivamente. No Brasil, os estudos também refletem a característica heterogênea dos dados epidemiológicos, apresentando em comum uma alta mortalidade. Um estudo realizado na UTI do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, em 2006, com 524 pacientes, encontrou uma incidência de 8,6 % para os casos da SDRA (18). Outro estudo conduzido no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, com admissão de 1.732 pacientes, obteve 16 % de incidência no ano de 2011 (19). Em 2013, um estudo prospectivo multicêntrico de coorte coordenado pelo Instituto de Pesquisa e Educação do Hospital Sírio-Libanês e Instituto d'Or de Pesquisa e Educação, utilizando dados de 45 UTIs de 12 estados brasileiros, obteve uma incidência de 31 % em 773 pacientes (20). Diferente deste último estudo, uma pesquisa de 2014, com universo de 7.133 pacientes em 14 UTIs no estado do Espírito Santo, apresentaram uma incidência de apenas 1,8 % (21). Mais recente, em 2016, outro estudo epidemiológico avaliando os casos em UTIs do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com um total de 2.430 pacientes, revelou uma incidência de 15 % da SDRA nos pacientes avaliados (22).

Apesar destas limitações, tem havido um aumento na compreensão da fisiopatologia e de importantes fatores de risco, tanto para o desenvolvimento da SDRA quanto para as taxas de mortalidade (12). Em 2016, o LUNG-SAFE (Grande Estudo Observacional para Compreender o Impacto Global da Insuficiência Respiratória Aguda Grave) realizou um estudo transversal para fornecer dados epidemiológicos sobre a SDRA em UTIs de 50 países, incluindo Brasil, demonstrando que a SDRA é responsável por 10 % das internações, representando mais de 3 milhões de pacientes com SDRA anualmente, com uma mortalidade de aproximadamente 40 % (8).

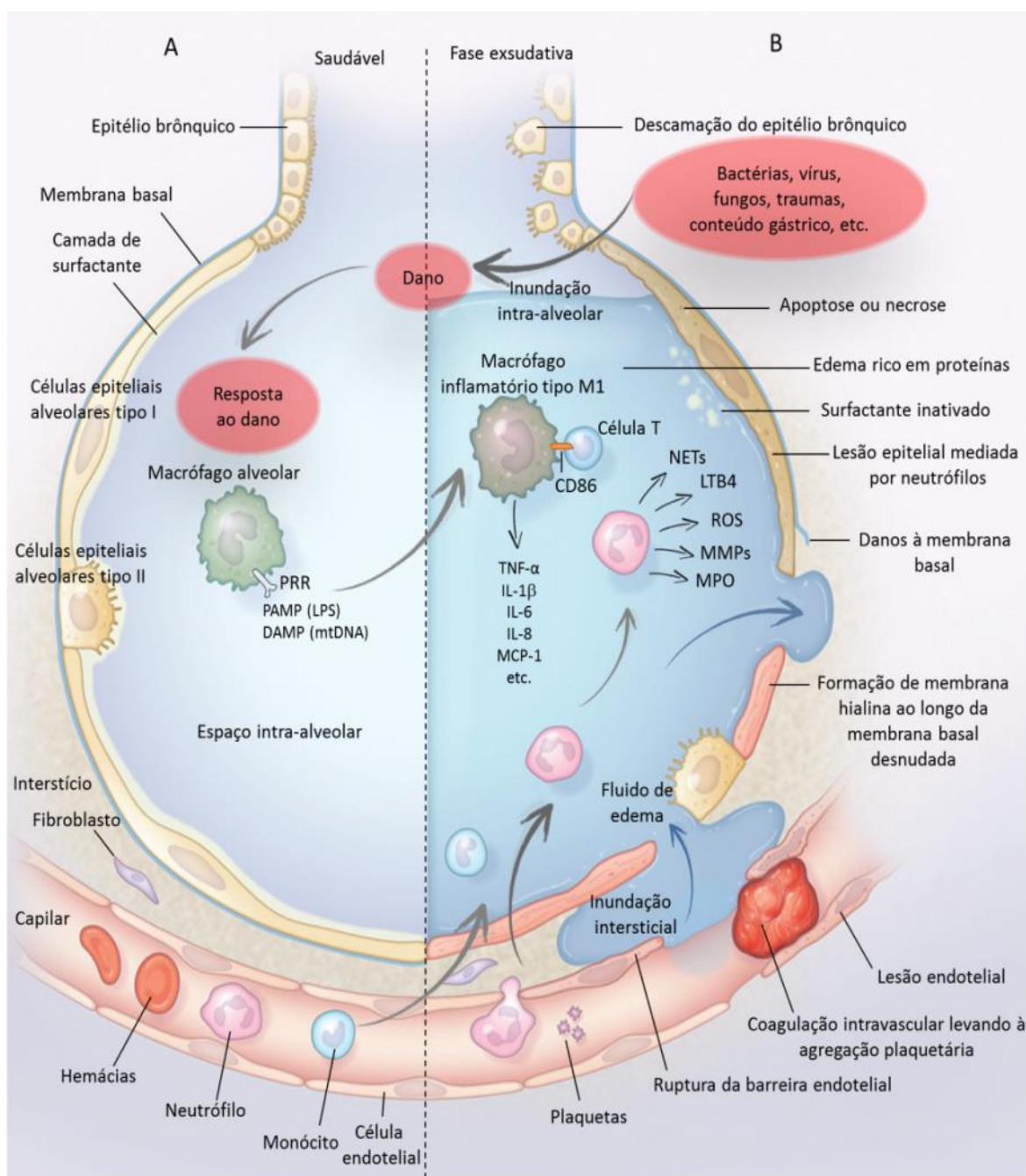
1.1.4. Fisiopatologia

O aumento da permeabilidade capilar e o acúmulo extravascular de fluido edemático rico em proteínas, resultante de uma resposta inflamatória, é o mecanismo fisiopatológico central da SDRA (23). Associado à inflamação, o edema proveniente do aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar compromete a combinação ventilação/perfusão, a troca gasosa e as propriedades mecânicas do pulmão, incluindo a diminuição da complacência pulmonar total, o aumento da resistência das vias aéreas e alterações nas curvas de pressão-volume (24). Clinicamente, essas alterações se manifestam como quadro de hipoxemia com opacidades bilaterais na radiografia de tórax, associada à diminuição da complacência pulmonar e ao aumento da mistura venosa e do espaço fisiológico necrosado, resultando em falência respiratória aguda, podendo, em estágios mais avançados, ocasionar a falência múltipla de órgãos (3, 25, 26).

A barreira alvéolo-capilar é formada por dois componentes, o endotélio microvascular e o epitélio alveolar (27). O endotélio microvascular é, normalmente, justaposto às células epiteliais alveolares, e ambos regulam as trocas gasosas através da membrana alvéolo-capilar (28). O epitélio alveolar, por sua vez, é formado por 90 % de células alveolares do tipo I, as quais são facilmente lesionadas e 10 % de células alveolares do tipo II que são mais resistentes à lesão (27). As células alveolares do tipo II são responsáveis pela produção de surfactante, transporte iônico, e proliferação/diferenciação das células do tipo I após a lesão. O dano às células epiteliais alveolares do tipo I leva a um aumento da entrada de líquido nos alvéolos e à diminuição da eliminação de fluidos; enquanto que o dano às células do tipo II diminui a produção de surfactante, levando à redução da complacência, colapso alveolar e liberação de citocinas (7, 29).

A SDRA pode ser didaticamente dividida em 3 estágios fisiopatológicos. O primeiro, logo após ao dano, é chamado de estágio exsudativo e é caracterizado por dano alveolar difuso devido ao extravasamento de fluido rico em proteínas e acúmulo de células inflamatórias nos espaços alveolares. O segundo estágio, chamado proliferativo, se desenvolve após, aproximadamente, 10 a 14 dias, sendo caracterizado pela resolução do edema pulmonar, proliferação de células alveolares do tipo II, metaplasia escamosa, infiltração intersticial por miofibroblastos e colocação precoce de colágeno. Alguns pacientes evoluem para o terceiro estágio da fibrose, caracterizada pela obliteração da arquitetura normal, fibrose difusa e formação de cisto (27, 30). A fase final, ou fibrótica, da SDRA não ocorre em todos os pacientes, mas tem sido associada à ventilação

mecânica prolongada e ao aumento da mortalidade (31). Um resumo do processo fisiopatológico da SDRA pode ser observado na Figura 1.1.



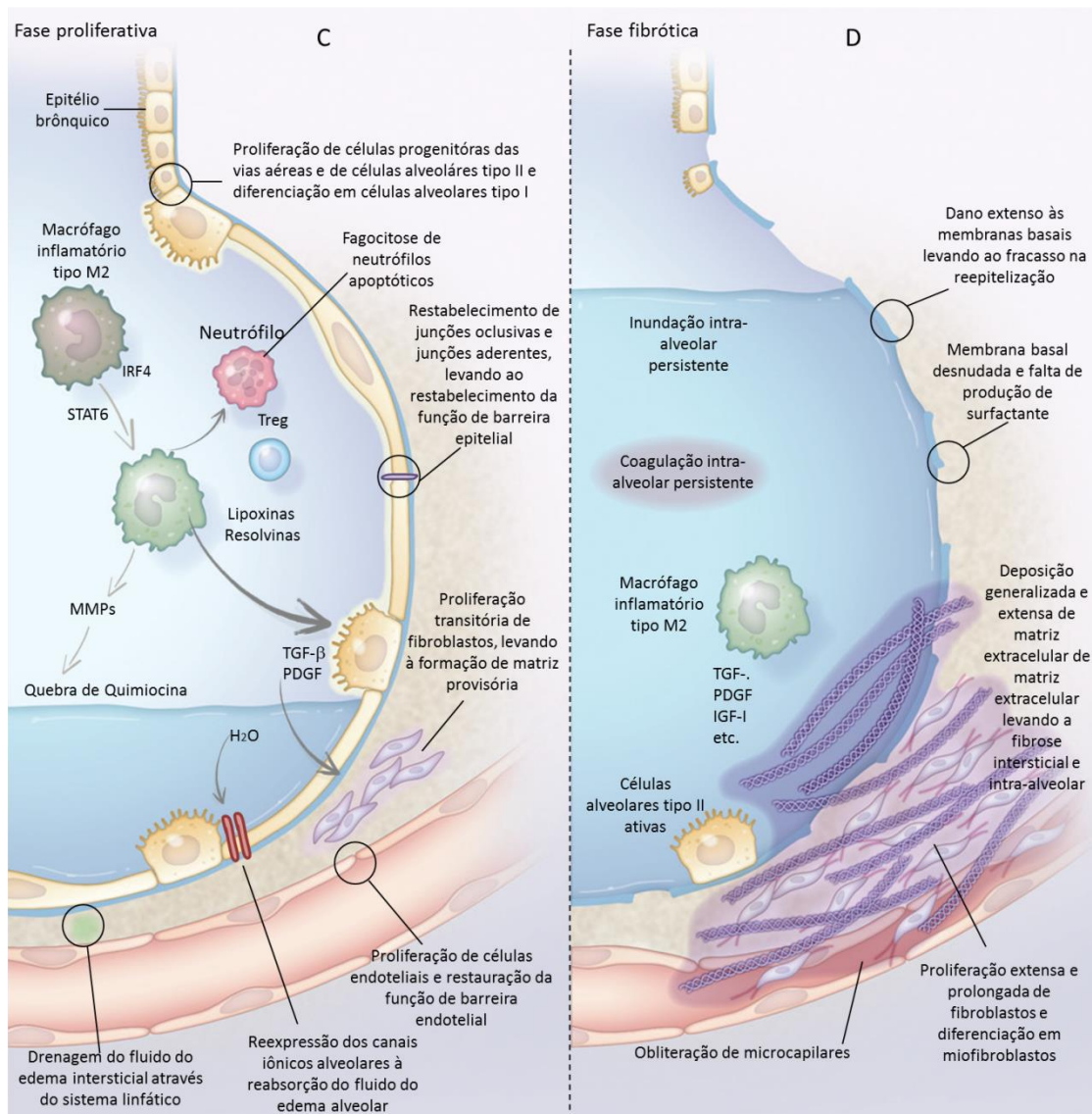


Figura 1.1. Fisiopatologia da SDRA. O pulmão saudável é mostrado no painel A. A lesão é iniciada por insultos diretos ou indiretos à estrutura alveolar do pulmão distal e à microvasculatura associada. Na fase exsudativa (Painel B), os macrófagos alveolares residentes são ativados, levando à liberação de potentes mediadores próinflamatórios e quimiocinas que promovem o acúmulo de neutrófilos e monócitos. Os neutrófilos ativados contribuem ainda mais para a lesão, liberando mediadores tóxicos. A lesão resultante leva à perda da função de barreira, bem como a inundações intersticiais e intra-alveolares. A expressão do fator tecidual mediada pelo fator de necrose tumoral- α (TNF- α) promove a agregação plaquetária e a formação de microtrombos, bem como a coagulação intra-alveolar e a formação de membrana hialina. A fase proliferativa (Painel C) visa restaurar a homeostase tecidual e é caracterizada pela expansão transitória dos fibroblastos residentes e a formação de uma matriz provisória, bem como proliferação de células progenitoras das vias aéreas e células epiteliais alveolares tipo II, com diferenciação em células epiteliais alveolares tipo I. Durante a fase fibrótica (Painel D), que está

fortemente associada à necessidade de ventilação mecânica, a extensa lesão da membrana basal e a reepitelização inadequada ou tardia levam ao desenvolvimento de fibrose intersticial e intra-alveolar. PRR, receptor de reconhecimento de padrão; PAMP, padrão molecular associado a patógeno; DAMP, Padrão molecular associado a dano, NET, armadilha extracelular de neutrófilos; LTB₄, leucotrieno B₄, MPO, mieloperoxidase; MMP, metaloproteinase da matriz; ROS, espécies reativas de oxigênio; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; TGFβ, fator de crescimento transformador β; células T reguladoras; IRF4, Fator regulador do interferon 4 e IGFI, fator de crescimento semelhante à insulina I. Traduzido e adaptado de B. Taylor Thompson e cols., 2017 (31).

Na fisiopatologia da SDRA há um marcante processo inflamatório com envolvimento de diversos tipos celulares. O papel dos macrófagos durante o desenvolvimento da resposta inflamatória, em geral, é próinflamatório no estágio inicial e exibe um efeito anti-inflamatório no estágio tardio (32). Estes efeitos podem ser atribuídos à transformação fenotípica. Os macrófagos alveolares residentes, localizados na interface ar-tecido, são predominantes nos espaços alveolares, com uma densidade aproximada de sete por alvéolo (32, 33). Após estímulo nocivo, os macrófagos alveolares residentes mudam imediatamente para o fenótipo M1 em resposta à infecção e ativação de receptores Toll-like (TLRs) ou outros receptores de reconhecimento (34, 35). Estas células atuam como a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos, tais como endotoxinas e vírus (33, 36), liberando vários mediadores proinflamatórios incluindo TNF-α e a IL-1β (37). Uma vez que os macrófagos alveolares são estimulados, eles recrutam e ativam macrófagos e neutrófilos circulantes para o local da lesão através da liberação de quimiocinas (33, 38, 39).

O influxo de neutrófilos para os pulmões em resposta a macrófagos alveolares ativados é comumente observado em pacientes com SDRA e em modelos experimentais da síndrome (40), estando associado à gravidade da SDRA (41). Várias quimiocinas, incluindo a IL-8 (CXCL8), parecem desempenhar um papel central na regulação do recrutamento de neutrófilos e, conseqüente, no dano tecidual, alterando a permeabilidade alvéolo-capilar em estudos humanos e animais (38, 42). Em condições patológicas, um grande número de neutrófilos ativados pode danificar o epitélio alveolar, provavelmente, pela liberação de moléculas intracelulares tóxicas que induzem a dissolução de junções estreitas, bem como apoptose e necrose de células epiteliais alveolares tipo I e tipo II. Esses mediadores tóxicos incluem proteases, como elastases e metaloproteinases de matriz, mieloperoxidase (MPO), peptídeos catiônicos, como defensinas e espécies reativas de oxigênio (43, 44). Além da liberação de citocinas, há a formação de

armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs- *neutrophil extracellular traps*), um mecanismo imunológico que permite aprisionar patógenos, mas que, em tempo prolongado e com excessiva produção, pode levar a danos teciduais (45). As moléculas citotóxicas também induzem necrose tecidual, apoptose e autofagia, causando a lesão tecidual característica da SDRA (40, 46).

Numerosas citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis importantes na inflamação aguda e no desenvolvimento da SDRA. Dentre essas, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 apresentam níveis elevados nos pulmões de pacientes com SDRA (47, 48), assim como os maiores níveis dessas citocinas foram encontrados em pacientes não-sobreviventes comparado com os sobreviventes (40, 49). A IL-1 β é produzida por células hematopoiéticas, como monócitos do sangue, macrófagos teciduais e células dendríticas em resposta a ativação do receptor TLR, componentes do sistema complemento ativados, outras citocinas (como TNF- α) e a própria IL-1 (50, 51). O TNF- α possui um papel importante como indicador principal, escolhido em quase todas as pesquisas clínicas ou básicas, sendo encontrado em maiores níveis em diferentes modelos de SDRA (52). A IL-6 é considerada um biomarcador confiável de gravidade da doença em pacientes críticos com alto risco para SDRA e foi encontrado aumentado no lavado broncoalveolar (LBA) e no plasma em modelo experimental (53, 54). Em contrapartida, a IL-10, uma citocina anti-inflamatória, pode ter um importante papel protetor na síndrome, melhorando a lesão tecidual pulmonar restringindo a produção de TNF- α e a atividade neutrofílica (52, 55).

As quimiocinas demonstram desempenhar um papel crítico na SDRA independente da etiologia (56). Estudos mostraram que em camundongos *knockout* para o receptor CCR1 da MIP-1 α / RANTES, o dano pulmonar induzido por pancreatite aguda grave foi menor (57). A CXCL-2 (MIP-2), também demonstrou um papel importante em modelos murinos de *Klebsiella pneumoniae* e peritonite séptica, pois a ausência de CXCL-2 foi prejudicial à depuração da infecção devido à diminuição da resposta neutrofílica (37, 58, 59). Nesse mesmo racional, as quimiocinas, IL-8 (CXCL-8), KC (CXCL-1, quimiocina de camundongo relacionada a IL-8), MCP-1 (CCL-2) e MIP-1 α são, igualmente, encontradas elevadas no lavado broncoalveolar de pacientes com SDRA (60-62).

Outro aspecto importante da SDRA é a lesão oxidativa no tecido pulmonar, responsável pelo aumento da permeabilidade endotelial, mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO), como o radical aniônico superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (OH⁻) e ácido hipocloroso (HOCl); espécies reativas de nitrogênio (ERN), derivados do óxido nítrico (NO) incluindo peroxinitrato (ONOO⁻), implicados na oxidação (nitração) de proteínas e lipídios

(63, 64). As EROs são geradas a partir de uma cascata de reações intracelulares como subproduto na mitocôndria, peroxissomos, citocromo P-450 e NADPH oxidase, este último um gerador EROs como função primária de seu sistema enzimático e não como subproduto. (65). As espécies reativas podem ser liberadas por leucócitos, epitélio, endotélio, fibroblastos, enzimas oxidantes e gases inalados durante a ventilação mecânica. As espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem levar à lesão do DNA, peroxidação lipídica com formação de moléculas vasoativas e próinflamatórias, oxidação de proteínas (63, 66) e alteração de fatores de transcrição, como o NF- κ B e a MAPK (67), levando à expressão aumentada de genes próinflamatórios (68). Para neutralizar os radicais livres e seus efeitos, as células expressam vários antioxidantes endógenos, como a enzima superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (63, 69).

Estas enzimas antioxidantes são indutíveis em uma variedade de situações, como, por exemplo, após exposição ao LPS (lipopolissacarídeo) (63). A SOD, que pode ser induzida no pulmão por hiperóxia ou pelo LPS, converte o O_2^- em H_2O_2 . Em seguida, a catalase converte H_2O_2 em H_2O , enquanto a glutathione peroxidase catalisa a conversão de H_2O_2 em H_2O na presença de glutathione reduzida, que é então convertida em sua forma oxidada, GSSG (70).

1.1.5. Modelos Experimentais

A complexidade da fisiopatologia da SDRA e a heterogeneidade das causas limitam o desenvolvimento de modelos experimentais que possam reproduzir todos os aspectos encontrados nos pacientes. Dessa forma, os modelos de estudos em animais utilizados em ensaios pré-clínicos apresentam dificuldades de extrapolação dos resultados para os seres humanos (71, 72). Entretanto, esses estudos são indispensáveis para a melhor elucidação da fisiopatologia da síndrome, assim como na descoberta de possíveis novas terapias (73).

Os modelos experimentais de SDRA, assim como na síndrome, podem ser iniciados por um conjunto diversificado de fatores. Na literatura, vários modelos animais utilizam ferramentas diversas para causar a inflamação pulmonar, por exemplo, ventilação mecânica, hiperóxia, indução por ácido oleico ou por lipopolissacarídeo (LPS) (74). O LPS é um dos mais difundidos, devido à facilidade de administração e reprodutibilidade dos protocolos experimentais e por apresentar respostas semelhantes as infecções bacterianas, além de serem protocolos rápidos e confiáveis para triagem e otimização de novas drogas (63, 74).

O LPS, um complexo glicolípido altamente tóxico, é o componente principal da parede celular de bactérias gram-negativas (75). Estruturalmente, o LPS é constituído por um componente polissacarídeo (cadeia O) e uma porção lipídica A. A cadeia O exibe heterogeneidade estrutural e é o principal responsável pela antigenicidade, enquanto que o lipídio A, estruturalmente mais conservado, dirige a ativação das células do sistema imune inato (76). Dessa forma, a porção lipídica A, sozinha, é suficiente para ativar a resposta imune inata. As respostas adaptativas (produção de anticorpos) são geradas desencadeadas pela cadeia O em um período mais tardio no decorrer de uma infecção (77).

O dano causado pelo LPS ao tecido pulmonar é caracterizado por uma fase aguda, que leva ao influxo de leucócitos polimorfonucleares (principalmente, neutrófilos), altos níveis de MPO e citocinas próinflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) e uma fase tardia caracterizada pelo restabelecimento dos níveis de citocinas e um aumento de macrófagos e linfócitos no LBA (78). O LPS causa dano pulmonar agudo em camundongos 24 h após a administração intranasal ou intratraqueal (79), com o influxo de neutrófilos e citocinas acontecendo a partir de 4-6 h após estímulo com LPS (80, 81).

Os modelos murinos de SDRA são extensamente utilizados como ferramenta para testar novas potenciais intervenções terapêuticas e investigar os mecanismos moleculares subjacentes à lesão pulmonar (82). Os camundongos apresentam vantagens que incluem a disponibilidade de modelos genéticos para testar mecanismos específicos, o curto ciclo reprodutivo, que permite a rápida expansão de populações de camundongos bem definidas, um grande número de reagentes disponíveis para camundongos e um custo mais baixo quando comparado com outras espécies (82). A resposta baseada em gênero é outro fator importante para a seleção de animais. Camundongos machos são mais propensos a desenvolver SDRA, enquanto camundongos fêmeas têm uma vantagem de sobrevivência em comparação com machos quando expostos a LPS (79). Diferenças genéticas levam a variações na resposta inflamatória entre cepas de camundongos distintas, por exemplo, na produção de mediadores inflamatórios e duração da inflamação (79). Um estudo comparando 8 cepas de camundongos demonstrou que os animais A/J são susceptíveis ao LPS (via intratraqueal) (83). O nosso grupo de pesquisa tem utilizado camundongos A/J (macho) com sucesso para avaliar a resposta inflamatória pulmonar induzida por LPS ou por alérgeno (84-86).

1.1.5.1. Mecanismos moleculares desencadeados pelo LPS

A sinalização do LPS é iniciada pelas ações sequenciais da proteína de fase aguda LBP (proteína de ligação ao LPS), da proteína de membrana CD14 (em forma de âncora fixada em GPI ou solúvel), da proteína acessória de ligação a lipídio, MD-2 e do receptor de transdução de sinal TLR-4 (77, 87), como ilustrado na Figura 1.2. O CD14 divide os agregados de LPS em moléculas monoméricas e as apresenta ao complexo TLR4/MD-2, levando à ativação de múltiplos componentes de sinalização como as moléculas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRAM e TRIF e, conseqüentemente, as vias de sinalização MAPK, NF- κ B e IRF3, levando a ativação gênica e produção de citocinas próinflamatórias (88-90).

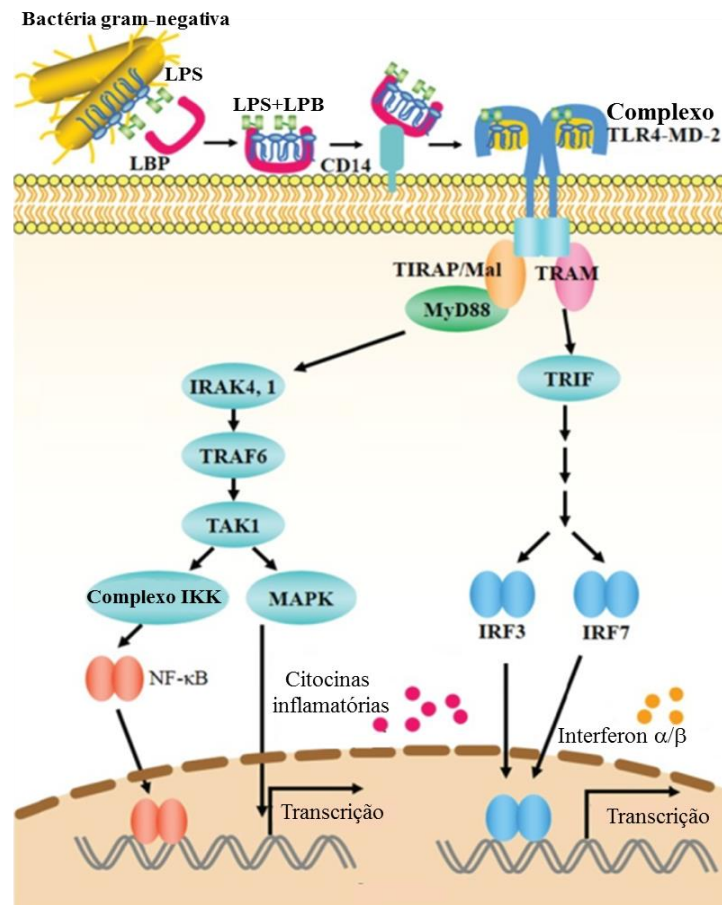


Figura 1.2. Resposta imune do hospedeiro ao LPS através da sinalização TLR4-MD2. O LPS na membrana externa de bactérias gram-negativas é reconhecido e extraído pela proteína LBP. O complexo LBP-LPS é então reconhecido e ligado pela proteína de membrana extrínseca de leucócitos CD14 através da qual o LPS é entregue ao complexo TLR4-MD-2. A ligação do LPS pelo heterodímero do complexo TLR4-MD-2 desencadeia a dimerização do domínio citoplasmático do TLR4 e o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas. Duas vias de

transdução de sinal são então ativadas no citoplasma: o MyD88/TIRAP e as vias TRAM/TRIF que conduzem à ativação de fatores de transcrição NF- κ B, e IRF3 e 7, respectivamente. A transcrição gênica ativada por NF- κ B leva à produção de citocinas próinflamatórias, quimiocinas, iNOS e sinais inflamatórios que levam à depuração de patógenos bacterianos. Traduzido e adaptado de Xiaoyuan Wang e cols., 2015.(91)

A família das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK) inclui a cinase extracelular regulada por sinal (ERK), a p38 e a c-Jun NH2-terminal cinase (JNK). Cada via de sinalização de MAPK é composta, pelo menos, por três componentes, uma MAPK cinase cinase (MAP3K), uma MAPK cinase (MAP2K) e uma MAPK. (87). Uma vez ativada, a via da MAPK leva a fosforilação e ativação dos fatores de transcrição presentes no citoplasma ou núcleo com consequente expressão de genes alvo e uma resposta biológica (92). As vias da MAPK podem ser ativadas por diversos estímulos extracelulares e intracelulares, incluindo fatores de crescimento de peptídeos, hormônios e vários estressores celulares, como o estresse oxidativo e citocinas, como TNF- α e IL-1 β . Essas vias de sinalização regulam uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte (93).

Consistente com os efeitos críticos na regulação das células, a via de sinalização da MAPK tem sido implicadas na patogênese de muitas doenças humanas (93), incluindo doença de Alzheimer e vários tipos de câncer (93). Nesse contexto, inúmeros trabalhos também têm demonstrado a participação dessa via em modelo de SDRA induzido por LPS. Utilizando diferentes ferramentas terapêuticas, os estudos sugerem que a modulação negativa da via da MAPK leva à melhora de diversos parâmetros inflamatórios da síndrome, tais como migração neutrofílica, alterações histopatológicas e produção de citocinas (94-97). Dessa forma, potenciais inibidores das vias da MAPK atraem bastante atenção devido à capacidade de reduzir a síntese de citocinas próinflamatórias e a sinalização intracelular desses mediadores (92).

1.1.6. Tratamento

As dificuldades em testar e validar terapias farmacológicas para a SDRA são devidos à múltipla etiologia e heterogeneidade do paciente acometido (11). Os pacientes com diagnóstico da SDRA apresentam fatores de risco subjacentes variados e diferentes condições pré-mórbidas e comórbidas complexas (3, 98, 99). Portanto, a fisiopatologia complexa e multifacetada da SDRA pode necessitar de intervenções baseadas em combinações de terapias em vez de um único

agente. Estudos sobre os mecanismos de ação e de interações são essenciais na triagem de terapias para testes clínicos finais (11).

A base atual para o tratamento da SDRA é a ventilação mecânica, evitando danos secundários. Os principais avanços recentes em terapias potenciais para SDRA se dividem em intervenções não-farmacológicas e farmacológicas. As intervenções não farmacológicas incluem a manutenção do paciente em posição prona, pressão expiratória final positiva, ventilação oscilatória de alta frequência, manobras de recrutamento pulmonar, remoção extracorpórea de dióxido de carbono e gerenciamento de fluidos. A intervenção farmacológica é realizada a partir uso de surfactante, antioxidantes, inibidor da esterase de neutrófilos, aspirina, bloqueadores neuromusculares como os β 2-adrenérgicos, estatinas, fator de crescimento de queratinócitos recombinante, corticosteroides e/ou vasodilatadores inalados (3, 7, 12, 30, 100).

Apesar de décadas de pesquisa e de uma melhor compreensão sobre a fisiopatologia, a SDRA continua a representar um grande problema para clínicos e pesquisadores: diagnóstico desafiador com o subconhecimento global da síndrome, intervenções farmacológicas ineficazes e muitos resultados decepcionantes, apresentando uma alta mortalidade (cerca de 40 %) (8, 12). Além disso, os sobreviventes podem apresentar distúrbios físicos e neuropsiquiátricos substanciais e persistentes comprometendo, significativamente, a qualidade de vida até 5 anos após o paciente ter se recuperado da SDRA (3, 101). Dessa forma, novas estratégias terapêuticas eficazes que possam modular a inflamação e levar a melhora dos pacientes com SDRA são uma necessidade premente.

1.1.6.1. Novas perspectivas de tratamento

O uso de plantas medicinais como forma de curar os processos inflamatórios é de origem antiga e fundamentada no uso popular por sucessivas gerações (102). Historicamente, a maioria dos novos medicamentos tem sido gerada a partir de compostos derivados de produtos naturais principalmente dos metabólitos secundários (103), os quais têm mostrado atividades biológicas potentes e vêm fornecendo compostos líderes na descoberta de medicamentos para o tratamento de câncer, infecções microbianas, inflamação, hipercolesterolemia e rejeição de tecidos em transplantes de órgãos (104).

Entre os muitos fitoquímicos, foi relatado que os fitoestrogênios contêm várias moléculas bioativas, encontradas principalmente na soja, vegetais e frutas. Esses compostos podem ser classificados em quatro grupos principais, como isoflavonóides, flavonóides, estilbenos e

lignananas. Destes, os estilbenos, em particular a forma *trans* do resveratrol e o seu glicosídeo, são amplamente relatados como benéficos para a saúde humana, tendo demonstrado possuir atividade antioxidante, anticarcinogênica e antitumoral (105, 106).

1. 2. Resveratrol

1.2.1. Histórico e características físico-químicas

O resveratrol é um polifenol estilbenoide não-flavanoide de origem natural encontrado em uma variedade de plantas espermatófitas, nas quais possui o papel de fitoalexina, sintetizado em resposta a lesões mecânicas, radiação UV e ataques fúngicos (106, 107). Nos tecidos vegetais, sua produção pode ser constitutiva ou indutível sendo controlada pela enzima estilbeno-sintase a qual catalisa a condensação de três moléculas de coumaroil-CoA para formar uma de resveratrol, em uma única etapa enzimática (108). O processo pelo qual a planta é estimulada para produzir metabólitos secundários é chamado de “elicitação” e indica que um estímulo estressante externo foi aplicado à planta (109). A molécula foi isolada pela primeira vez a partir das raízes do heléboro branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), em 1940 (110), e depois nas raízes *Polygonum cuspidatum*, em 1963, uma planta usada na Medicina Tradicional Chinesa e Japonesa como agente anti-inflamatório e antiplaquetário (106).

O resveratrol é um pó esbranquiçado com fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, peso molecular de 228,25 g/mol e um ponto de fusão entre 253-255°C (111). Para fins industriais, o resveratrol é geralmente obtido por síntese química a partir da via da fenilalanina através de múltiplas reações enzimáticas ou por biotecnologia a partir de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (112, 113). A estrutura química do resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno) é identificada em duas formas isoméricas, *cis* e *trans*-resveratrol, possuindo dois anéis fenólicos ligados um ao outro por uma ponte de etileno (Figura 1.3). A forma *trans* é dominante em termos de sua prevalência, mais estável, e apresenta atividade biológica. A isomerização do *trans*-resveratrol para *cis*-resveratrol pode ocorrer após exposição à luz ou a valores elevados de pH (106, 114).

O resveratrol é classificado como composto da Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica por possuir baixa solubilidade em água (3 mg/100 mL) e elevada permeabilidade, propriedades que facilitam sua passagem através de membranas biológicas e permite a interação com múltiplos alvos intracelulares (115, 116). Para aumentar a solubilidade

do resveratrol é recomendado o uso de etanol (50 mg/mL) ou solventes orgânicos como DMSO (16 mg/mL) (111, 117).

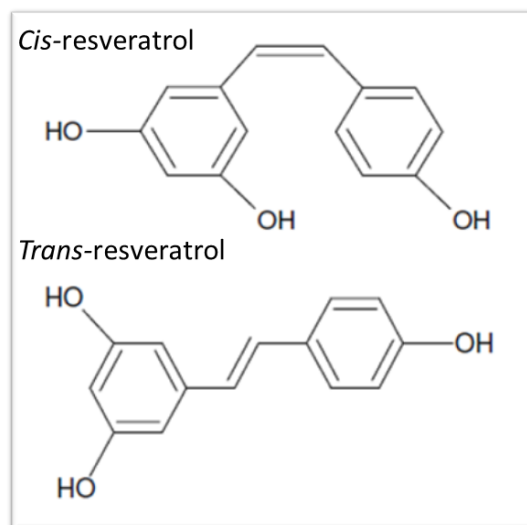


Figura 1.3. Formas isoméricas do resveratrol, *cis* e *trans*. Retirado de Robert E. King e cols., 2006 (118).

Presente em vários alimentos, o resveratrol é encontrado em maior concentração nas uvas vermelhas, especialmente na casca e nas sementes e conseqüentemente, no vinho tinto (106). A concentração de resveratrol pode variar de 0,1 a 14,3 mg/L no vinho tinto, enquanto os vinhos brancos contêm apenas 0,1 a 2,1 mg/L de resveratrol (119, 120). Os seres humanos têm sido expostos a polifenóis da dieta por milhões de anos e desenvolveram tolerância a esse grupo de compostos de defesa de plantas (111, 121).

Estudos epidemiológicos, na década de 90, demonstraram uma relação entre o consumo moderado de vinho tinto e a baixa incidência de doenças coronárias, apesar da dieta rica em gordura saturada, tabagismo e pouca de atividade física na população francesa. Tais estudos ficaram conhecidos como o “Paradoxo francês” (122, 123). Em seguida, o resveratrol, assim como outros polifenóis, foi sugerido como o princípio bioativo do vinho que poderia explicar o fenômeno (124). Estudos posteriores confirmaram a atividade cardioprotetora do resveratrol, em parte, devido à sua atividade na inibição da agregação plaquetária (125, 126). Desde então, a molécula tem recebido uma crescente atenção científica, levando à investigação de sua atividade biológica e a inúmeras publicações (120, 127). Utilizando o banco de dados Pubmed e as palavras

“resveratrol” e “effect” são encontrados um total de 3241 estudos publicados nos últimos 10 anos, demonstrando a importância científica da molécula.

1.2.2. Mecanismos moleculares

Primordialmente, o efeito biológico do resveratrol está relacionado com a defesa a ataques fitopatogênicos nas plantas (128), devido a diminuição da viabilidade celular e proliferação fúngica (129). Tal mecanismo molecular antifúngico ainda não está totalmente elucidado, mas os estudos sugerem um efeito no metabolismo energético, o qual é altamente conservado nas células eucarióticas (129). Nos estudos em células animais, inúmeras vias moleculares são descritas como alvos do resveratrol, dependendo do modelo ou doença estudada. Um resumo das vias moléculares pelas quais o resveratrol exerce seu efeito anti-inflamatório está representada na figura 1.4. O efeito biológico do resveratrol inclui respostas como a apoptose, senescência, autofagia, metabolismo e proliferação celular e uma ampla variedade de efeito no processo inflamatório e nas vias de sinalização celular (130).

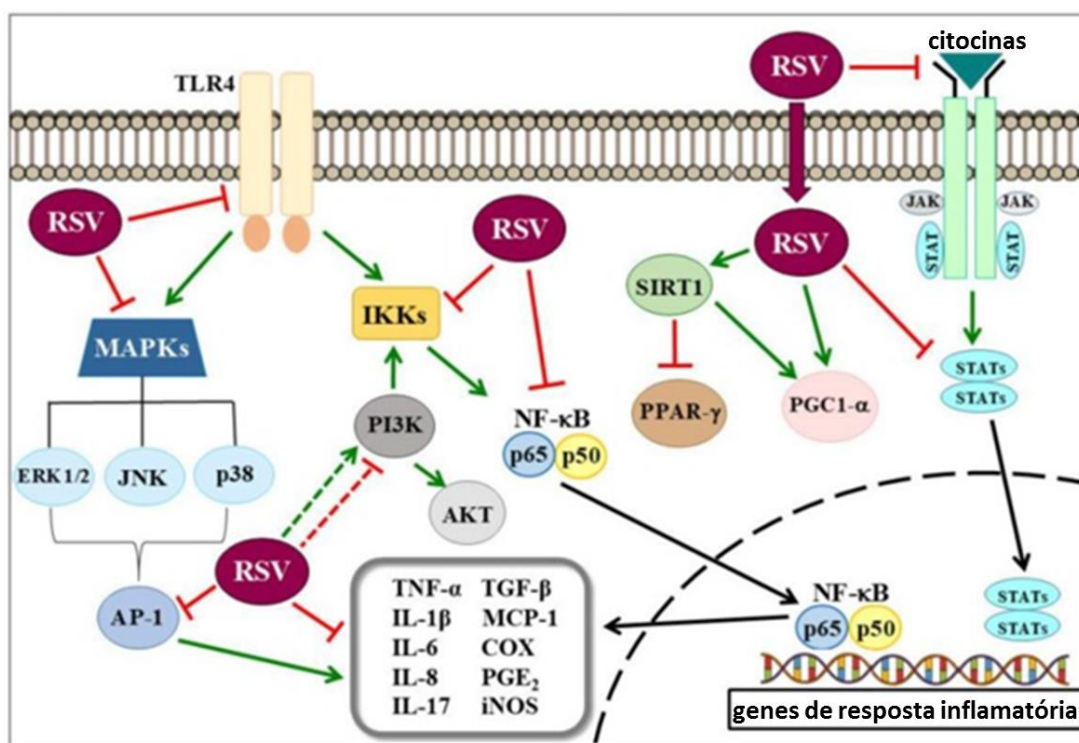


Figura 1.4. Esquema dos efeitos do resveratrol em vias inflamatórias. Setas com pontas (verdes) indicam ativação, enquanto que setas com ponta plana (vermelhas) indicam inibição. As setas tracejadas indicam um mecanismo ainda mal compreendido. Traduzido de Coutinho e cols., 2017 (131).

O perfil de interação estrutural do resveratrol sugere um modo não conservado de ligação, sem nenhum padrão em particular, apresentando um efeito pleiotrópico o qual poderia explicar, pelo menos em parte, os inúmeros efeitos biológicos da molécula (132) e a multiplicidade de alvos moleculares (120). Os alvos moleculares do resveratrol podem ser didaticamente divididos em duas classes: a primeira classe é a das biomoléculas cuja atividade, estrutura e/ou estabilidade são alteradas com a ligação direta do resveratrol, e a segunda é a das biomoléculas cujo perfil de expressão ou atividade é alterado por um mecanismo indireto, muitas vezes desconhecido (130).

Os estudos que investigam os mecanismos moleculares dos efeitos do resveratrol demonstram a interação da molécula com enzimas hidrolases (133), redutase (134), metaloproteinases de matriz (135), reguladores de transcrição, como a sirtuína (SIRT1) (136) e o NRF2 (137), GTPases (138), cinases (139), lipoxigenases (140), ciclooxigenases (141), fosfodiesterases (142) e enzimas antioxidantes (143). Importante ressaltar que o efeito do resveratrol no desbalanço oxidativo depende do seu status redox, podendo agir como um antioxidante ou um pró-oxidante, dependendo da concentração de resveratrol e do tipo de célula. Em relação ao efeito antioxidante, o resveratrol pode tanto aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como pode agir como um *scavenger* de radicais livres (120, 143).

O resveratrol foi demonstrado por possuir atividade inibidora em vias importantes na inflamação (130) como a do NF- κ B, através da modulação negativa da atividade das IKK (144), da JAK/STAT (145), das vias de sinalização PI3K/Akt (146) e da via das MAPKs (147). Além destes, são descritos efeitos na sinalização de alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) (148), modulação de miRNA (149), proteína cinase ativada por AMP (AMPK) (150), inibição do citocromo P450 (151) e de moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) (152).

Em resumo, é indiscutível o efeito biológico importante do resveratrol, o qual ocorre por meio de vários mecanismos, evidenciando que este polifenol pode ser um agente terapêutico promissor (153). Entretanto, tais mecanismos podem se apresentar de formas distintas dependendo do tipo de célula, da dose e o esquema de dosagem, bem como de quaisquer moléculas coadministradas (130).

1.2.3. Efeitos biológicos

O resveratrol ganhou atenção, não apenas das indústrias farmacêuticas, mas também das indústrias de cosméticos e suplemento alimentícios. Atualmente, o resveratrol é amplamente distribuído como um nutracêutico de venda livre por seus supostos efeitos benéficos na saúde humana (154). Durante o processo de investigação e aprovação de um novo medicamento, a comprovação da resposta biológica deve se basear em três pilares: os estudos mecanísticos (*in vitro*), os estudos em animais e os ensaios clínicos, que assegurem a eficácia e a segurança da molécula. Dessa forma, o interesse crescente resultou em uma série de estudos *in vitro* e em animais demonstrando eficácia profilática e terapêutica do resveratrol em diversas doenças (155).

Nos últimos 25 anos, os efeitos benéficos relatados do resveratrol incluem, atividade em doenças como o câncer (156), a diabetes (157), doenças cardiovasculares (158) e neurodegenerativas (159), ligadas por sua importante atividade anti-inflamatória (160) e/ou antioxidante (143). Em adição, o resveratrol apresenta propriedades antienvhecimento (161), com o prolongamento da vida útil em várias espécies e a capacidade de mimetizar os efeitos da restrição calórica (162) e aumento da biogênese mitocondrial (163). Em resumo, os estudos sugerem atividades simultâneas e multifacetadas do resveratrol em diferentes alvos moleculares (164). Entretanto, a forma como o resveratrol exerce suas funções biológicas permanece por ser totalmente elucidada (165). Além disso, a multiplicidade de alvos do resveratrol é encarada como um desafio na comunidade científica, uma vez que a molécula interage com baixa afinidade em diversas vias, em contraste com as moléculas projetadas para modular com alta afinidade um alvo específico, dificultando a sua utilização como fármaco (155).

Em relação aos efeitos do resveratrol em ensaios clínicos, apesar do grande interesse e esforço, os dados ainda não refletem os achados promissores encontrados em estudos com animais, mas ainda assim são significativos (166). Essa divergência entre laboratório e clínica pode ser atribuída, em parte, a pequena quantidade de estudos clínicos publicados, utilizando baixo número de participantes (155). Também é reconhecido na comunidade científica, a resistência da indústria farmacêutica em promover o resveratrol, assim como outros compostos de origem natural, por não serem tão lucrativos quanto moléculas próprias (166-168). Além disso, muitos pesquisadores defendem que um dos principais motivos da contradição entre os efeitos fisiológicos do resveratrol em organismos modelo e humanos seja devido a discrepâncias nos protocolos de dosagem, de metodologias estatísticas e de pesquisas inadequadas (169). Segundo

Tomé-Carneiro e cols., os dados disponíveis na literatura apresentam condições de análise irreais, as quais sustentam muitos efeitos e mecanismos difíceis de serem confirmados em ensaios com humanos (166).

Com relação a dosagem, observamos grande diferença quando se comparam estudos *in vitro* com estudos em humanos, visto que as concentrações utilizadas *in vitro* são inatingíveis em estudos clínicos em humanos, não existindo ainda um consenso sobre qual dose pode ser ideal (154). Em muitos casos, além das diferentes dosagens de resveratrol, compostos sinérgicos, os quais podem estar presentes na matriz usada para administrar o resveratrol e a duração da suplementação poderiam influenciar os resultados, mas as contribuições relativas desses fatores são desconhecidas (168). Por fim, as diferenças entre os estudos em animais e humanos, também pode ser um viés das respostas fisiológicas entre as diferentes espécies ou pode simplesmente refletir desenhos experimentais diferentes (167). Pesquisas futuras devem se concentrar em traduzir as descobertas, *in vitro* e *in vivo*, em benefícios potenciais para a saúde humana de forma segura e eficaz (168, 170).

Atualmente, utilizando o banco de dados americano <www.clinicaltrials.gov> com a palavra-chave “resveratrol” são encontradas um total de 151 estudos clínicos em diferentes estágios. Os estudos já completos contemplam o efeito do resveratrol em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes, tumor gastrointestinal, obesidade, endometriose, doença hepática gordurosa não alcoólica, hipertensão, síndrome metabólica, doença de Alzheimer, câncer de colón, entre outros, além de estudos em voluntários saudáveis. Os ensaios clínicos publicados com efeitos benéficos, incluem melhora em pacientes diabéticos (N = 19) (171), câncer de mama (N = 39) (172), doença de Alzheimer (N = 119) (173); aterosclerose (N = 44) (174) e doença hepática gordurosa não alcoólica (N = 60) (175).

1.2.4. Tolerância e efeitos adversos

Em ensaio com voluntários, o resveratrol é geralmente administrado como composto puro ou como um constituinte do vinho ou suco ou extrato de uva (176). Pelo menos uma parte da população obtém 1-2 mg/dia de resveratrol de fontes alimentares, quantidade considerada segura para consumo contínuo, segundo especialistas que participaram do Resveratrol2010 (a primeira conferência internacional sobre resveratrol e saúde) (167). Em um estudo com voluntários saudáveis, demonstrou-se que o resveratrol nas doses de 2,5 e 5 g/dia, durante 29 dias, causaram

sintomas gastrointestinais de gravidade leve a moderada, e foi seguro quando administrado na dose diária de 1,0 g (177).

Baseado em ensaios em humanos, o resveratrol é bem tolerado quando administrado na faixa de mg, seja em uma única dose de 25 mg (178) ou múltiplas de até 600 mg/dia (179). Mukherjee e cols. sugeriram que doses menores de resveratrol poderiam estar associadas a benefícios para a saúde, enquanto doses mais altas devastam células tumorais por meio de efeitos próapoptóticos (119). No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos estudos sobre a segurança farmacológica do resveratrol são realizados em populações saudáveis e que podem variar em pacientes doentes (123). A compreensão da dependência da dose do resveratrol administrado pela via oral é mais complicada, uma vez que o resveratrol é metabolizado pela microbiota intestinal (180), o que dificulta determinar quais efeitos é devido apenas ao resveratrol ou aos e seus metabólitos (106). A atividade biológica exercida pelos metabólitos do resveratrol ainda é debatida, sendo necessários mais estudos para comprovar os possíveis efeitos biológicos destes (108).

Apesar da boa tolerância, o resveratrol pode interagir com vários citocromos P450 (CYP), especialmente em altas doses, levando a um maior risco de interações medicamentosas, uma vez que é muito comum o uso de produtos naturais em pacientes que estão tomando medicamentos convencionais (181, 182). Interações com citocromos P450 podem levar a redução do *clearance* metabólico das drogas, aumentando, assim, a biodisponibilidade e o risco de toxicidade dessas drogas (106). É necessário, ainda, entender melhor a potencial toxicidade, os efeitos sobre a saúde, a biodisponibilidade e o metabolismo do resveratrol antes que as recomendações dietéticas e de suplementos possam ser feitas (166).

1.2.5. Doenças pulmonares

O resveratrol tornou-se uma molécula farmacologicamente muito atraente em muitos campos, inclusive na pesquisa das doenças pulmonares, demonstrando um papel protetor nas doenças do sistema respiratório (106, 183). Os principais efeitos protetores do resveratrol nas doenças do aparelho respiratório, inclui suas atividades anti-inflamatória (147), antiapoptótica (184), antioxidante (185), antifibrótica (186), anti-hipertensiva (187) e anticancerígena (188), estudadas amplamente em modelos *in vitro* e *in vivo* nos últimos anos.

O resveratrol demonstrou um potente efeito benéfico no tratamento da asma, uma doença respiratória crônica caracterizada pela obstrução ao fluxo aéreo reversível, intensa resposta inflamatória e estresse oxidativo (189). Lee e cols., demonstraram em modelo animal de asma que o resveratrol inibiu a inflamação, remodelamento (190) e o desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas, eosinofilia e hipersecreção de muco (191). A atividade benéfica do resveratrol também foi relatada em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida pela exposição à fumaça do cigarro combinada com injeção intratraqueal de LPS em ratos, através da redução da apoptose do retículo endoplasmático induzida por estresse em células epiteliais alveolares (184), e na lesão oxidativa do pulmão induzida por fumaça de cigarro em camundongos, via diminuição da atividade de NF- κ B e aumento da expressão e atividade da heme oxigenase-1 (185).

A fibrose pulmonar, resultante de lesão epitelial alveolar contínua e reparo falho, acarreta no acúmulo de fibroblastos e deposição excessiva de matriz extracelular (183). Em modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, o resveratrol melhorou as alterações patológicas da fibrose, associado à ativação da SIRT1(192). A hipertensão pulmonar, uma doença fatal, caracterizada por aumento de ambas resistência vascular e pressão da artéria pulmonar acompanhada de remodelamento vascular pulmonar, também apresentou melhoras após o tratamento com resveratrol via Akt (193), SIRT1 (194) e inibição das respostas anti-inflamatória (inibindo migração celular) e antioxidante (inibindo produção de EROs) (195). Adicionalmente, muitos estudos *in vitro* e *in vivo* relatam os efeitos do resveratrol contra diferentes tipos de câncer pulmonar (196), incluindo a indução da apoptose (197), aumento da produção de EROs (198), parada do ciclo celular e senescência (199).

Em relação aos estudos utilizando o estímulo com LPS para induzir a lesão pulmonar aguda, os resultados demonstram, de maneira semelhante, que o tratamento com resveratrol melhora a função pulmonar e as alterações estruturais do pulmão, diminui o edema pulmonar, a infiltração de neutrófilos e a expressão e atividade da proteína MPO no tecido pulmonar, além de reduzir os níveis das citocinas próinflamatórias, como IL-1 β e MIP- α , IL-6, TNF- α e o estresse oxidativo. Estes efeitos anti-inflamatórios foram alcançados através da inibição da expressão proteica de NLRP3, ASC, caspase-1, supressão da translocação nuclear da subunidade p65 (NF- κ B), diminuição a expressão de TLR4, myd88 e NF- κ B e da p38 MAPK e aumento da expressão dos fatores de transcrição, SIRT1e NRF2 (200-205).

1.2.6. Biodisponibilidade e metabolismo

Os potenciais benefícios para a saúde do resveratrol dependem, em parte, da sua absorção, biodisponibilidade e metabolismo levando aos níveis suficientes da molécula ativa no(s) tecido(s) alvo(s) (206). Apesar da alta absorção de resveratrol (pelo menos 70 %) observada em seres humanos após doses orais, apenas quantidades vestigiais do composto original foram encontradas no plasma (178). Devido a sua característica lipofílica, a quantidade de resveratrol no tecido ou a subcelular pode ser maior do que o encontrado no plasma (167).

O metabolismo após administração oral do resveratrol está representado na figura 1.5., a partir de dados extraídos de ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Em resumo, o resveratrol é rapidamente absorvido, atingindo um pico de concentração plasmática após, aproximadamente, 30 min da ingestão de doses baixas. Após absorção pelos enterócitos, ocorre a metabolização em glucuronido e sulfato conjugados, que são secretados de volta ao intestino onde podem ser desconjugados e reabsorvidos ou excretados nas fezes (167). Uma vez no intestino, a absorção do resveratrol ocorre por difusão passiva ou pela formação de complexos com transportadores de membrana. Após alcançar a corrente sanguínea, o resveratrol é encontrado em três formas diferentes: glicuronídeo, sulfato ou livre. Esta última pode estar ligada à albumina e às lipoproteínas (117), o que facilita sua entrada nas células (120). É importante ressaltar que a composição dietética e a microbiota gastrointestinal podem alterar o metabolismo e a absorção causando variação no metabolismo em diferentes ensaios (155).

Apesar da baixa biodisponibilidade, a eficácia *in vivo* do resveratrol pode ser explicada pela recirculação entero-hepática dos metabólitos do resveratrol, seguida de sua desconjugação no intestino delgado e sua reabsorção e/ou pela atividade de seus metabólitos (117). Mais estudos são necessários para comparar as concentrações máximas ou médias de resveratrol no plasma ou tecido humano com as concentrações necessárias para obter benefício fisiológico em modelos animais e *in vitro* (168).

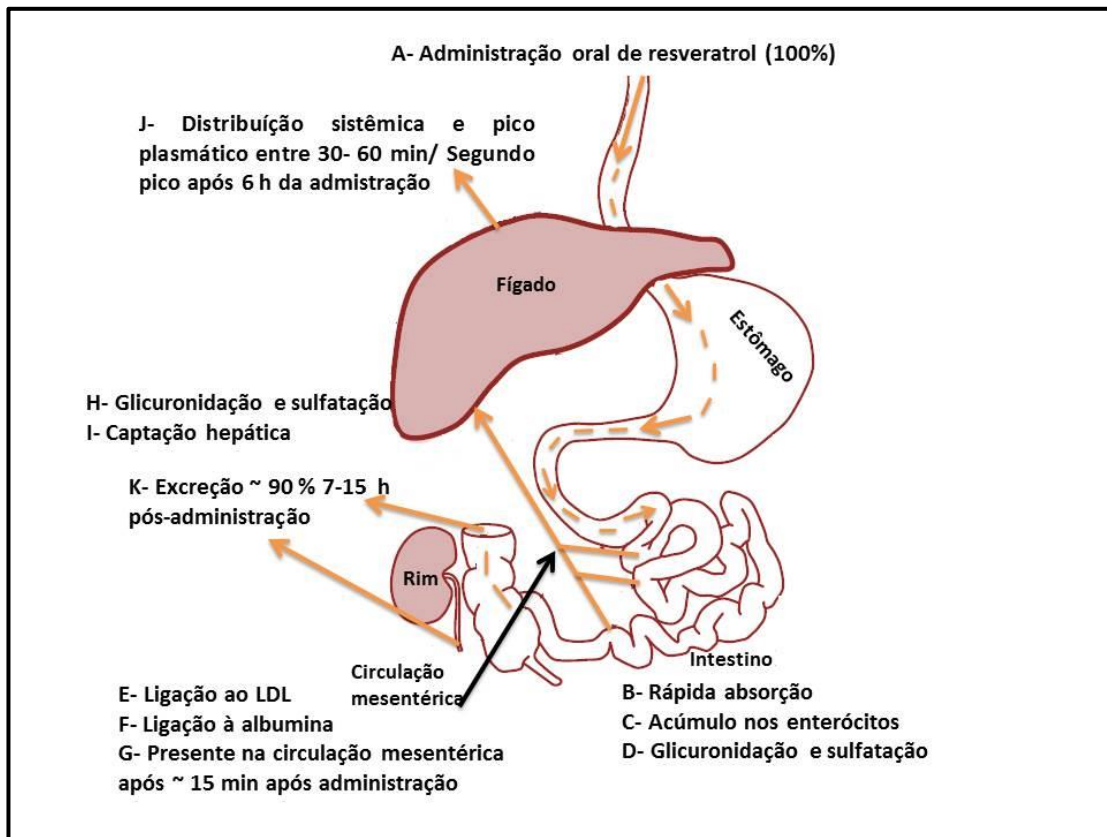


Figura 1.5. Destino *in vivo* do resveratrol após administração oral. (A) administração oral do resveratrol (100 %). (B) Rápida absorção devido à difusão (pelo menos 70 % em humanos). (C) Acúmulo nos enterócitos (pelo menos 2 %). (D) O metabolismo nos enterócitos resulta em glicuroconjugados e sulfoconjugados do resveratrol, os quais são absorvidos em direção ao espaço vascular ou excretados no lúmen. (E) O resveratrol é encontrado na circulação mesentérica (cerca de 21 %), após alguns minutos, (F) ligado à albumina e (G) e à LDL. (H) Em seguida, é captado pelo fígado (I) onde ocorre a sulfatação e glucuronidação. (J) A distribuição sistêmica é caracterizada por um pico de concentração aos 30 minutos, com metabólitos tornando-se detectáveis 3 h após a administração. Um segundo pico é observado após, aproximadamente, 6 h, sugerindo recirculação entérica de metabólitos conjugados pela reabsorção após hidrólise intestinal. (K) Excreção renal da fração não absorvida representa 40 % de resveratrol livre, 11 % de glicuronídeo e 3 % de conjugados de sulfato. Traduzido e adaptado de Amri e cols., 2011(111).

A baixa biodisponibilidade do resveratrol administrado pela via oral pode ser explicada devido a absorção intestinal incompleta, eliminação através de transportadores ABC e intenso metabolismo (206-208). Em combinação com sua baixa solubilidade e estabilidade limitada, a aplicação do resveratrol continua sendo um grande desafio para a indústria farmacêutica (106, 164, 209). Portanto, estratégias para aumentar a biodisponibilidade e direcionar o resveratrol para

órgãos específicos têm recebido atenção especial de pesquisadores da área (169). Os objetivos incluem a sintetização de derivados do resveratrol (210), alterações na estrutura da molécula e desenvolvimento de sistemas adequados de entrega do composto entre outros (169, 211, 212).

Uma possível abordagem para aumentar a biodisponibilidade do resveratrol é a administração pela via intravenosa, com o objetivo de evitar o metabolismo de primeira passagem, superando as limitações mecânicas da absorção gastrointestinal (169). O resveratrol administrado pela via intravenosa em ratos aumentou a concentração de resveratrol e seus metabolitos em relação a administração pela via oral (213), entretanto, não é uma escolha clinicamente prática se for necessária a autoadministração de forma crônica (169). Uma estratégia simples e largamente utilizada é a associação com outras moléculas que apresentam efeito sinérgico (169). Por exemplo, a coadministração do resveratrol com a piperina, um polifenol presente na pimenta preta, aumentou significativamente a concentração sérica máxima resveratrol em ratos (214). Nessa mesma linha, a combinação de resveratrol com a quercitina, um flavonoide natural, em um estudo cinético *ex vivo*, reduziu a taxa de sulfatação do resveratrol (215). Uma abordagem ainda pouco investigada, até o momento, para maximizar a biodisponibilidade do resveratrol livre é a utilização de pró-drogas (216).

Baseado no princípio de que a diminuição do tamanho das partículas pode melhorar sua taxa de dissolução e absorção, foi desenvolvido uma formulação micronizada, denominada SRT501, a qual aumentou de 2 a 3 vezes a concentração plasmática de resveratrol (217). Além dessa estratégia, a utilização de nanocápsulas contendo resveratrol também tem sido de ampla utilidade (212), por exemplo, possibilitando o aumento da distribuição da molécula nos tecidos e diminuição de dano gastrointestinal e aumentando as concentrações plasmáticas em comparação com o resveratrol livre (218). Mais exemplos do uso de nanotecnologia para melhorar a biodisponibilidade do resveratrol é discutido no item 1.3.4.

1.3. Nanotecnologia

1.3.1. Aspectos gerais da nanotecnologia e nanomedicina

A nanotecnologia é uma ciência contemporânea e interdisciplinar, com aplicação em diversas áreas como engenharia, eletrônica, cosmética, alimentos, medicina e farmacologia. No contexto da biologia e da medicina, a nanotecnologia engloba os materiais, dispositivos e sistemas cuja estrutura e função são relevantes para pequenas escalas de comprimento (219).

Baseada na manipulação de materiais a serem projetados em nanoescala (1 a 1000 nm) (Figura 1.6), a nanotecnologia torna possível a criação de materiais em tamanho nanométrico com propriedades e funções fundamentalmente novas em partículas de até 100 nm (220-222). Por exemplo, propriedades ópticas diferenciadas, como as das nanopartículas (20 nm) de ouro, de platina, de prata e paládio que apresentam cores característica vinho tinto, cinza amarelado, preto e preto escuro, respectivamente (223). Apesar da aplicação da nanotecnologia ter recebido mais visibilidade recentemente, a utilização dos nanomateriais foi prevista já em 1959 por Richard P. Feynman (224, 225). Atualmente, a nanociência e a nanotecnologia são campos prioritários para inovação, sendo um elemento-chave para o desenvolvimento científico e econômico mundial (226).

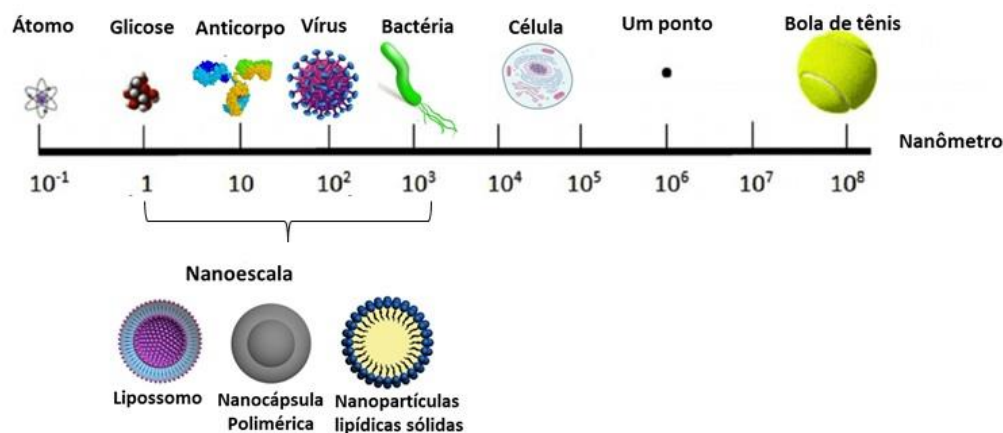


Figura 1.6. Tamanhos relativos de nanopartículas em comparação com estruturas conhecidas. Adaptado e traduzido Tarafdar, J. & Adhikari, T., 2015 (227) e Khodabandehloo, Hadi e cols., 2016 (228).

A nanotecnologia levou a abordagens inovadoras em muitas áreas da biomedicina. A nanomedicina, uma disciplina emergente, une nanotecnologia e a medicina para desenvolver novas terapias e melhorar tratamentos existentes. O impacto da nanotecnologia na medicina pode ser visto principalmente em métodos de diagnóstico, técnicas de liberação de drogas e medicina regenerativa (224, 229). A nanotecnologia oferece a possibilidade de projetar novos medicamentos com maior especificidade celular, bem como novos sistemas de liberação de fármacos que atuem seletivamente em alvos específicos e protejam o fármaco da degradação.

Como consequência, utilizando nanossistemas, é possível aumentar a eficácia terapêutica, obtendo menores taxas de toxicidade (224, 230). Essa realidade já é encontrada na terapia do câncer, onde há muitas aplicações clínicas baseadas em nanotecnologias, com um grande desenvolvimento em sistemas de distribuição de fármacos (231).

A exploração de sistemas coloidais, ou seja, sistemas contendo componentes de tamanho nanométrico, para pesquisa biomédica, foi iniciada há mais de 50 anos. Um exemplo importante, foram os esforços realizados para reduzir a cardiotoxicidade das antraciclinas, via encapsulação em vesículas fosfolipídicas nanométricas (lipossomas), que começaram no final dos anos 70 e em 1995 levou a aprovação do Doxil® pela Food and Drug Administration (FDA), o primeiro fármaco nanoformulado aprovado pela agência americana (232, 233). Em seguida, em um estudo conduzido por Northfelt para avaliar a eficácia do Doxil®, observou-se que pacientes com sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS tratados com uma dose única de doxorubicina nanoformulada apresentaram maior quantidade da molécula nas lesões, após 72 h da administração, apresentando quantidade de 5 a 11 x maiores em comparação com a doxorubicina na forma livre (234).

1.3.2. Sistemas nanocarreadores de fármacos

Os nanocarreadores possuem diâmetro na faixa entre 1 a 1000 nanômetros (nm), sendo mais comum apresentar na faixa de 100 nm (235). O limite máximo e mínimo de diâmetro dos nanocarreadores é determinado pela sua capacidade de atravessar barreiras biológicas e pela capacidade de eliminação pelos rins, respectivamente (236). A utilização de nanocarreadores para administração de fármacos possibilita diversas vantagens terapêuticas, em comparação com as formulações tradicionais, como a proteção contra degradação enzimática e imunodegradação, proteção de sequestro pelo sistema reticuloendotelial na corrente sanguínea, hidrólise ácida no estômago e da depuração mucociliar nos pulmões (237).

A nanoestruturação também é capaz de melhorar a estabilidade química da molécula, permitir a dispersão aquosa estável de agentes moleculares pouco solúveis, diminuição da toxicidade sistêmica e o aumento da eficácia (238). O controle do tamanho, forma e propriedades de superfície possibilita vetorizar as nanopartículas para órgãos, tecidos, células e compartimentos subcelulares (239). Além da vetorização, a nanoestruturação permite liberação controlada nos sítios-alvo (240), levando a uma ação otimizada e sustentada do fármaco (241). Em adição a todas as vantagens citadas, os sistemas nanocarreadores também permitem a entrega de mais de uma

molécula, ou combinação de terapia e diagnóstico de forma simultânea (235), além de possibilitar a biocompatibilidade e a biodegradabilidade das nanoestruturas utilizadas (224).

A proteção contra degradação enzimática e o pH ácido no trato digestivo, permite a administração de nanopartículas pela via oral, uma via de primeira escolha para administração de fármacos devido à facilidade de administração e por ser menos invasiva (236, 242). Além da ação prolongada, os nanocarreadores permitem a manutenção homogênea dos níveis do fármaco dentro da janela terapêutica, evitando picos potencialmente perigosos na sua concentração após a administração, tornando possível a estratégia de redução de doses, consequentemente, diminuindo a toxicidade, os efeitos adversos e adesão ao tratamento (235, 243).

Além das características físico-químicas como tamanho e carga que permitem uma melhor distribuição e vetorização do fármaco, métodos alternativos foram desenvolvidos para aumentar a efetividade do fornecimento de drogas usando a capacidade de direcionamento passivo ou ativo. A forma de direcionamento passivo consiste na capacidade das nanopartículas de longa circulação penetrarem através de fenestrações capilares em consequência do chamado efeito de permeabilidade e retenção melhorada (EPRM), um processo fisiológico que aumenta o espaço intercelular em tecidos submetidos a certas patologias, como câncer ou inflamação, resultado da angiogênese desregulada e/ou aumento da expressão e ativação de fatores de permeabilidade vascular (224, 244). Por sua vez, a vetorização ativa permite que uma área específica do corpo seja atingida a partir da ligação específica de ligantes presente na superfície das nanopartículas com receptores na superfície da célula ou tecido. Os tipos de ligantes utilizados incluem anticorpos, fragmentos de anticorpos ou peptídeos, entre outros (224). Uma vez no local, os mecanismos de ativação da liberação do fármaco podem ocorrer passivamente (por exemplo, uma alteração de pH) ou ativada externamente (por exemplo, fotodegradação) (237).

Apesar da vasta quantidade de dados gerados nos últimos anos, ainda se faz necessário expandir o conhecimento sobre os mecanismos de interação entre nanopartículas e sistemas vivos. As nanopartículas podem se ligar e interagir com a matéria biológica e mudar suas características de superfície, dependendo do ambiente em que estão inseridas. Além disso podem apresentar comportamento completamente diferente devido a pequenas diferenças no revestimento, carga ou tamanho da superfície. O uso terapêutico de nanomateriais na medicina requer uma estrutura regulatória que equilibre o benefício terapêutico com o risco potencial de dano (245).

Diversos materiais e estruturas têm sido empregados como nanocarreadores para alvos passivos ou ativos. Partículas metálicas, como óxidos de ferro ou nanopartículas de ouro, podem ser modificadas na superfície para atuar como transportadores de fármacos. No entanto, os materiais orgânicos são mais versáteis e suas propriedades e desempenhos podem ser afinados ajustando-se sua composição química, tamanho, forma, morfologia das estruturas e propriedades da superfície (236). A biodegradabilidade e biocompatibilidade estão entre os principais pré-requisitos para a seleção do material a ser utilizado na obtenção de nanoformulações (246).

As propriedades físico-químicas podem variar de acordo com o método de preparo ou com a quantidade dos materiais utilizados. As propriedades físico-químicas mais importantes a serem analisadas incluem o dimensionamento de partículas e polidispersividade, potencial zeta, teor de fármaco e perfil de liberação de fármaco (246). As técnicas comumente utilizadas para a caracterização de nanopartículas incluem cromatografia por exclusão de tamanho, cromatografia líquida, ultrafiltração-centrifugação, espalhamento dinâmico e estático de luz, mobilidade eletroforética, potenciometria, espalhamento de raios-X a baixo ângulo, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura e transmissão (247).

1.3.2.1. Tipos de nanocarreadores: nanocápsulas poliméricas

Os nanocarreadores podem ser classificados como sistemas baseados em polímeros ou lipídios, os quais são capazes de serem carregados com drogas hidrofóbicas e hidrofílicas (248). Dentre os principais nanocarreadores aplicados à área farmacêutica pode-se destacar as micelas, os lipossomos, as nanopartículas lipídicas sólidas e os nanocarreadores poliméricos (224) (Figura 1.7). As nanopartículas poliméricas apresentam vantagens distintas, incluindo maior capacidade de direcionamento e armazenamento a longo prazo, além de alta eficiência de encapsulação em comparação aos outros nanocarreadores. As nanopartículas também controlam as propriedades de liberação do fármaco e melhoram a captação intracelular, levando assim a uma maior especificidade e eficácia terapêutica de drogas encapsuladas (249). Além disso as nanopartículas utilizadas como transportadores de fármacos possuem maior estabilidade e longa vida útil; viabilidade de incorporação de substâncias tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas; e viabilidade de administração por diferentes vias, incluindo via oral (250).

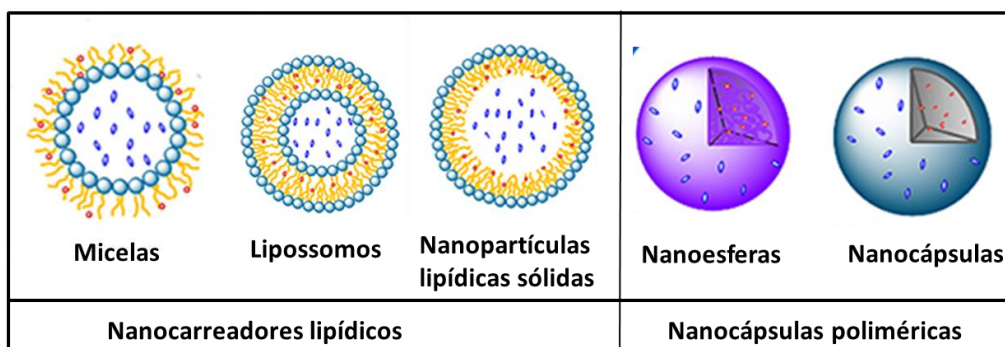


Figura 1.7. Exemplos de nanocarreadores. Traduzido e adaptado de João Conriot e cols., 2014 (241).

Os nanocarreadores poliméricos são compostos por polímeros naturais (proteínas e polissacarídeos), semissintéticos ou sintéticos, podendo ser divididos em nanoesferas ou nanocápsulas. As nanoesferas são sistemas de matriz nos quais a droga é fisicamente e uniformemente dispersa no polímero, enquanto as nanocápsulas são o sistema no qual a droga é confinada a uma cavidade cercada por uma membrana polimérica (248).

As nanocápsulas poliméricas, ou apenas nanocápsulas (251) são definidas como sistemas reservatórios vesiculares em nanoescala que exibem uma estrutura típica de núcleo-casca na qual um núcleo líquido interno (aquoso ou oleoso) é circundado por uma membrana de polímero (252), a qual é estabilizada por surfactantes (253). As nanocápsulas possuem alta capacidade de carga e baixa densidade e são consideradas veículos ideais para o fornecimento de agentes terapêuticos e de diagnóstico (252, 254).

As nanocápsulas são feitas de uma variedade de polímeros naturais (gelatina, albumina) e sintéticos (polilactídeos, polialquilcianoacrilatos) (220). Os polímeros aprovados pela FDA para administração em humanos são o poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli (metacrilato de metila) (PMMA) que são removidos do corpo através de vias metabólicas tradicionais (255). No presente trabalho, utilizamos para compor as nanocápsulas a PCL, um polímero biodegradável, biocompatível e semicristalino, considerado adequado para administração controlada de fármaco devido a sua elevada permeabilidade e, ao mesmo tempo, isento de toxicidade (256), pois uma vez dentro do corpo, pode ser metabolizado em subprodutos não tóxicos (257).

As nanocápsulas são preparadas principalmente por duas tecnologias: a polimerização interfacial de monômeros (polimerização em emulsão) e nano-deposição interfacial de polímeros

pré-formados (nanoprecipitação) (255, 258). Sendo este último mais utilizado, devido à sua reprodutibilidade, fácil manuseio e segurança por evitar a formação de monômeros residuais potencialmente tóxicos e reduzir a possibilidade de uma ligação covalente entre o polímero e a substância a ser carreada (246). A nanoprecipitação ou método de deslocamento do solvente, é baseada na deposição interfacial de um polímero, após o deslocamento de um solvente semi-polar miscível com água em uma solução lipofílica. A rápida difusão do solvente na fase aquosa diminui a tensão interfacial entre as duas fases, levando ao aumento da área de superfície e à formação de pequenas gotas de solvente orgânico, mesmo sem qualquer agitação mecânica (255).

1.3.3. Nanotecnologia aplicada a doenças pulmonares

As condições clínicas que acometem o sistema respiratório incluem um amplo espectro de doenças, acometendo indivíduos em todas as faixas etárias (259). O desenvolvimento de nanocarreadores para aplicação pulmonar tem sido muito debatido pela comunidade científica nas últimas décadas (259, 260). Embora as pesquisas sobre o uso de nanopartículas para aplicação pulmonar ainda estejam em fase inicial, os estudos realizados até o momento sugerem que o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para tratamento sistêmico ou local de doenças que afetam o sistema respiratório pode ser promissor (261). O pulmão é um alvo interessante para a administração de medicamentos devido à administração não invasiva e segura via inalação (259). Além administração direta, a entrega de medicamentos ao pulmão pode ser realizada pelas vias intravenosas e orais, e a nanotecnologia está sendo usada para viabilizar as três abordagens (262).

A nebulização de nanomicelas de budesonida, no modelo de asma em ratos, apresentou maior eficácia e prolongamento do efeito quando comparado a uma formulação comercial do medicamento (263). O tratamento, também por via inalatória, da infecção pulmonar crônica induzida por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando uma nanoformulação lipossômica do antibiótico amicacina, promoveu a liberação sustentada do medicamento, com eficácia farmacológica superior comparado a forma livre (264). Estudos clínicos iniciais de Fase I e Fase II utilizando a nanoformulação da amicanica (Arikace™) demonstraram que a formulação é segura e eficaz no tratamento da fibrose císticas infectadas com *Pseudomonas aeruginosa* (265). Em modelo de asma, um estudo utilizando nanocápsulas poliméricas contendo betametasona, demonstrou o efeito benéfico prolongado da formulação em comparação a molécula livre após o tratamento pela via intravenosa, por 7 dias após uma única administração da betametasona

nanoencapsulada, enquanto que uma única dose do esteroide na forma livre não apresentou efeitos significativos (266). No tratamento da tuberculose causada por *Mycobacterium tuberculosis* latente e resistente a múltiplos fármacos utilizando nanocápsulas de econazol ou moxifloxacina, Ahmad e colaboradores demonstraram que apenas uma única dose oral, resultou em concentrações terapêuticas de droga no plasma por até 5 dias (econazol) ou 4 dias (moxifloxacina), enquanto nos órgãos (pulmões, fígado e baço) foi de até 6 dias. Em contrapartida, as drogas livres foram eliminadas dos mesmos órgãos entre 12 e 24 h após administrações diárias por semanas (267).

O pulmão é um dos órgãos alvo mais comuns onde as células tumorais tendem a migrar em pacientes com câncer. No entanto, muitas drogas tradicionais ou terapias não conseguem tratar essas doenças completamente ou aliviar os sintomas de forma eficaz (260). Os estudos com nanocarreadores estão mais avançados no tratamento do câncer pulmonar, mostrando um enorme potencial na terapia e diagnóstico. Pesquisadores confirmaram que a quimioterapia por inalação baseada em nanotecnologia é viável e mais eficaz que a quimioterapia convencional, com menores efeitos colaterais (268). A encapsulação dos quimioterápicos paclitaxel e docetaxel em nanocápsulas poliméricas, apresentaram efeito sinérgico na eficácia da radiação em camundongos (269). Em outro estudo, a formulação lipossomal de cisplatina, um agente citotóxico amplamente utilizado e eficaz no tratamento de câncer, o qual apresenta reações adversas graves, demonstrou ausência de toxicidade quando administrado uma única vez (30 mg/kg), enquanto a mesma dose da molécula livre apresentou nefrotoxicidade grave. Além disso, o tratamento com a formulação de cisplatina apresentou efeito citotóxico em células tumorais, reduzindo o tamanho do tumor e induzindo a apoptose das células tumorais (270).

Estudos utilizando a nanotecnologia para entrega de fármaco também foram realizados em modelo de SDRA. Em 2011, Lim e cols. demonstraram que a nanoestruturação do peptídeo humano semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) com micelas fosfolipídicas (via subcutânea) exerceu efetiva proteção anti-inflamatória, em contraste o GLP-1 livre não apresentou efeito anti-inflamatório significativo (271). Recentemente, nosso grupo de pesquisa confirmou que a nanoestruturação do α -bisabolol (sesquiterpeno de origem natural) potencializa os efeitos anti-inflamatórios da molécula, modulando a via MAPK e aumenta a biodisponibilidade da molécula no tecido pulmonar, após uma única dose pela via oral, em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS (85). Com relação ao resveratrol nanoestruturado, alguns trabalhos na literatura tiveram sucesso ao avaliar o seu efeito em linhagens de células pulmonares demonstrando a

melhora do estresse oxidativo (272) e eficácia quimioprotetiva da molécula nanoformulada em comparação a livre (273, 274). Porém, não existem relatos utilizando o tratamento com nanocápsulas contendo resveratrol para avaliar a melhora da inflamação e o aumento da biodisponibilidade em modelos de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

1.3.4. Nanotecnologia e resveratrol

Como descrito anteriormente, apesar do grande potencial farmacológico, o resveratrol apresenta limitações farmacocinéticas e estruturais como baixa solubilidade aquosa, baixa fotoestabilidade e extenso metabolismo de primeira passagem, que dificultam a sua aplicação biológica (212). Nesse cenário, um grande número de estudos tem concentrado esforços em desenvolver alternativas que possam melhorar a biodisponibilidade do resveratrol, incluindo o uso da nanotecnologia (106, 111). As formulações nanométricas de resveratrol geralmente apresentam estabilidade e biodisponibilidade melhoradas e aumento da solubilidade com efeitos colaterais mínimos em comparação com o fármaco livre (169). Uma variedade de materiais, formulações e tecnologias de encapsulamento foram examinados para melhorar a entrega do resveratrol (275).

Teskac e cols. utilizaram nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com resveratrol e demonstraram através de fluorescência que as nanocápsulas atravessam a membrana celular de queratinócitos e se distribuem no citosol sem apresentar citotoxicidade, aumentando a solubilidade, estabilidade e entrega intracelular do resveratrol. Enquanto que o resveratrol em solução foi ligeiramente citotóxico. Além disso, o mesmo estudo mostrou que as nanocápsulas contendo resveratrol aumentou a eficácia na diminuição da proliferação celular, apresentando benefícios potenciais para a prevenção do câncer de pele (276). Outro estudo *in vitro* demonstrou que encapsulação de resveratrol em nanocarreadores lipídicos protegeu a molécula da fotodegração e aumentou a permeabilidade intestinal sem alterar a integridade das células (277). A encapsulação do resveratrol em lipossomos também melhorou a estabilidade, evitando a isomerização da forma *trans* para a forma *cis* do resveratrol (278). A avaliação da administração pela via oral de nanocápsulas lipídicas sólidas contendo resveratrol demonstrou um aumento 8 vezes maior da biodisponibilidade do resveratrol nanoencapsulado em comparação com a molécula livre, em ratos saudáveis, além do aumento da estabilidade e liberação sustentada (279). O efeito da incorporação do resveratrol em nanopartículas de gelatina foi investigado em células

de câncer de pulmão. O estudo demonstrou que a formulação exibiu uma captação celular muito rápida e eficiente, e maior eficácia antiproliferativa do que o resveratrol livre, sem exibir resposta tóxica (280). Nanopartículas isoladas de proteína de soja contendo resveratrol aumentou em mais de duas vezes a solubilidade do resveratrol sem perder a sua atividade, demonstrada pela inibição do NF- κ B em ensaio *in vitro* (115). O resveratrol administrado em nanocápsulas poliméricas apresentou superior efeito na redução da viabilidade das células tumorais e aumento de necrose tecidual comparado com molécula livre, em modelo murino de melanoma (281). Resultados benéficos com nanocápsulas poliméricas contendo resveratrol também foram promovidos em modelo de doença de Parkinson, no qual apenas a formulação, mas não a sua forma livre, apresentaram neuroproteção significativa contra alterações comportamentais e neuroquímicas, através da inibição de peroxidação lipídica e melhora no teste de reconhecimento social (282).

No presente trabalho, utilizamos nanocápsulas poliméricas contendo resveratrol desenvolvidas pelo método de deposição interfacial de polímeros biodegradáveis, previamente desenvolvidas e avaliadas em modelo de glioma e doença de Alzheimer. A formulação (5 mg/kg) apresentou um efeito antiglioma, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, diminuindo a viabilidade celular em maior magnitude do que a molécula livre (283) e aumentou a biodistribuição tecidual no cérebro, fígado e rim, em comparação com fórmula livre (218), assim como apresentou efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores em modelo experimental da doença de Alzheimer, no qual a molécula livre não apresentou efeito (284).

2. Justificativa

A SDRA é uma síndrome caracterizada por edema pulmonar e inflamação aguda (79) e apesar dos avanços sobre a compreensão dos mecanismos moleculares e fisiopatológicos, assim como aperfeiçoamento das estratégias ventilatórias e dos cuidados paliativos, a mortalidade dos pacientes com SDRA permanece inaceitavelmente alta, sem terapia eficaz (285). A indução da lesão pulmonar por LPS é um modelo experimental muito útil apresentando semelhanças importantes com a síndrome em humanos (79), principalmente da SDRA resultante da pneumonia (bacteriana) e sepse, classificadas como as principais causas da síndrome.

O resveratrol em sua forma livre foi previamente investigado no modelo de lesão pulmonar aguda quanto ao seu efeito anti-inflamatório. No entanto, fica claro que nestes ensaios foram utilizadas vias de administração com menor taxa de metabolismo, como a via intraperitoneal (200-202). A administração oral de resveratrol, em estudos prévios, resultou no aumento da dose e do regime da molécula, por exemplo, três dias seguidos (203, 204). No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez a viabilidade de administrar por via oral uma dose única e baixa de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo resveratrol para prevenir a inflamação pulmonar de maneira robusta. A nanoestruturação do resveratrol, além de evitar o metabolismo intestinal da molécula, também permite a proteção contra possíveis danos gastrointestinais e aumento da biodistribuição (218).

Adicionalmente, destacamos que, a validação do efeito do resveratrol nanoencapsulado em baixas doses pela via oral permite considerar sua aplicação no tratamento de doenças pulmonares crônicas, como por exemplo, a asma ou a doença pulmonar obstrutiva crônica. A via oral apresenta inúmeras vantagens por ser uma via menos invasiva, segura, de fácil administração com maior adesão do paciente, sendo considerada uma via de escolha ideal (286).

3. Hipótese

A hipótese do presente trabalho é de que as vantagens associadas com a nanoestruturação do resveratrol em nanocápsulas poliméricas poderiam reduzir a inflamação pulmonar aguda induzida pelo LPS, através do aumento da biodistribuição da molécula no local da inflamação em camundongos tratados pela via oral, em baixas doses.

4. Objetivos

4.1 Objetivos gerais

Investigar o efeito farmacológico preventivo e terapêutico o resveratrol na forma livre ou nanocápsulas poliméricas contendo resveratrol na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo.

4.2. Objetivos específicos/metas:

Avaliar os efeitos do pré- e pós-tratamento do resveratrol livre ou nanoencapsulado:

- Na cinética de tempo do efeito anti-inflamatório;
- Na função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas;
- No acúmulo de leucócitos para o pulmão;
- No dano histológico ao tecido pulmonar;
- Na produção de citocinas no tecido pulmonar;
- No estresse oxidativo no tecido pulmonar;
- Nas proteínas envolvidas na sinalização celular;
- Na biodistribuição do resveratrol no tecido pulmonar na condição de pós-tratamento.

5. Materiais e métodos

5.1. Preparo das nanocápsulas contendo resveratrol

As nanocápsulas contendo resveratrol (resveratrol-NC), representadas na Figura 5.1., foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado (nanoprecipitação) como descrito anteriormente (284), em colaboração com o Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos (SNAF) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O *trans*-resveratrol (0,010 g), o polímero poli (ϵ -caprolactona) (0,100 g), o triglicérido cáprico/caprílico (0,33 mL) e o monoestearato de sorbitano (0,038 g) foram dissolvidos em acetona (27 mL) à 40 °C sob agitação magnética constante (fase orgânica). Num balão separado, adicionou-se o polissorbato 80, um tensoativo hidrofílico (0,038 g), a 53 mL de água (MilliQ®) (fase aquosa). Após a mistura das soluções sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min, o óleo disperso na mistura solvente/não-solvente e o polímero depositaram-se ao redor da gotícula formada. Em seguida a acetona foi evaporada sob pressão reduzida e as suspensões foram concentradas e ajustadas para 10 mL de volume final. As nanocápsulas brancas (NC-brancas) foram preparadas como descrito, porém, sem adicionar o *trans*-resveratrol.

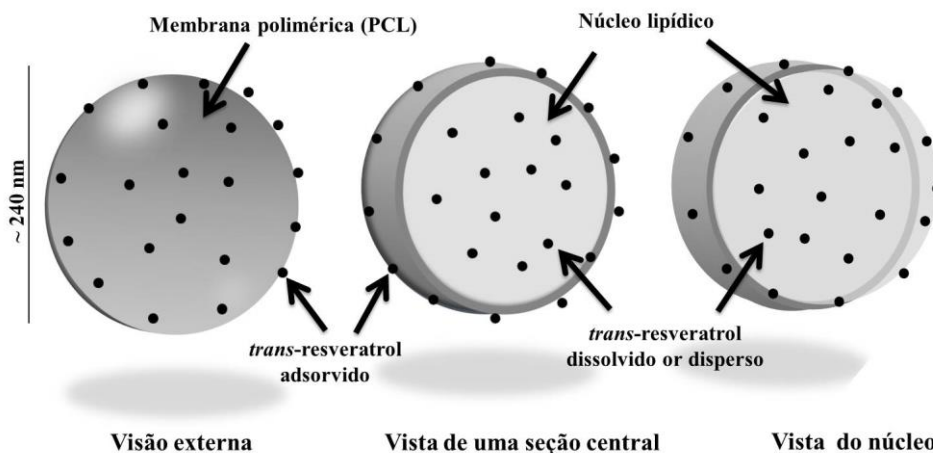


Figura 5.1. Representação gráfica de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico carregadas com *trans*-resveratrol.

5.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo resveratrol

Foi avaliado o pH das formulações com o potenciômetro B-474 (Micronal, Brasil). Em seguida as amostras diluídas com água MilliQ® ou com uma solução aquosa de NaCl 0,01 mol/L foram utilizadas para determinar os diâmetros médios (média Z), polidispersividade e potencial zeta usando um modelo Zetasizer® nano-ZS ZEN 3600 (Nanoseries, Malvern, REINO UNIDO) à 25 °C. As medições foram realizadas utilizando 3 lotes diferentes para cada formulação em triplicata. Os cálculos dos índices de tamanho e polidispersividade foram obtidos utilizando o programa (Dispersion Technology Software - DTS Nano - Versão 5.02, Malvern). O conteúdo de resveratrol (concentração total) nas formulações (100 µl) foi determinado após a dissolução do resveratrol-NC em acetonitrila (10 ml) e filtração (Millipore 0,45 µm) por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) a 306 nm. O sistema utilizado continha um detector UV-Vis, bomba e auto-injetor S200 Perkin-Elmer (PerkinElmer Instruments, Norwalk, CT) e uma coluna Shim-pack CLC-C8 (M) (150 mm, 4,6 mm, 5 µm, Shimadzu Corporation, Japão) com uma coluna de guarda. A fase móvel foi preparada usando água Milli-Q® e acetonitrila (60:40 v / v) com um pH de $3,0 \pm 0,5$ corrigido com ácido ortofosfórico a 10% (v / v) (Merck, Darmstadt, Alemanha). O fluxo isocrático da fase móvel foi de 1,2 ml / min e o tempo de retenção do *trans*-resveratrol foi de 3,45 min (218).

5.3. Animais

Foram utilizados camundongos machos A/J (5 a 7 animais por grupo), pesando entre 18-20 g, provenientes do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelo da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em ciclo de 12 h/12 h, claro/escuro, sob condições de temperatura entre 25-28 °C, com acesso a alimento e à água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA – número de licença L-006/2016).

5.4. Procedimento de indução da inflamação pulmonar aguda

Os camundongos A/J foram anestesiados com aerossol de isoflurano e fluxo constante de O₂ (3,5 Kgf/cm²) (BRASMED, Brasil) e instilados pela via intranasal de 25 µg LPS em 25 µL de salina. No grupo controle o LPS foi substituído por salina estéril.

5.5. Intervenção terapêutica

Neste trabalho foram utilizados dois regimes de tratamento utilizando a via oral: o pré-tratamento, realizado 1, 4, 6, 12 e 24 h antes da indução da inflamação com LPS (Figura 5.2), e o pós-tratamento, realizado 6 h após a exposição local com o agente inflamatório (Figura 5.3). Utilizamos os grupos i) salina não-tratado (recebeu apenas salina intranasal); ii) LPS não-tratado (recebeu apenas LPS intranasal); iii) NC-brancas (exposto ao LPS e tratado com nanocápsulas preparadas sem resveratrol); dexametasona (exposto ao LPS e tratado com o fármaco de escolha, dexametasona), resveratrol (exposto ao LPS e tratado com a molécula em sua forma livre); e resveratrol-NC (exposto ao LPS e tratado com a nanocápsulas contendo resveratrol). Para o tratamento com resveratrol-NC escolhemos doses abaixo das utilizadas na literatura. Dessa forma estabelecemos as doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg para os tratamentos com resveratrol-NC ou livre. As NC-brancas foram sempre administradas com a quantidade equivalente a maior dose do resveratrol-NC utilizada no ensaio. Para a administração da molécula na forma livre, utilizamos o *trans*-resveratrol (Biosynth), mesma matéria-prima utilizada para o preparo das formulações, o qual foi solubilizado em etanol absoluto (10 mg/mL) e redisperso em solução salina até uma concentração final de 1 mg/mL (10 % de etanol) imediatamente antes da administração. A dose de dexametasona utilizada foi de 5 mg/kg em todos os ensaios, baseado na literatura (287). As análises foram realizadas 24 h após o desafio LPS.

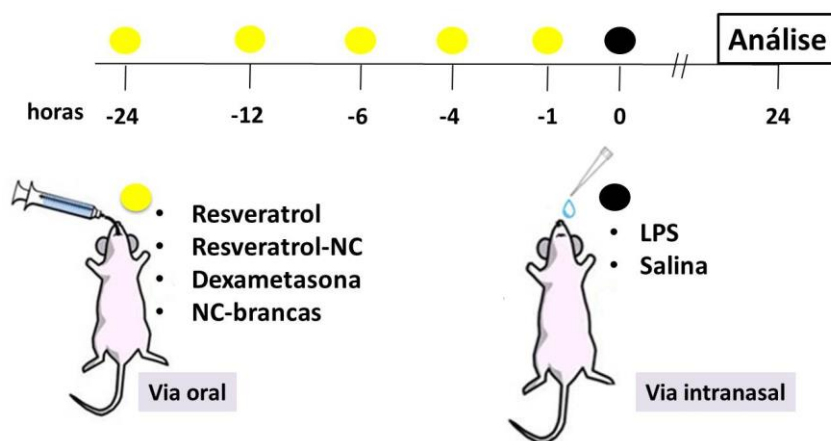


Figura 5.2. Representação do protocolo de pré-tratamento.

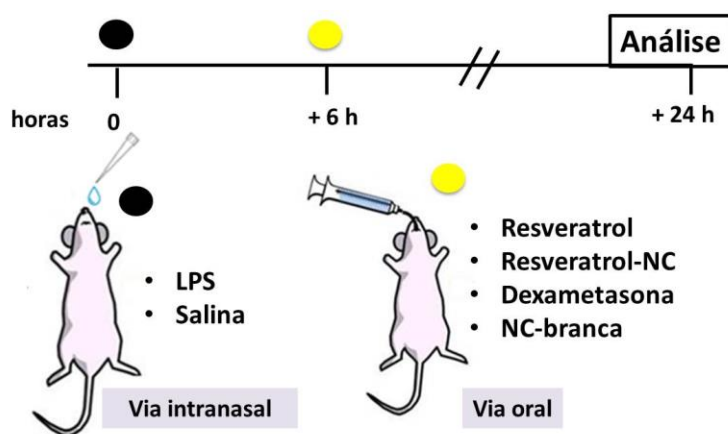


Figura 5.3. Representação do protocolo de pós-tratamento.

5.6. Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas

Após anestesia com pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.) os camundongos foram traqueostomizados e canulados via traqueal em uma cama aquecida a 37°C na câmara do pletismógrafo e a cânula traqueal foi acoplada ao pneumotacógrafo utilizando o sistema de pletismografia barométrica invasiva de corpo inteiro (Sistema Buxco, UK). Após a administração de bloqueador neuromuscular (Brometo de Pancurônio - 1 mg/kg, i.m.) os animais foram mantidos sob ventilação mecânica com fluxo, volume e corrente constantes. Através do programa BioSystem XA foram processados os sinais de fluxo e pressão, permitindo o registro da

elastância pulmonar (cmH₂O/mL). Para avaliação da hiper-reatividade, após um período de estabilização, as vias aéreas receberam, PBS e concentrações crescentes do agente broncoconstritor metacolina (3, 9 e 27 mg/mL) por um período de 5 min para cada concentração. O resultado está representado pela área sob a curva obtida a partir dos valores médios da exposição à metacolina nas concentrações de 3, 9 e 27 mg/ml.

5.7. Avaliação de migração de leucócitos para o pulmão: lavado broncoalveolar e perfusão pulmonar

Para acessar a migração dos leucócitos nas vias aéreas pulmonar foi realizado o lavado broncoalveolar a partir da inserção de uma agulha (40 mm x 12 mm) conectada a uma seringa de 1 mL em uma pequena incisão na traqueia anteriormente exposta. Foram realizadas três lavagens com 0,5 mL de solução salina contendo EDTA (10 mM). O lavado broncoalveolar foi mantido em refrigeração e, em seguida, centrifugado a 240 *xg* por 5 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 250 µL da mesma solução utilizada no lavado e posteriormente, diluiu-se uma alíquota desta suspensão de células em líquido de Türk (10 x) para a contagem das células totais. O número total de leucócitos foi contado em uma câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz (objetiva de 20 x). A análise diferencial das subpopulações de leucócitos foi realizada em citoesfregaços, centrifugados a uma rotação de 18.06 *xg*, por 5 min (citocentrífuga Shandon) e posteriormente corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio de luz com objetiva de imersão em óleo (objetiva de 100 x).

Após a recuperação do lavado broncoalveolar foi realizada a perfusão dos pulmões pela via intracardíaca, na qual inseriu-se um escalpe no ventrículo direito do coração por onde foi introduzida a solução salina contendo EDTA (20 mM). A artéria aorta abdominal foi cortada para a liberação do sangue retido durante a perfusão. O lóbulo esquerdo do pulmão foi destinado à histologia e o direito foi dividido em três fragmentos, separados em três diferentes tubos *ependorf* para as análises posteriores. Os tubos contendo os tecidos foram submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido e armazenados até o uso à temperatura de - 20 ou - 80 °C.

5.8. Quantificação de proteínas no tecido pulmonar

A quantificação de proteína no tecido pulmonar foi realizada pelo método de BCA (ácido bicincônico) (288) a íon cobre (I) (Cu^{+1}) em meio alcalino, e do Cu^{+1} interagir com o BCA formando um complexo estável, solúvel em água, de coloração púrpura com a intensidade da cor diretamente proporcional à concentração de proteínas. Em uma placa de 96 poços foram pipetados, em duplicata, 25 μL da curva padrão com BSA (do inglês, *bovine serum albumin*, proteína albumina do soro bovino) (1500, 1250, 750, 500, 250 e 125 mg/mL) e 25 μL de água destilada nos poços controles. Foi utilizado 5 μL do homogenato de tecido pulmonar em 20 μL de água destilada. Em seguida, foram adicionados em cada poço 200 μL da solução BCA (kit Sigma Aldrich) e solução de sulfato de Cobre (II), na proporção de 50:1. A placa foi mantida em estufa a 60 °C por 15 min. A análise espectrofotométrica foi realizada em leitor de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices) em comprimento de onda de 540 nm. A concentração de proteínas foi determinada através de cálculo realizado a partir da equação da reta obtida com a curva padrão de BSA.

5.9. Avaliação da atividade da mieloperoxidase

Amostras de pulmão foram homogeneizadas em 1 mL de solução de Hank's e centrifugados a 1950 xg por 10 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspendido em 0,5 mL de solução hipotônica de NaCl (0,2 %) (choque osmótico), em seguida, adicionado 0,5 mL de solução hipertônica de NaCl (1,6 %) e centrifugado a 1950 xg por 10 min a 4 °C. Ressuspendeu-se o precipitado em 1 mL de HTAB (brometo de cetildimetiletilamonônio) e centrifugou-se novamente a 1700 xg por 15 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 15300 xg por 15 min a 4 °C. Em uma placa de 96 poços foi adicionado 50 μL da amostra, 50 μL da solução de HTAB, 50 μL de orto-dianisidina (0,68 mg/ mL) e mantido a 37°C por 15 min. Finalmente, foi então acrescentado a cada poço 50 μL de H_2O_2 (0,006 %) protegido da luz. Após 10 min, a reação foi parada com adição de 50 μL de azida sódica (1 %). A análise foi feita por absorbância em leitora de placa SpectraMax M5 (Molecular Devices) em comprimento de onda de 460 nm e o resultado expresso em U (unidade enzimática) por mg de proteína, quantificada conforme item 5.8.(289).

5.10. Análise histopatológica semiquantitativa da inflamação no tecido pulmonar

Após a perfusão, o pulmão esquerdo foi fixado com paraformaldeído tamponado, incluídos em parafina, seccionados longitudinalmente em micrótomo com cortes de 4 μm de espessura e submetidos à coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E). Para tal, os cortes desparafinados e hidratado, e em seguida corados com hematoxilina por um 1 min. As amostras foram então lavadas em água corrente por 5 min, diferenciadas em álcool-ácido por 1 min, lavadas em água destilada por 3 min, mergulhadas em álcool 70% por 2 min, e em seguida, coradas com eosina por 2 min. Por fim, as lâminas foram mergulhadas em álcool 95% por 6 segundos, desidratadas, clarificadas e montadas. Em seguida os tecidos foram escaneados e analisados através do programa Panoramic Viewer. Esta coloração permitiu a análise de dano pulmonar, segundo os critérios de foco inflamatório (processo inflamatório localizado de forma difusa no parênquima pulmonar), infiltrado de células inflamatórias no espaço aéreo, congestão alveolar, espessura da parede alveolar, avaliando-se o dano pulmonar através de um sistema de classificação numérica (290) que varia de 0 a 4 (escore) para cada parâmetro (total= 16), de acordo com a Tabela 5.1.

| Classificação | Escore |
|-------------------------|--------|
| Sem dano | 0 |
| Dano leve | 1 |
| Dano moderado | 2 |
| Dano grave | 3 |
| Alterações muito graves | 4 |

Tabela 5.1. Critérios para análise semiquantitativa por escore.

5.11. Quantificação de citocinas no tecido pulmonar

Os níveis das citocinas IL-6, TNF- α , KC, MCP-1, MIP-1, MIP-2, RANTES e IL-10 foram quantificados no homogenato de tecido pulmonar através da técnica de ELISA. Para a quantificação desses mediadores o tecido pulmonar foi descongelado e homogeneizado, em gelo, em 1 mL de solução de PBS (1 x) contendo Triton X-100 (0,1 %) e inibidores de protease (Complete®, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça). Em seguida foram centrifugados a 13000

xg por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido e utilizado para avaliação das citocinas. Em placa de ELISA, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de captura diluído em tampão PBS 1 %, por um período de incubação de 18 h à temperatura ambiente para fixação. Na sequência, os poços foram lavados quatro vezes com tampão “*Coat Buffer*” (timerosal; KPO₄ 1M; e Tween 20 0,005 %) (290 µL/poço) e o bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS-BSA 1 % (250 µL/poço), permanecendo em contato com o anticorpo de captura durante 1 h em temperatura ambiente. Após esta incubação, outra lavagem foi realizada, seguida da adição das amostras e dos padrões diluídos em “*Assay Buffer*” 1 %. Após o período de incubação (*overnight*) a placa foi lavada com tampão “*Assay wash*” (timerosal; NaPO₄ 1M; KCl 2,7 M e Tween 20 0,005 %) (290 µL/ poço). Em seguida, adicionou-se o anticorpo de detecção (biotilnado) (100 µg/mL), permanecendo incubado por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi novamente lavada com o mesmo tampão, seguido pela fase de incubação durante 1 h à temperatura ambiente com a mistura estreptavidina diluída no tampão “*Assay Buffer*” 1 %. Após a última lavagem com tampão “*Assay Wash*” foi adicionado o substrato (K-blue ®) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (aproximadamente de 5 a 30 min), que foi interrompida, após a adição de H₂SO₄ (0,19 N). A análise espectrofotométrica foi realizada em leitor de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices) em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de citocina (pg) por mg de proteína, determinada conforme item 5.8.

5.12. Análises de estresse oxidativo

Os fragmentos do tecido pulmonar foram descongelados e homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (IKA T10 basic) em 500 µL de tampão fosfato de potássio + EDTA (KPE) (pH 7,5) e em seguida as amostras foram centrifugadas a 600 *xg* por 10 min, a 4 °C, o sobrenadante recolhido para as análises bioquímicas.

5.12.1. Medição dos níveis de malondialdeído

A concentração de malondialdeído (MDA) como biomarcador de peroxidação lipídica foi determinada pelo método TBARS (Substâncias Reativas ao Acido Tiobarbitúrico) descrito por Draper e cols. (291). Amostras de tecido pulmonar (100 µL) foram misturadas em 100 µL de

ácido tricloroacético a 10 % e centrifugadas por 15 min a 3600 g a 4 °C. Subsequentemente, o sobrenadante foi coletado e 150 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) foram adicionados. As amostras foram aquecidas em placa quente a seco a 95 °C durante 10 min. Os níveis de MDA foram determinados por absorvância em comprimento de onda de 532 nm (SpectraMax M5 - Molecular Devices) e expressos como nM/mg de proteína.

5.12.2. Quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase

O método utilizado para determinar a atividade de superóxido dismutase (SOD) foi descrito por Bannister e Calabrese (292). A determinação da atividade é feita através da inibição do produto de auto-peroxidação de adrenalina durante a auto-oxidação. Para a mensuração da atividade de SOD as amostras do tecido pulmonar foram dispostas em três volumes diferentes (1 µL, 2 µL e 3 µL). Depois foi adicionado 197 µL de tampão glicina (pH 10.2), 2 µL de catalase e 4 µL de epinefrina e a leitura foi feita imediatamente em espectrofotômetro (SpectraMax M5 – Molecular Devices) a 480 nm. Como controle, avaliamos a livre oxidação da epinefrina sem as amostras. Após a leitura, os valores foram expressos em U/mg proteína.

5.12.3. Quantificação da atividade da enzima Catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio em concentrações conhecidas, a partir do primeiro minuto de reação (1 min). Para esse ensaio, foi preparado uma mistura contendo 25 mL de água destilada e 40 µL de peróxido de hidrogênio. Posteriormente, foi adicionado 1 µL de amostra para 99 µL do mix. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro (SpectraMax M5 – Molecular Devices) em absorvância de 240 nm, utilizando-se placa UV. Os valores foram expressos por U/mg de proteína.

5.13. Western blotting

A análise molecular das proteínas foi realizada por *Western blotting*. Inicialmente, o tecido foi homogeneizado com em tampão RIPA (Tris – 6,25 mg/mL; NaCl – 8,76 mg/mL; EDTA – 0,37 mg/mL; Deoxicolato 0,01 mg/mL; SDS 1 mg/mL e Triton x-100 – 1:100 v/v) com os respectivos inibidores de proteases e fosfatases (1:100) (Thermo Scientific, EUA). Em

seguida, as amostras foram centrifugadas a 2700 *xg* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e foi feita a dosagem de proteínas totais pelo método de BCA conforme descrito no item 5.8. Adicionou-se o β -mercaptoetanol até uma concentração final de 5 % e depois os homogenatos foram desnaturados durante 5 min a 100 °C e mantidos a -20 °C até a corrida das amostras em gel. Para isso, quantidades iguais de proteína (40 μ g) foram separadas em gel SDS-PAGE (8 ou 12 %) em uma Cuba Bio-Rad e posteriormente eletrotransferidas através de um sistema de transferência semiúmida (Bio-Rad, Transblot SD, Hercules, CA, EUA) para uma membrana de nitrocelulose. Na sequência, a membrana de nitrocelulose foi incubada, sob agitação, com uma solução bloqueadora (5 % de albumina bovina com 0,1% Tween 20®) por no mínimo 1 h. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos para as proteínas-alvo p-ERK1/2 e ERK1/2 (diluição 1:1000; Cell Signalling), pp38 e p38 (diluição 1:1000; Cell Signalling), p-JNK e JNK (diluição 1:1000; Invitrogen) p-AKT e AKT(1:1000; Cell Signaling), Sirt-1 (1:5000; Cell Signaling), NFR2 (diluição 1:1000; Sigma-Aldrich) e Beta-actina (1:1000; Cell Signaling) durante a noite. A seguir, as membranas foram lavadas e incubadas por 1 h com anticorpo secundário (coelho, rato ou cabra) acoplado à enzima peroxidase e a detecção foi feita pelo método de quimioluminescência (ECL) com detecção em filmes de raio-X (Kodak, Perkin Elmer Life Sciences, EUA). Por fim, os filmes foram digitalizados e as bandas foram quantificadas através do programa *Image J* e os valores densitométricos obtidos para as proteínas fosforiladas e total dos tratamentos foram normalizados para os respectivos controles que não foram expostos ao LPS (barra de controle; 100 %). Os dados são apresentados como a razão entre a proteína fosforilada e a proteína total, ou pela beta-actina. A proteína beta-actina foi utilizada como proteína constitutiva.

5.14. Quantificação de resveratrol no tecido pulmonar

Para determinar os níveis de resveratrol no tecido pulmonar, foi realizada uma análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa em colaboração com o Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos (SNAF) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) conforme previamente descrito (284). Os animais foram submetidos ao pós-tratamento com resveratrol livre ou nanoformulado, 6 h após instilação com LPS. Após 24 h da indução da inflamação, os camundongos foram mortos por superdosagem de anestésico (pentobarbital de sódio, 500 mg/kg,

i.p.) e perfundidos com solução salina, os tecidos pulmonares foram rapidamente removidos e pesados. Em seguida, foi adicionado 3 mL de acetonitrila para extrair o resveratrol. Os homogeneizados foram centrifugados a 3000 $\times g$ por 10 min, o sobrenadante foi filtrado (0,45 μm ; Merck Millipore) e injetado (20 μL) no HPLC. O sistema consistia de um detector UV-Vis, uma bomba e um auto-injetor S200 (PerkinElmer), uma coluna de guarda e uma coluna Nova-Pak C18 (150 mm, 4,9 mm, 4 μm ; Waters). A fase móvel consistiu em acetonitrila/água (40:60, v/v) ajustada para um pH aparente de $3,0 \pm 0,5$ com 10 % (v/v) de ácido acético, com fluxo isocrático de 1.2 mL/min. O resveratrol foi detectado a 306 nm com um tempo de retenção de 3,45 min. O método de HPLC foi validado para considerar a linearidade, variabilidade inter e intra-dia, seletividade, exatidão, limite de quantificação e recuperação de acordo com ICH (International Conference on Harmonisation) (293). Curvas de calibração linear para resveratrol dissolvido em acetonitrila foram obtidas na faixa de 2,5 e 17,5 $\mu g/mL$, ($r > 0,9999$). O limite de quantificação foi de 2,00 $\mu g/mL$. A área sob o pico foi calculada usando integração numérica. A quantidade de resveratrol foi quantificada através da determinação da área sobre a curva e integração numérica deste valor com a curva padrão e expressa em μg do composto/grama de tecido.

5.14. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM) de pelo menos 5 animais por grupo. Após verificação da normalidade, a análise estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida por um teste *post hoc* de Newman-Keuls utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para ambos os testes.

6. Resultados

6.1. Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas

As nanocápsulas contendo resveratrol apresentaram coloração branca opalescente e um aspecto homogêneo, sem a formação de precipitado ou separação de fases (294). O diâmetro das partículas foi de 241 ± 7 nm, apresentando um índice de polidispersão de $0,16 \pm 0,03$ e distribuição monomodal sem a presença de populações. As formulações também apresentaram um potencial zeta negativo de $-14,1 \pm 2,3$ mV com pH de $5,2 \pm 0,3$, próximo à neutralidade. Resultados semelhantes foram observados para as formulações de NC-brancas. Os teores de resveratrol apresentados foram próximos aos valores teóricos (1 mg/ml), com uma elevada taxa de encapsulação de 99,8 %. Nas análises da estabilidade física observou-se uma insignificante variação da luz retroespalhada durante a análise ao longo da cubeta, demonstrando que as formulações não apresentam tendência a fenômenos de instabilidade físico-química como sedimentação das partículas, floculação ou coalescência. Os valores das características físico-química das formulações estão resumidos na Tabela 6.1 abaixo.

| Parâmetro | Resveratrol-NC | NC-brancas |
|-------------------------|-----------------------|--------------------|
| distribuição | monomodal | monomodal |
| diâmetro das partículas | 241 ± 7 nm | 238 ± 6 nm |
| polidispersão | $0,16 \pm 0,03$ | $0,14 \pm 0,01$ |
| potencial zeta | $-14,1 \pm 2,3$ mV | $-15,8 \pm 3,0$ mV |
| pH | $5,2 \pm 0,3$ | $5,4 \pm 0,4$ |
| taxa de encapsulação | $99,89 \pm 1,3\%$ | - |
| teor | 1 mg/ml | - |

Tabela 6.1. Valores da caracterização físico-química das formulações (resveratrol-NC e NC-brancas).

6.2. Protocolo de pré-tratamento

6.2.1. Análise da migração leucocitária em diferentes tempos

Para investigar a melhor condição para o tratamento de camundongos em nosso modelo, os animais receberam resveratrol livre ou resveratrol-NC (5 mg/kg) por via oral nos tempos de 1 h, 4 h, 6 h, 12 h ou 24 h antes do estímulo com LPS. Vinte e quatro horas após o estímulo com LPS, foi realizada a avaliação da migração de leucócitos totais para o fluido broncoalveolar que revelou um aumento expressivo do número de leucócitos totais no fluido broncoalveolar, o qual não foi alterado no pré-tratamento com resveratrol livre em todos os tempos avaliados (Figura 6.1). Por outro lado, o pré-tratamento com o resveratrol-NC reduziu o acúmulo de leucócitos no fluido broncoalveolar nos tempos de 1, 4, 6 ou 12 h antes do estímulo com LPS. O tratamento com NC-brancas, em volume equivalente à dose de 5 mg/kg, não alterou o influxo de leucócitos estimulados pelo LPS. Com esses resultados, estabelecemos o pré-tratamento de 4 h como o padrão para os ensaios seguintes.

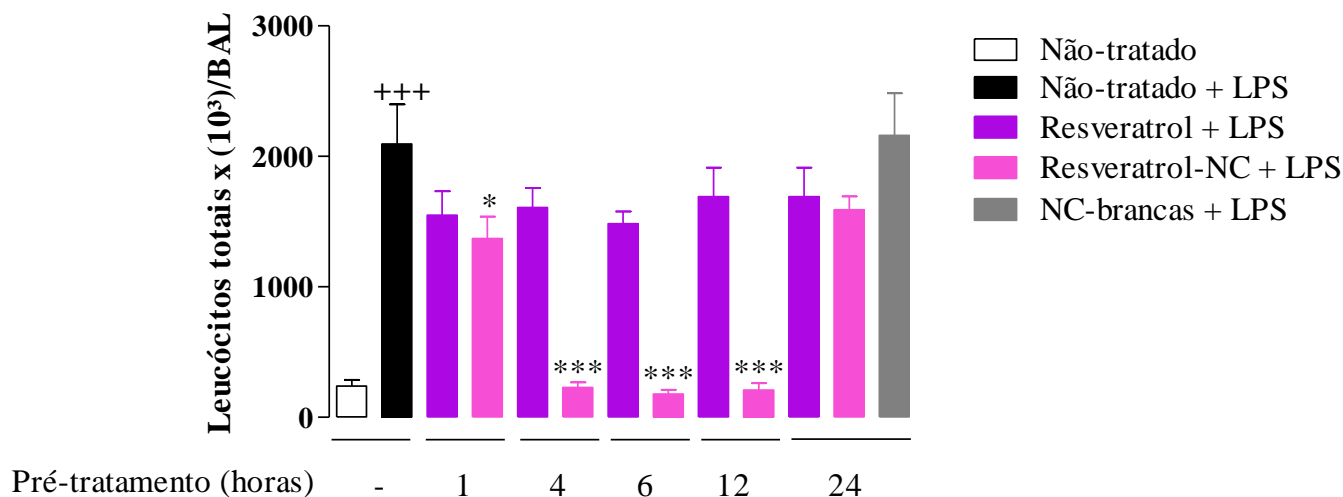


Figura 6.1. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC na migração leucocitária para os pulmões em diferentes tempos. Os animais foram pré-tratados por via oral com resveratrol (5 mg/kg), resveratrol-NC (5 mg/kg) ou NC-brancas nos tempos de 1, 4, 6, 12 ou 24 h antes da instilação com LPS (25 µg/ 25 µL). Os leucócitos presentes na cavidade broncoalveolar foram recuperados pelo método de LBA 24 h após. Os dados são expressos como a média ± erro padrão

da média (EPM) (n = 5–7, por grupo). +++ P <0,001 comparado com o grupo não-tratado (salina); * P < 0,05 e *** P <0,001 comparado ao grupo LPS não-tratado.

6.2.2. Avaliação da hiper-reatividade das vias aéreas

Para medir as alterações da hiper-responsividade das vias aéreas, avaliamos a elastância pulmonar após uso do broncoconstritor metacolina. Como mostrado na Figura 6.2, os camundongos estimulados com LPS tiveram um aumento da hiper-reatividade das vias aéreas em comparação com o controle negativo que recebeu apenas salina. Camundongos pré-tratados com resveratrol livre nas doses de 2,5 e 5 mg/kg não apresentaram alteração na exacerbação da reatividade das vias aéreas, apenas a maior dose de 10 mg/kg reduziu, significativamente, quando comparado com o grupo LPS. Por outro lado, o resveratrol-NC, em todas as doses, melhorou significativamente a hiper-responsividade das vias aéreas em comparação ao grupo LPS não-tratado. A droga de referência, dexametasona (5 mg/kg), também inibiu a resposta exacerbada à metacolina. Nenhuma mudança foi observada em camundongos tratados as NC-brancas quando comparado ao grupo LPS não-tratado.

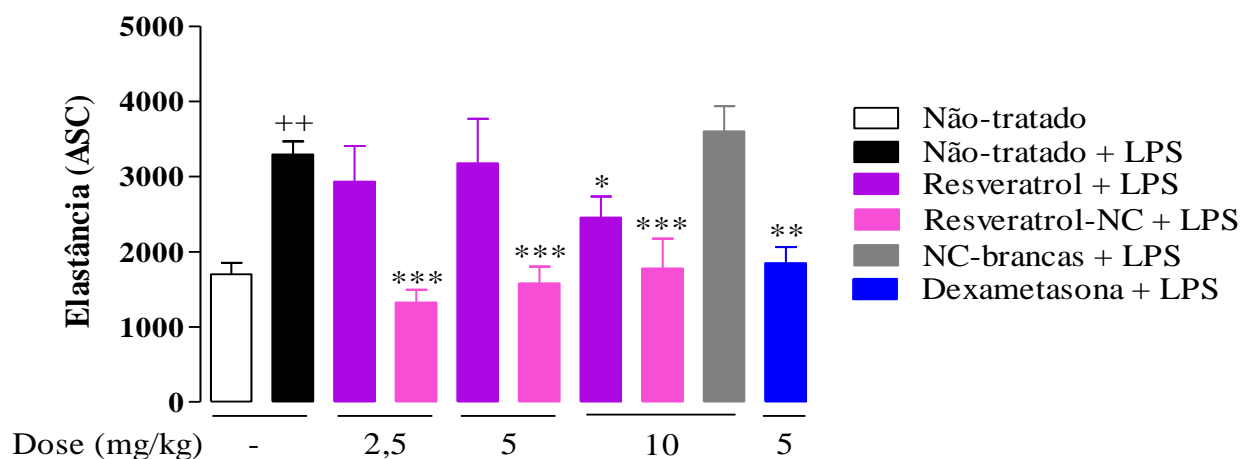


Figura 6.2. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC na hiper-responsividade das vias aéreas. Camundongos A/J foram pré-tratados por via oral com NC-brancas, dexametasona (5 mg/kg), resveratrol livre ou resveratrol-NC (2,5, 5 ou 10 mg/kg). Após 4 h, os camundongos foram instilados por via intranasal com LPS (25 µg/25 µL) ou solução salina. A hiper-responsividade das vias aéreas foi medida por alterações na elastância pulmonar induzidas por metacolina 24 h após a instilação de LPS. Os dados são expressos como a média ± EPM (n = 5–7, por grupo). ++ P <0,01 comparado com o grupo salina não-tratado; * P <0,05, ** P <0,01 e

*** P <0,001 comparado ao grupo LPS não-tratado; ASC, área sob a curva obtida a partir dos valores médios da exposição à metacolina nas concentrações de 3, 9 e 27 mg/mL.

6.2.3. Quantificação do influxo leucocitário para o pulmão

Como apresentado na Figura 6.3A, o resveratrol-NC preveniu o acúmulo de leucócitos totais induzidos por LPS no fluido broncoalveolar quando administrado pela via oral nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg. Este infiltrado inflamatório foi marcadamente dominado por neutrófilos, como mostrado pelas análises de células diferenciais e pela atividade da enzima mieloperoxidase em amostras de tecido pulmonar, os quais apresentam níveis basais após o tratamento com resveratrol-NC (Figura 6.3B e C, respectivamente). Em contraste, o resveratrol livre ou as NC-brancas, não preveniram as alterações celulares induzidas por LPS em todos os parâmetros avaliados. Por outro lado, o composto de referência, dexametasona (5 mg/kg, via oral) inibiu as alterações causadas pelo estímulo com LPS.

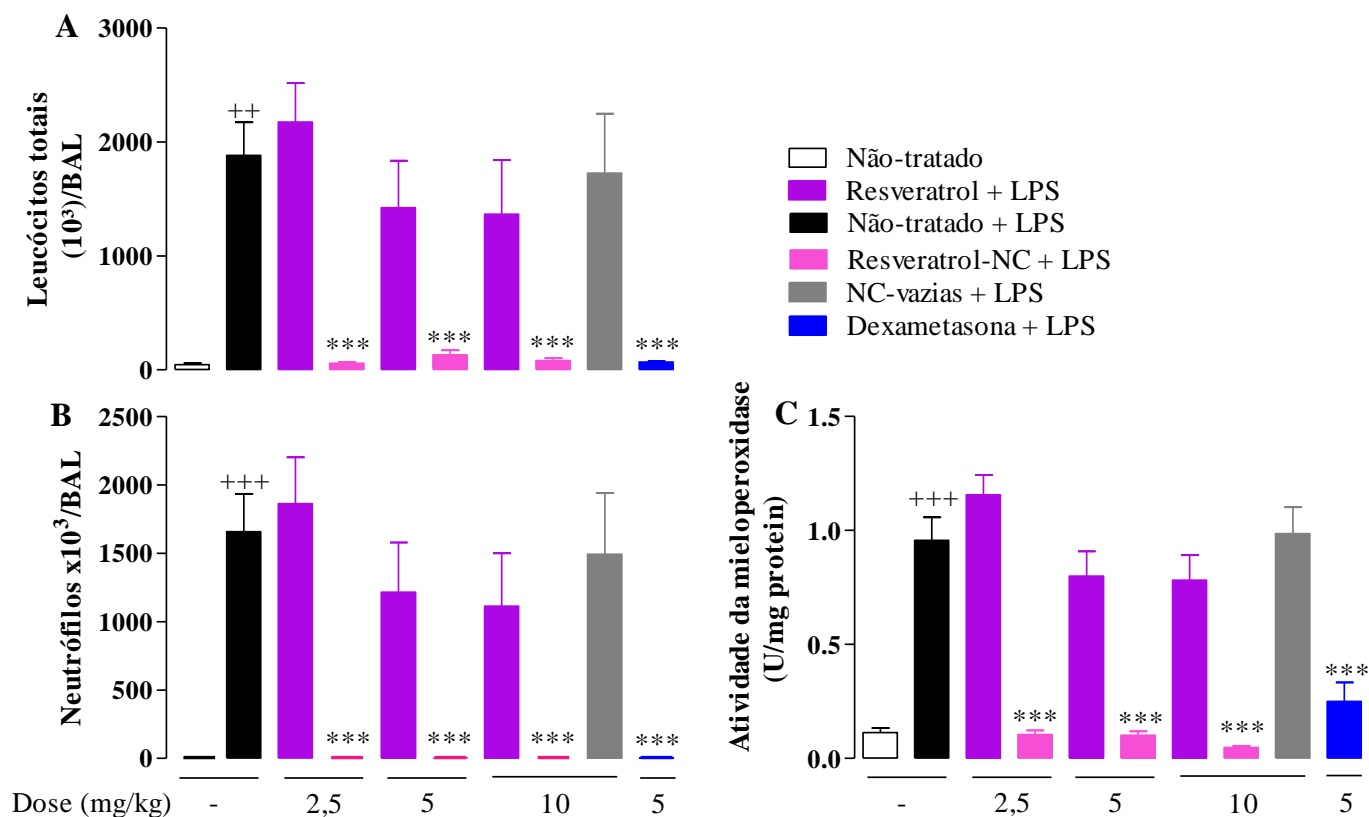


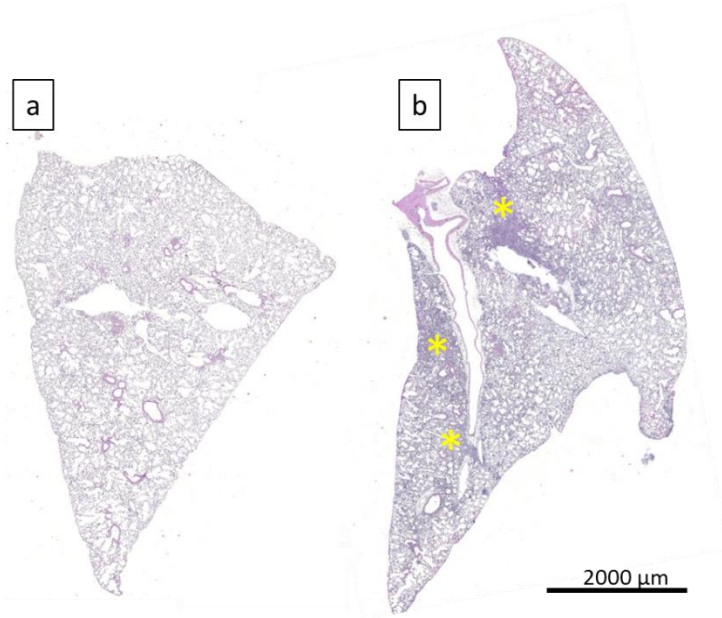
Figura 6.3. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC na migração de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar e atividade da MPO. (A) leucócitos totais, (B) neutrófilos e (C) atividade da mieloperoxidase. Os animais foram pré-tratados por via oral com NC-brancas, dexametasona (5 mg/kg), resveratrol livre ou resveratrol-NC nas doses de 2,5, 5 ou 10 mg/kg, 4 h antes do desafio com LPS (25 µg/25 µL) ou salina, intranasalmente. As células foram coletadas por lavado broncoalveolar e os pulmões foram perfundidos para avaliar a atividade da mieloperoxidase 24 h após a provocação com LPS. Os dados são expressos como a média ± EPM (n = 5–7, por grupo). ++ P <0,01 e +++ P <0,001 comparado com o grupo que recebeu apenas salina; *** P <0,001 comparado ao grupo LPS não-tratado.

6.2.4. Análise histopatológica

Em adição ao perfil de migração leucocitária, avaliamos as características patológicas associadas à lesão pulmonar induzida por LPS em cortes histológicos corados com H&E, usando um sistema de pontuação semiquantitativa (escore). Como representado na Figura 6.4 A-a, o pulmão de um animal normal não apresenta dano tecidual. Ao contrário, o pulmão endotoxêmico

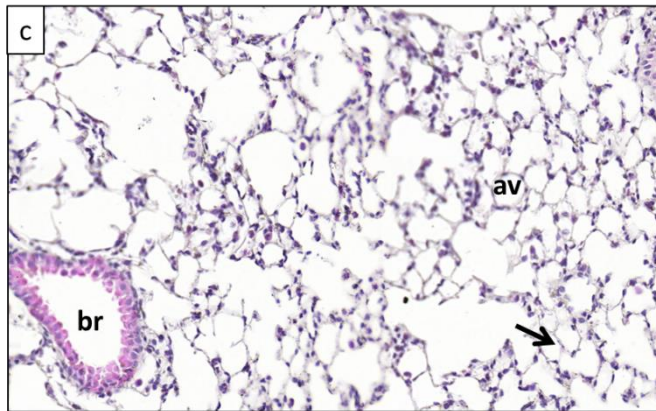
apresenta focos inflamatórios difusos (Figura 6.4 A-b). A quantidade de focos inflamatórios foi pontuada na avaliação (1 ponto por foco). Em maior detalhe do foco inflamatório podemos observar a migração celular nas vias aéreas (bronquíolos), congestão alveolar e espessamento dos septos alveolares e ausência desses parâmetros no animal saudável (Figura 6.4 A-d e -c, respectivamente). Cada um desses parâmetros foi avaliado numericamente, seguindo o critério da tabela 5.1. A análise foi realizada por avaliação duplo-cega. De acordo com esses critérios, o LPS causou alterações patológicas pulmonares extensas, em comparação com camundongos saudáveis (Figura 6.4B -b e -a, respectivamente), as quais foram completamente prevenidas nos camundongos pré-tratados por via oral com resveratrol-NC (2,5, 5 ou 10 mg/kg) (Figura 6.4B -d, -f e -h, respectivamente), enquanto nenhuma melhora significativa foi observada no tratamento com resveratrol livre (2,5, 5 ou 10 mg/kg) (Figura 6.4B -c, -e e -g, respectivamente) ou com as NC-brancas (Figura 6.4B -i). O tratamento prévio com dexametasona (5 mg/kg, via oral) também reverteu, claramente, as alterações patológicas avaliadas (Figura 6.4B -j). O escore do dano pulmonar está representado graficamente na Figura 6.4C.

A

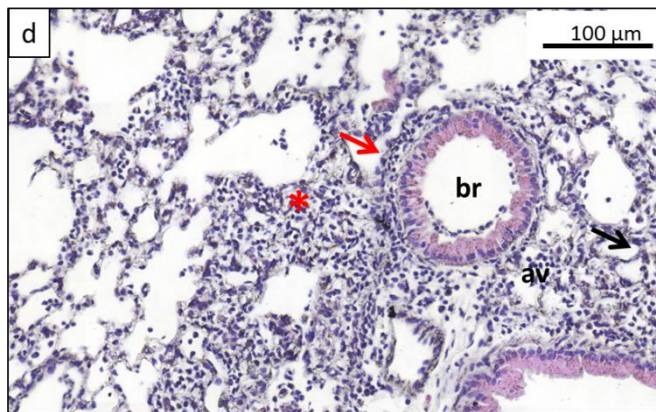


Salina

+ LPS não-tratado



Salina



+ LPS não-tratado

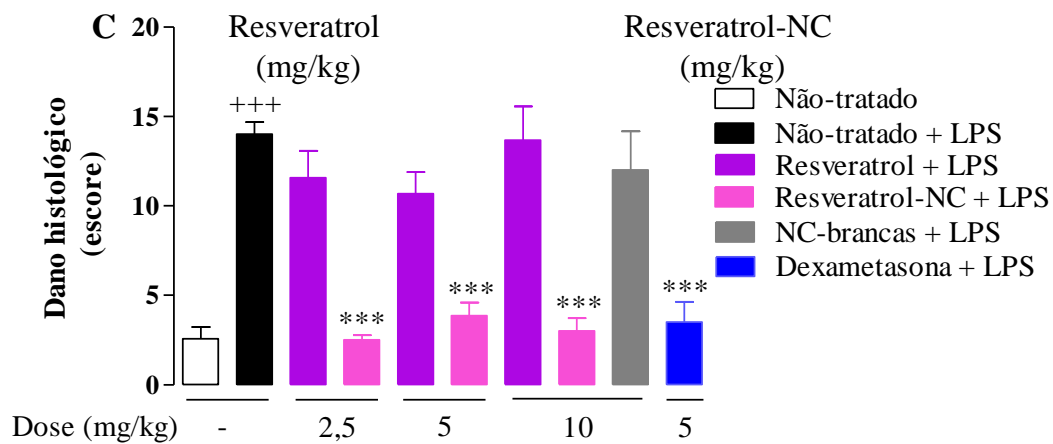
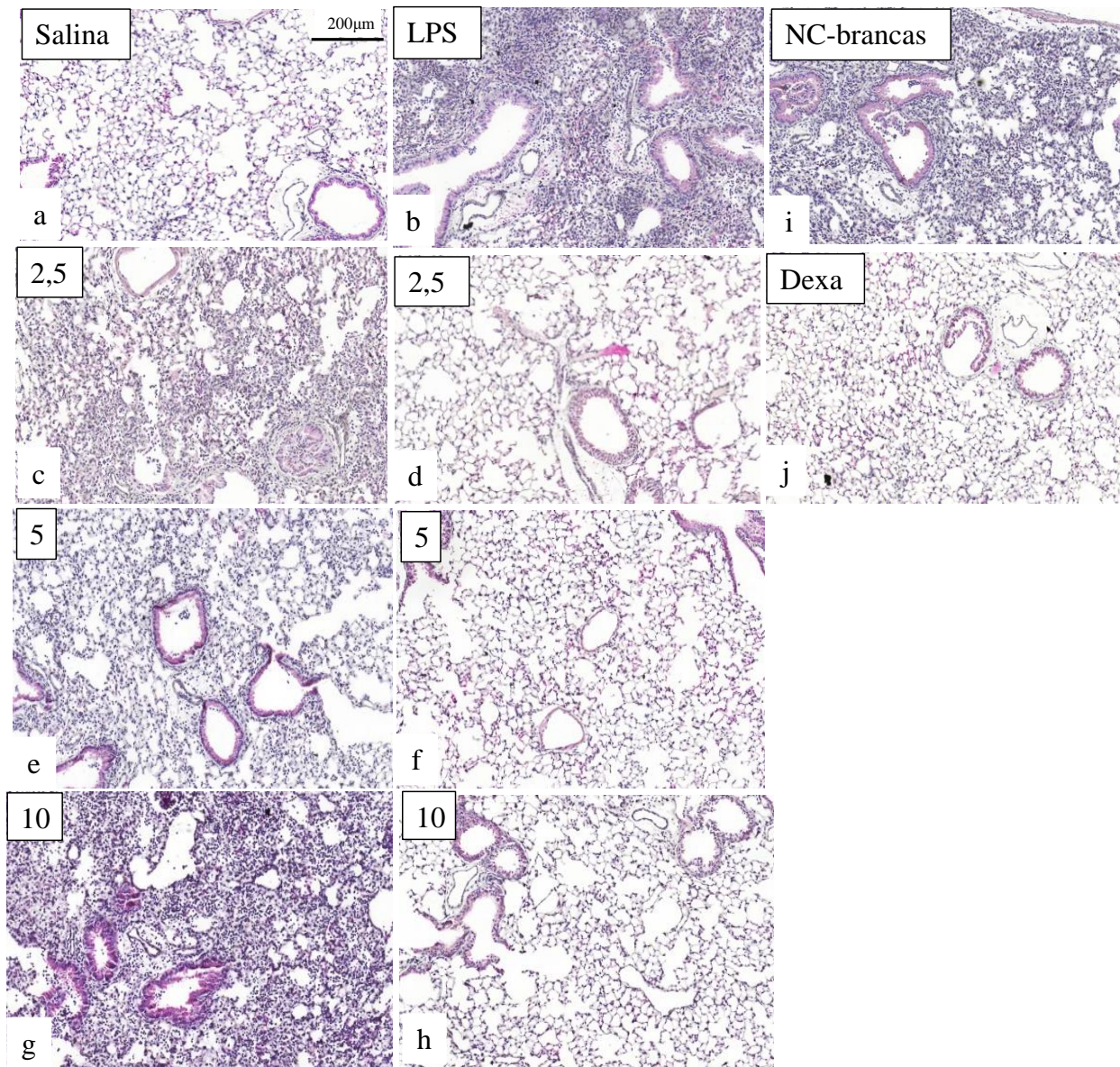


Figura 6.4. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC no dano histológico pulmonar. Os animais foram pré-tratados por via oral com NC-brancas, dexametasona (Dexta) (5 mg/kg), resveratrol ou resveratrol-NC nas doses de 2,5, 5 ou 10 mg/kg e 4 h após, desafiados com LPS

(25 µg/25 µL) ou solução salina pela via intranasal. Cortes seriados do tecido pulmonar foram incluídos em parafina por métodos de rotina e corados com H&E. (A e B) Imagens microscópicas representativas de cortes de tecido pulmonar corados. (C) Análise histológica da inflamação pulmonar por um sistema de pontuação semiquantitativo. * = foco inflamatório; * = congestão alveolar; migração celular nas vias aéreas; espessamento de septo alveolar; br = bronquíolos. Os dados são expressos como a média ± EPM (n = 5–7, por grupo). +++ P <0,001 comparado com o grupo salina e *** P <0,001 comparado ao grupo LPS não-tratado.

6.2.5. Avaliação dos níveis de citocinas no tecido pulmonar

Após 24 h de estímulo com LPS, como demonstrado na Figura 6.5, houve o aumento significativo das citocinas IL-6, TNF- α , KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-2 e RANTES (Figura 6.5A-G, respectivamente), as quais foram inibidas pelo tratamento com resveratrol-NC nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg (com exceção da dose de 5 mg/kg para citocina TNF- α). O tratamento com o resveratrol livre (2,5-10 mg/kg) ou NC-brancas não alterou os níveis pulmonares das citocinas, exceto a dose de resveratrol livre 2,5 mg/kg para citocina TNF- α . O pré-tratamento com a dexametasona (5 mg/kg) reduziu os níveis de todas as citocinas pró-inflamatórias avaliadas. O nível reduzido da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 6.5H), após estímulo com LPS, foi reestabelecido apenas nos animais tratados com dexametasona.

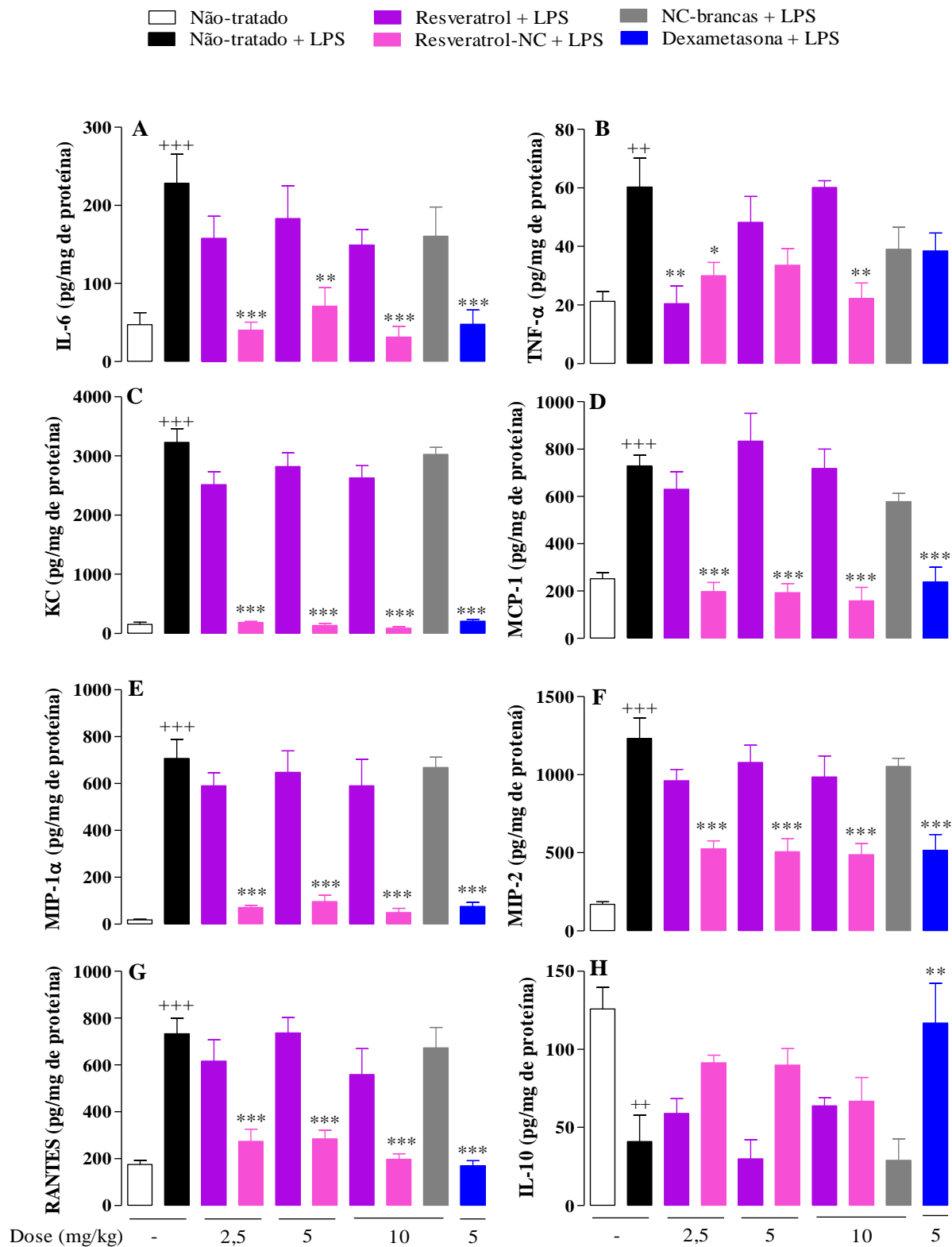


Figura 6.5. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC nos níveis de citocinas no tecido pulmonar. (A) IL-6, (B) TNF- α , (C) KC, (D) MCP-1, (E) MIP-1 α , (F) MIP-2, (G) RANTES e (H) IL-10. Os animais foram pré-tratados por via oral com NC-brancas, dexametasona (5 mg/kg), resveratrol livre ou resveratrol-NC nas doses de 2,5, 5 ou 10 mg/kg, 4 h antes do desafio com

LPS (25 µg/25 µL) ou salina, intranasalmente. Os pulmões foram perfundidos e coletados para medir os níveis das citocinas. Os dados são expressos como a média ± EPM (n = 5–7, por grupo). + P <0,05; ++ P <0,01 e +++ P <0,001 comparado com o grupo que recebeu apenas salina. * P <0,05; ** P <0,01 e *** P <0,001 comparado ao grupo LPS não-tratado.

6.2.6. Análise do estresse oxidativo

Optamos por dar continuidade ao estudo utilizando a dose 5 mg/kg, visto que as três doses avaliadas apresentam o mesmo perfil de resposta. Como demonstrado na Figura 6.6, a instilação intranasal com LPS desencadeou o aumento dos níveis de MDA no tecido pulmonar e da atividade da enzima SOD (Figura 6.6A e B, respectivamente). O pré-tratamento com o resveratrol livre não preveniu o aumento dos níveis MDA, assim como não preveniu a atividade da enzima SOD. Por outro lado, o resveratrol-NC apresentou um efeito significativo na redução destes parâmetros quando comparados ao grupo LPS não-tratado.

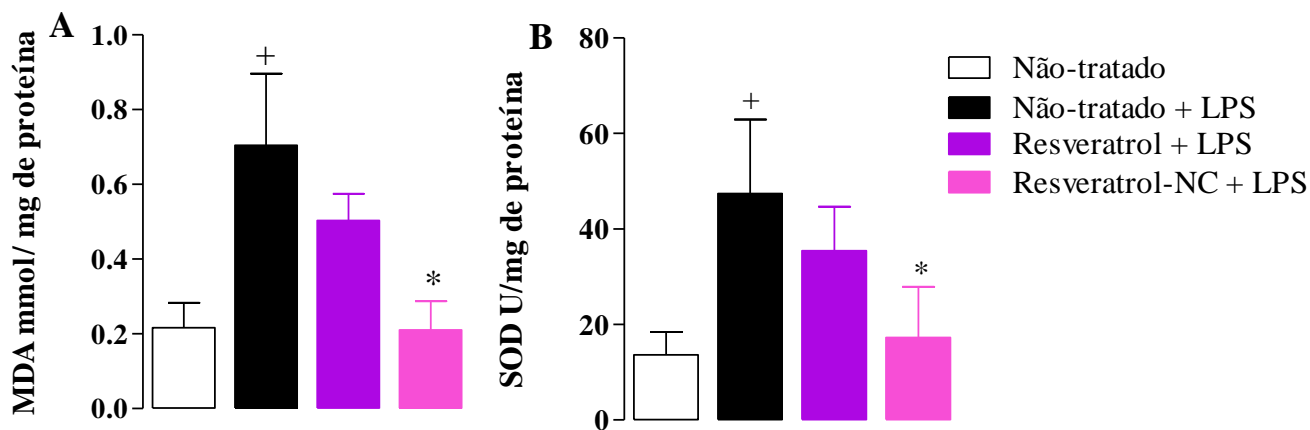


Figura 6.6. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC no estresse oxidativo. Os animais foram pré-tratados por via oral resveratrol livre ou resveratrol-NC na dose de 5 mg/kg e, 4 h após, desafiados com LPS (25 µg/25 µL) ou solução salina pela via intranasal. Amostras pulmonares foram coletados para medir os níveis de malondialdeído (MDA) da atividade da superóxido dismutase (SOD). Os dados são expressos como a média ± EPM (n = 4–7, por grupo). + P <0,05 comparado com o grupo que recebeu apenas salina e * P <0,05 comparado ao grupo LPS não-tratado.

6.2.7. Avaliação dos mecanismos de sinalização

A análise das proteínas investigadas pela técnica de *western blotting* revelou um aumento significativo nos níveis de fosforilação das proteínas próinflamatórias Akt e ERK (Figura 6.7A e C, respectivamente) 24 h após provocação com LPS. Apenas o tratamento com resveratrol-NC (5 mg/kg) foi capaz de inibir a fosforilação de ambas proteínas comparado ao grupo LPS não-tratado, enquanto nenhuma alteração foi observada no tratamento com resveratrol livre. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de fosforilação das proteínas p38 e JNK, bem como não houve diferença significativa na expressão da proteína SIRT1 entre os grupos estudados neste estudo (Figura 6.7 E, G e I, respectivamente). A quantificação densitométrica das proteínas, bem como imagens representativas das bandas estão representadas na figura abaixo (Figura 6.7 B, D, F, H e J)

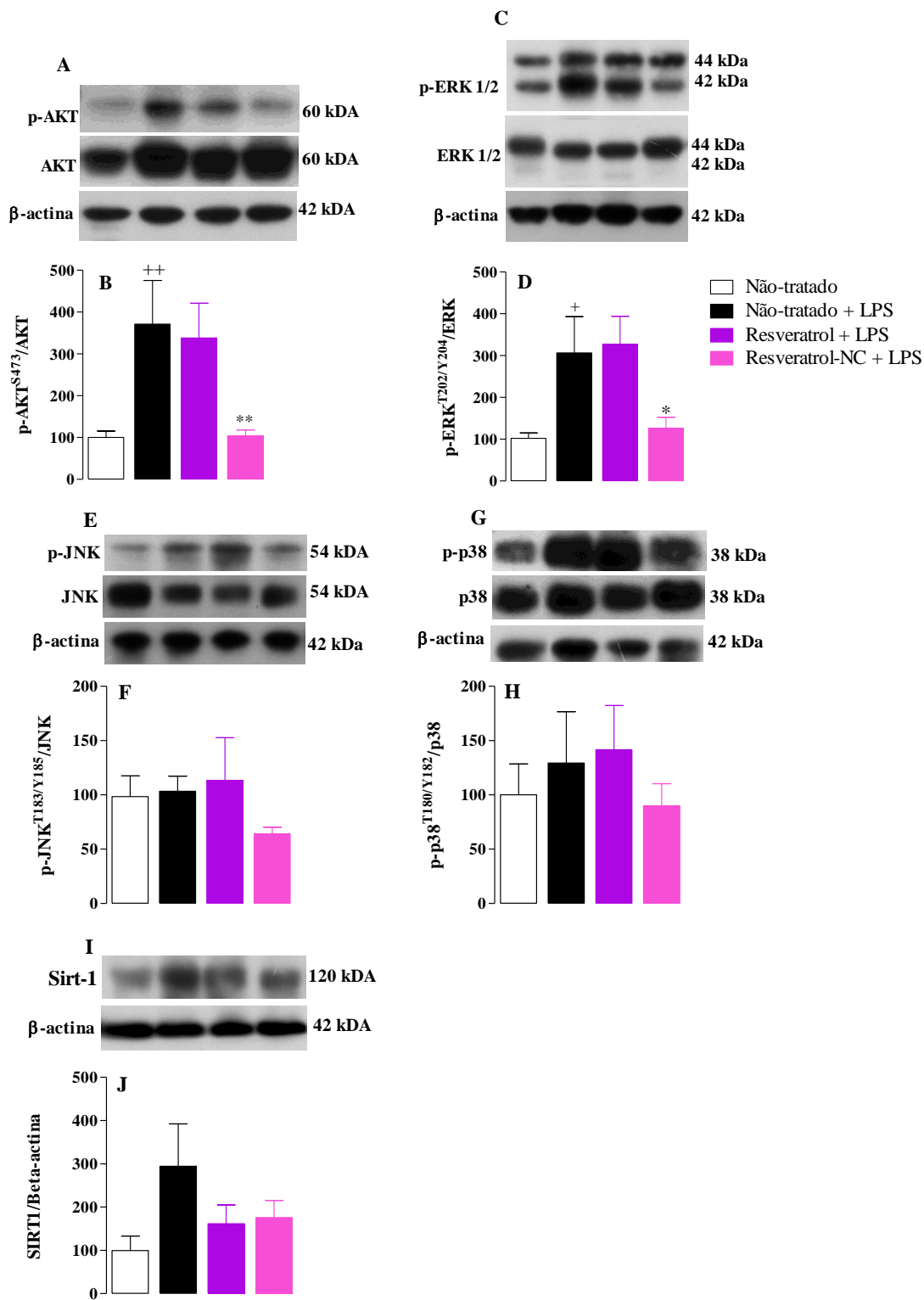


Figura 6.7. Efeito do pré-tratamento com resveratrol-NC na sinalização molecular. Os animais foram pré-tratados com resveratrol ou resveratrol-NC (5 mg/kg) 4 h antes do desafio com LPS. Os pulmões foram coletados para analisar a expressão proteica 24 h após a instilação de LPS. Imagens representativas de *Western blotting* dos níveis de fosforilação de (A) Akt, (C) ERK /2, (E) p38 e (G) JNK e expressão de (I) SIRT1. Os valores densitométricos obtidos para as proteínas fosforiladas e total dos tratamentos foram normalizados para os respectivos controles que não foram expostos ao LPS (barra de controle; 100 %). Os dados são expressos como uma

razão das percentagens normalizadas de proteína fosforilada e total ou da proteína por beta-actina. Barras representam a média \pm EPM (n = 5–7, por grupo). + P <0,05 e ++ P <0,01 em comparação com o grupo salina; * P <0,05 e ** P <0,01 em comparação ao grupo LPS não-tratado.

6.3. Protocolo de pós-tratamento

6.3.1. Avaliação da hiper-reatividade pulmonar e infiltração leucocitária

Avaliamos o efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC administrado após seis horas com LPS. Vinte quatro horas após a instilação de LPS, observamos o aumento da hiper-responsividade das vias aéreas no parâmetro de elastância pulmonar foi reduzido apenas após o tratamento com resveratrol-NC, sem alterações no grupo tratado com o resveratrol livre (Figura 6.8A). Em paralelo, o aumento do influxo de leucócitos totais para o fluido broncoalveolar, foi completamente suprimido após o tratamento com resveratrol-NC (5 mg/kg) (Figura 6.8B). A resposta leucocitária, marcada pela presença majoritária de neutrófilos no fluido broncoalveolar e no tecido pulmonar, demonstrado pelo aumento da atividade da enzima MPO, foram ambas completamente inibidas após o tratamento com resveratrol-NC, sem alterações significativas nos animais tratados com resveratrol livre (Figura 6.8C e D, respectivamente). O tratamento com as NC-brancas não apresentou efeito nos parâmetros avaliados. Por outro lado, a dexametasona inibiu a hiper-responsividade e a resposta leucocitária induzida pelo LPS.

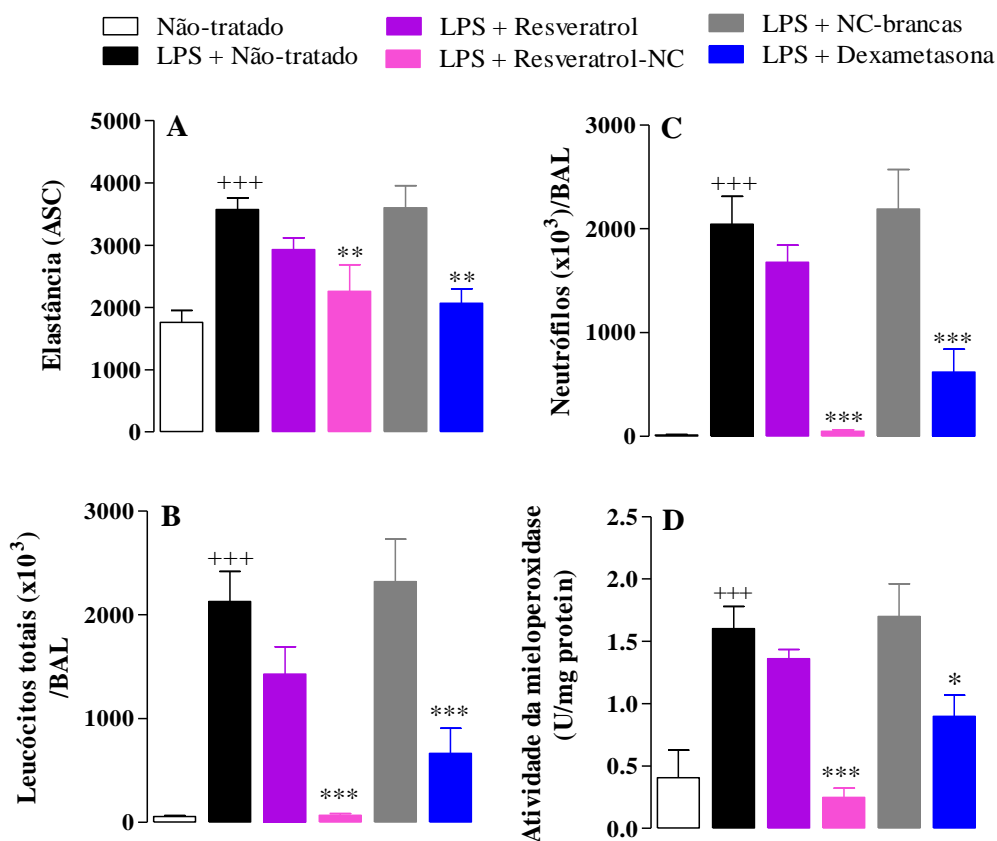


Figura 6.8. Efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC na hiper-reatividade pulmonar, migração leucocitária e atividade de MPO. (A) Hiper-responsividade das vias aéreas, (B) células totais, (C) neutrófilos e (D) atividade da mieloperoxidase. Os animais foram tratados por via oral com NC-brancas, dexametasona, resveratrol ou resveratrol-NC (5 mg/kg), 6 h após exposição intranasal com LPS (25 µg/25 µL) ou salina. Após 24 h, a hiper-responsividade das vias aéreas foi medida por alterações na elastância pulmonar após a aerossolização com metacolina, seguido da contagem das células do lavado broncoalveolar e da avaliação da atividade da mieloperoxidase. Os dados são expressos como a média ± EPM (n = 5–7, por grupo). +++ P <0,01 comparado com o grupo salina; * P <0,05, ** P <0,01 e *** P <0,001 em comparação com o grupo LPS não-tratado; ASC = área sob a curva obtida a partir dos valores médios da exposição à metacolina nas concentrações de 3, 9 e 27 mg/mL.

6.3.2. Análise histopatológica

A avaliação semiquantitativa dos danos teciduais, realizada como descrito anteriormente, revelaram um intenso infiltrado inflamatório, espessamento da parede alveolar e hemorragia alveolar nos animais estimulados com LPS comparado com os animais saudáveis (6.9B e A, respectivamente). Neste cenário, o pós-tratamento com resveratrol livre (5 mg/kg) ou NC-brancas não inibiu as alterações histológicas induzidas pelo LPS (6.9C e E, respectivamente). Em contrapartida, o pós-tratamento com o resveratrol-NC ou dexametasona, na mesma dose, reduziu claramente os danos estruturais no pulmão, segundo os critérios avaliados (6.9D e F, respectivamente). O escore do dano pulmonar está representado graficamente no Figura 6.9G.

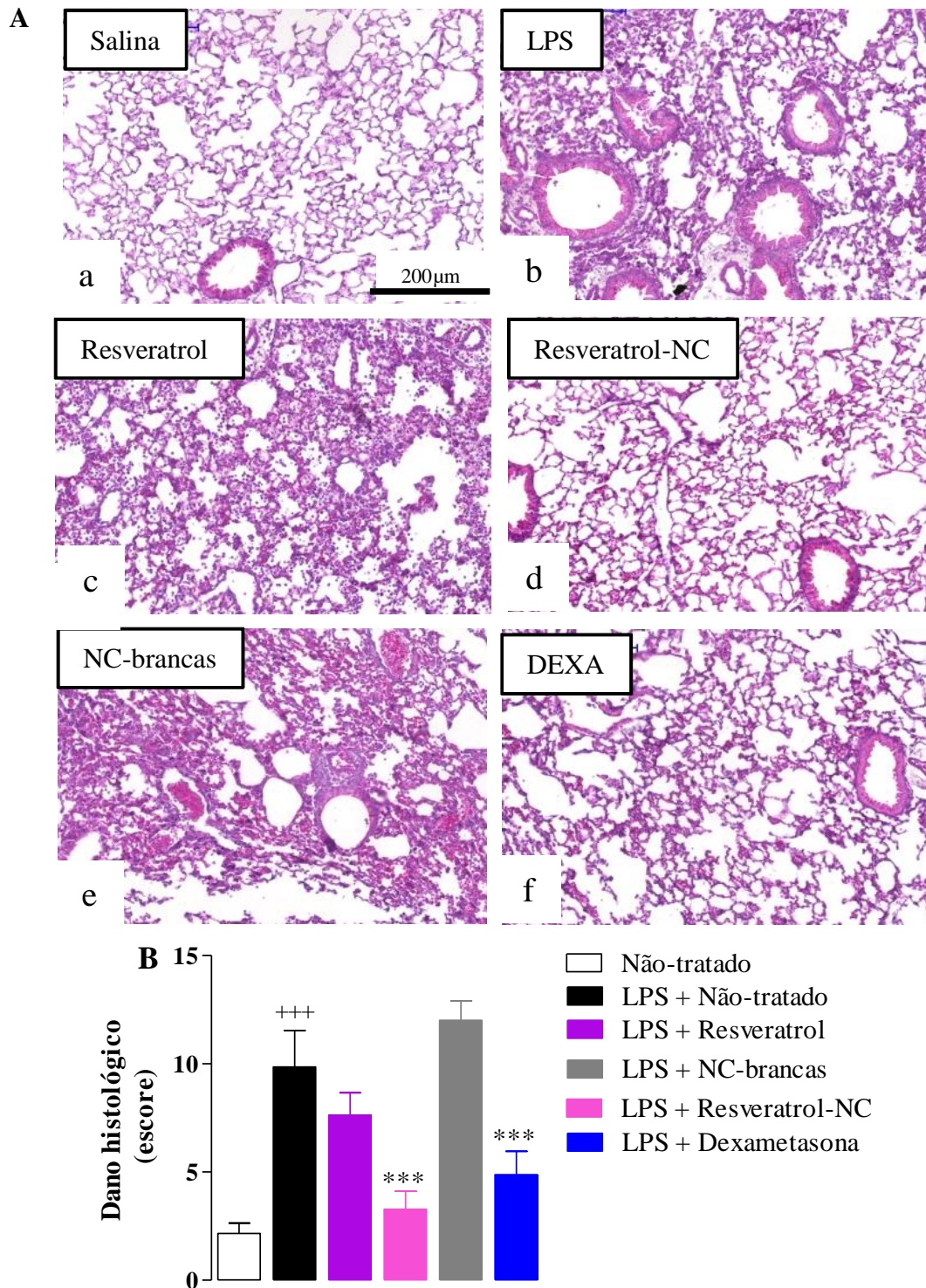


Figura 6.9. Efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC no dano tecidual. Os animais foram tratados por via oral com NC-brancas, dexametasona (5 mg/kg), resveratrol livre (5 mg/kg) ou resveratrol-NC (5 mg/kg), seis h após exposição intranasal com LPS (25 µg/25 µL) ou salina. Após 24 h do estímulo com LPS, cortes seriados de amostras pulmonar foram incluídos em parafina por métodos de rotina e corados com H&E. (A-F) Imagens representativas da análise microscópica de cortes de tecido corados. (G) Análise semiquantitativa do dano por escore

expressos como a média \pm EPM (n = 5–7, por grupo). +++ P <0,001 comparado com o grupo que recebeu apenas salina; *** P > 0,001 em comparação com o grupo LPS não-tratado.

6.3.3. Avaliação dos níveis de citocinas no tecido pulmonar

O aumento significativo dos níveis teciduais das citocinas pró-inflamatórias, relacionadas à resposta de LPS, IL-6, TNF- α , KC, MCP-1, MIP-1- α , MIP-2 e RANTES (Figura 6.10A-G, respectivamente) foi, notoriamente, reduzido após o pós-tratamento com resveratrol-NC (5 mg/kg), mas não com resveratrol livre na mesma dose. As NC-brancas não apresentaram efeito na redução dos níveis das citocinas mensuradas. Em contrapartida, a droga de referência dexametasona (5 mg/kg) reduziu os níveis desses mediadores. Nesse ensaio, os níveis teciduais da citocina anti-inflamatória IL-10 não foram estatisticamente diferentes entre os grupos (Figura 6.10H).

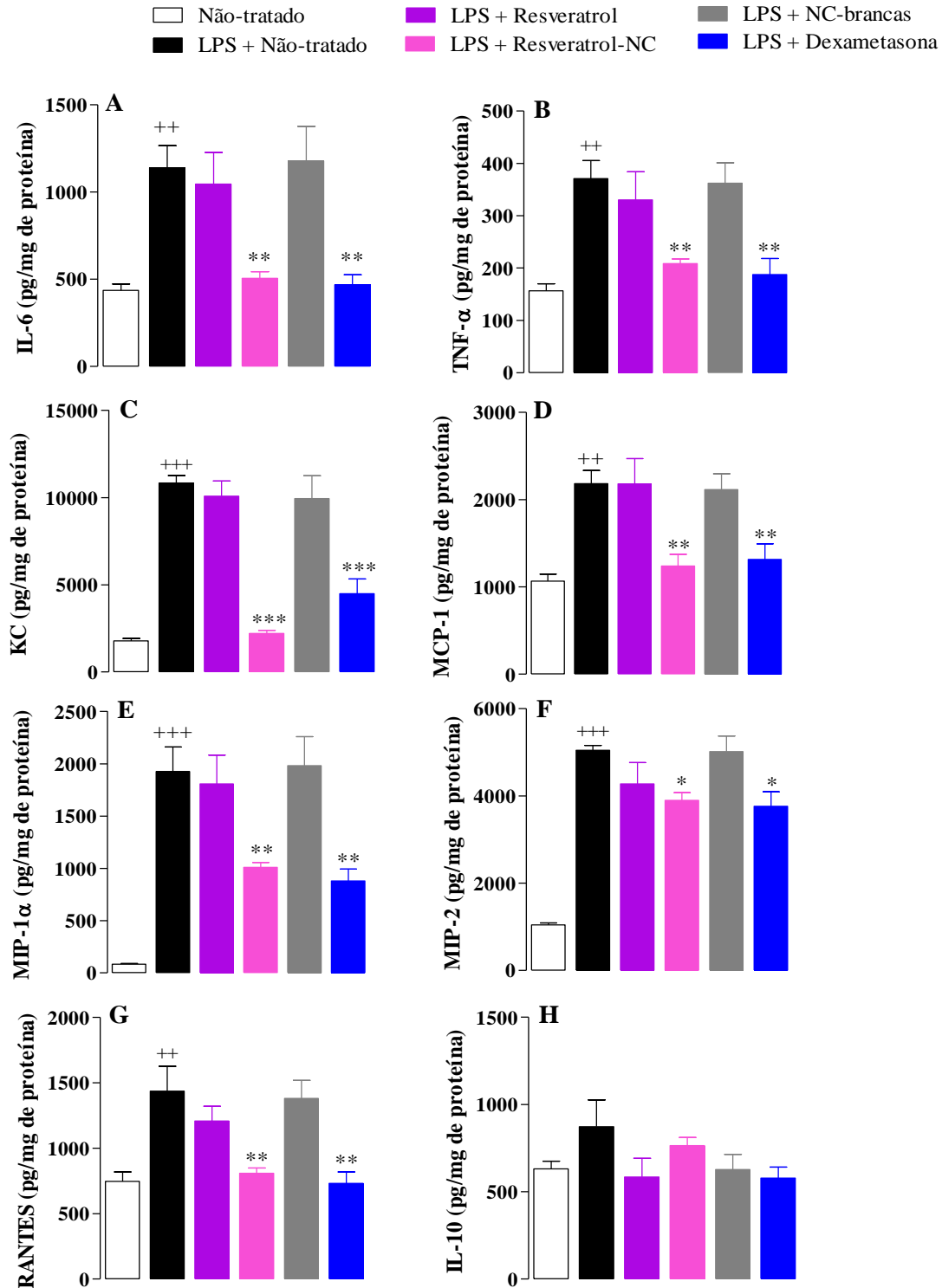


Figura 6.10. Efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC nos níveis de citocinas teciduais. Os animais tratados por via oral com NC-brancas, dexametasona, resveratrol ou resveratrol-NC (5 mg/kg) 6 h após o estímulo com LPS (25 μ g/25 μ L) ou salina. Amostras pulmonares foram utilizadas para medir os níveis das citocinas (A) IL-6, (B) TNF- α , (C) KC, (D) MCP-1, (E) MIP-

1 α , (F) MIP-2, (G) RANTES e (H) IL-10. Os dados são expressos como a média \pm EPM (n = 5–7, por grupo). ++ P <0,01; +++ P <0,001 comparado com o grupo salina; * P <0,05; ** P > 0,01 e *** P > 0,001 em comparação ao grupo LPS não-tratado.

6.3.4. Análise do estresse oxidativo

O processo inflamatório desencadeado pelo LPS levou ao aumento dos níveis do biomarcador de peroxidação lipídica, MDA, e inibiu a atividade da enzima catalase no tecido pulmonar, significativamente, quando comparado ao do grupo salina não tratado (Figura 6.11A e B, respectivamente). Essa resposta foi revertida pelo pós-tratamento com ambos, resveratrol livre ou resveratrol-NC (5 mg/kg).

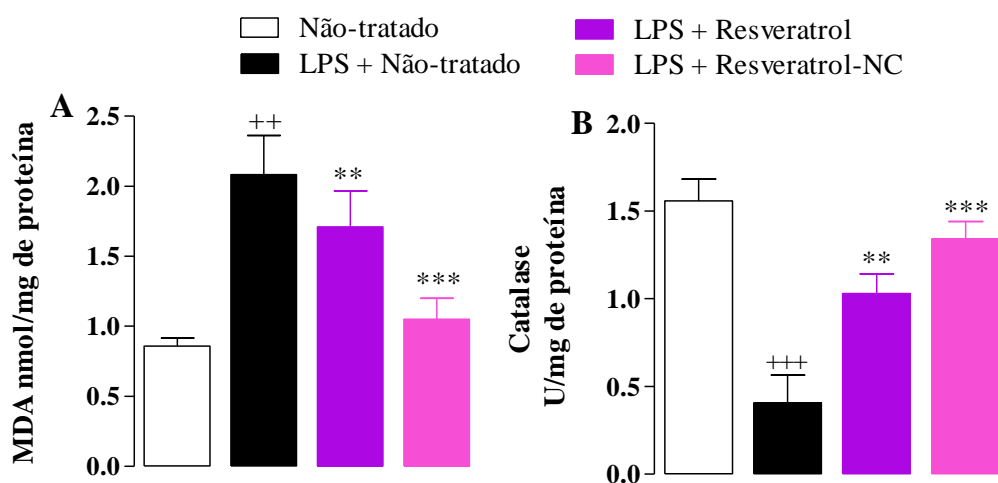


Figura 6.11. Efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC no estresse oxidativo. Os animais foram instilados com LPS (via intranasal) e, após 6 h, foram realizados os tratamentos por via oral com resveratrol livre ou resveratrol-NC (5 mg/kg). Os pulmões foram coletados para medir os níveis de MDA e a atividade da catalase 24 h após a instilação com LPS. Os dados são expressos como a média \pm EPM (n = 5-7, por grupo) LPS. ++ P <0,01 e +++ P <0,001 comparado com salina; ** P <0,01 *** e P <0,001, comparado ao grupo LPS não-tratado.

6.3.5. Avaliação dos mecanismos de sinalização

O aumento dos níveis de fosforilação das proteínas Akt, ERK e p38 induzido pelo LPS foi reduzido após o pós-tratamento com o resveratrol-NC, mas não com o resveratrol livre, na dose de 5 mg/kg (Figura 6.12A, C e E, respectivamente). O estímulo com LPS também reduziu a expressão do fator de transcrição, NRF2, a qual foi recuperada quando os animais foram pós-tratados com o resveratrol-NC (5 mg/kg), porém nenhuma alteração foi observada após o tratamento com resveratrol na mesma dose (Figura 6.12G). A quantificação densitométrica das proteínas estão representadas nos gráficos (Figura 6.12B, D, F e H).

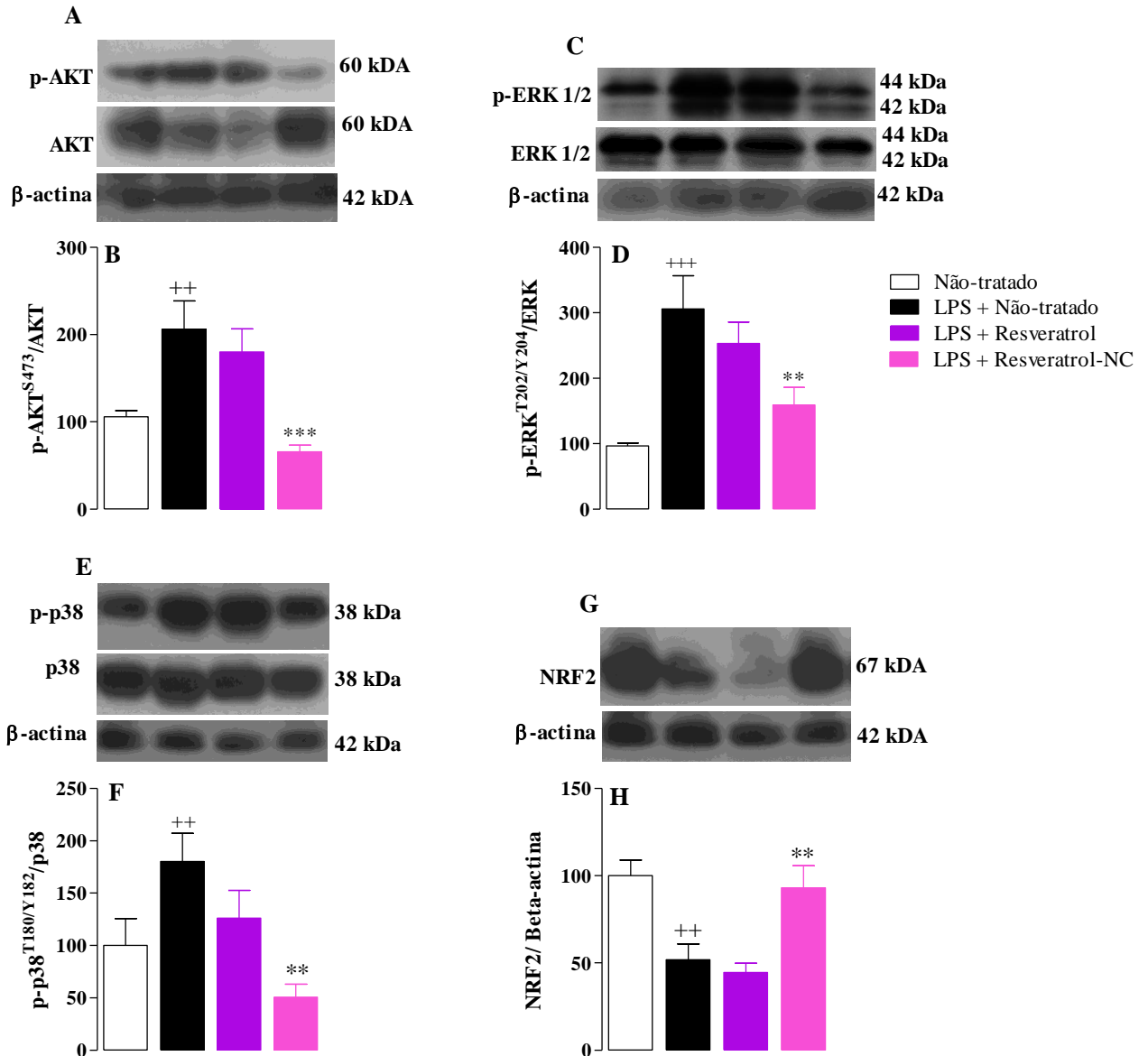


Figura 6.12. Efeito do pós-tratamento com resveratrol-NC sinalização molecular. Os animais foram instilados com LPS e após 6h, foram realizados os tratamentos por via oral com resveratrol livre ou resveratrol-NC (5 mg/kg). Os pulmões foram perfundidos e coletados para análise de expressão de proteína de 24 h após a provocação com LPS. Análise de *Western blotting* representativa do estado de fosforilação de (A) Akt, (C) ERK1/2, (E) p38 e expressão de (G) NRF2. Os valores densitométricos obtidos para as proteínas fosforiladas e total foram normalizados para os respectivos controles que não foram expostos ao LPS (barra de controle; 100 %). Os dados são expressos como uma razão das percentagens normalizadas de proteína fosforilada e total ou da proteína por beta-actina. Barras representam a média ± EPM (n = 5–7, por grupo). ++ P < 0,01 e +++ P < 0,001 em comparação com o grupo salina; ** P < 0,01 e *** P < 0,001 em comparação ao grupo LPS não-tratado;

6.3.6. Quantificação do resveratrol no tecido pulmonar

A quantidade de resveratrol no tecido pulmonar nos diferentes grupos, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), é apresentada na Figura 6.13. Não foram observados níveis detectáveis de resveratrol quando os animais foram tratados com 2,5 ou 5 mg/kg da molécula livre, e uma quantidade muito pequena foi verificada na dose mais alta após o tratamento com a molécula livre (10 mg/kg). Por outro lado, nos animais tratados com o resveratrol-NC, foi possível recuperar uma quantidade significativamente maior da molécula em comparação com os animais que receberam o resveratrol na forma livre. Observamos também, que a quantidade de resveratrol detectada pelo HPLC nas amostras de tecido pulmonar de animais tratados com resveratrol-NC foi maior com o aumento da dose.

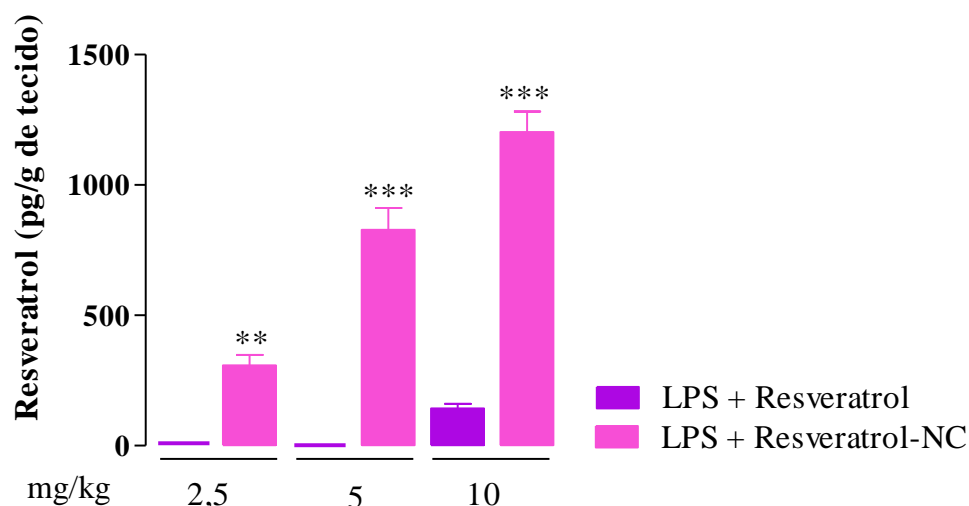


Figura 6.13. Quantificação do resveratrol no tecido pulmonar. Os animais foram instilados com LPS intranasalmente e, após 6 h, o tratamento oral com o resveratrol livre ou resveratrol-NC (2,5, 5, 10 mg/kg) foi realizado. Os valores representam a média \pm EPM da quantidade de resveratrol no tecido pulmonar expressa em μ g do composto por g de tecido 24 h após o estímulo com LPS (n= 5-7, por grupo). ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em comparação com as respectivas doses de resveratrol livre.

7. Discussão

A proposta deste trabalho foi utilizar nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo resveratrol visando otimizar os efeitos desse fitocomposto através da administração pela via oral, em única dose, no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS. A utilização de nanocarreadores para a entrega de fármacos é um conceito bem estabelecido. As propriedades inerentes ao tamanho das partículas em nanoescala apresentam vantagens como liberação controlada e o direcionamento do princípio ativo, a proteção contra degradação, o aumento da solubilidade e da estabilidade, a diminuição da toxicidade sistêmica e o aumento da eficácia (237, 253). A nanomedicina já é aprovada para uso clínico nos EUA e na Europa, especialmente no tratamento do câncer (258, 295).

O interesse nos efeitos benéficos do resveratrol à saúde humana é crescente não apenas nas indústrias farmacêuticas, mas também na área de cosméticos e alimentos, sendo comercializado tanto na forma pura quanto em combinações nativas ou artificiais com outros polifenóis (296). Inúmeros estudos pré-clínicos, nos últimos anos, comprovam o potencial farmacológico do resveratrol em diversas doenças, demonstrando sua capacidade de interagir com diversas enzimas e vias de sinalização, caracterizando o seu efeito pleiotrópico. No entanto, a baixa biodisponibilidade do resveratrol, estabilidade limitada, baixa solubilidade e extenso metabolismo limitam sua utilização na clínica, demonstrando a necessidade urgente de estratégias que possam melhorar sua aplicação.

Uma abordagem promissora para contornar a baixa biodisponibilidade e a toxicidade sistêmica de fitocompostos é a utilização de sistemas nanocarreadores para entrega de fármacos (297), os quais podem alterar positivamente a farmacocinética da molécula. As principais vantagens do uso da nanotecnologia para entrega de fármacos incluem a especificidade de alvo, a redução da toxicidade, manutenção do efeito biológico, segurança e biocompatibilidade (298). A nanoestruturação do resveratrol já foi adotada como estratégia para aumentar sua biodisponibilidade (212), na maioria dos casos, com sucesso. Entretanto, nenhum trabalho utilizou as nanopartículas poliméricas contendo resveratrol para avaliar o efeito farmacológico no modelo de lesão pulmonar aguda, apenas com a molécula em sua forma livre. Nesse cenário, devido à farmacocinética desfavorável, estudos com o resveratrol na sua forma livre no tratamento da lesão pulmonar aguda, via de regra, fazem uso de vias de administração com menor metabolismo, como a via intraperitoneal, utilizam doses maiores e/ou mais intervenções

terapêuticas para alcançar um efeito biológico efetivo. Tal diversidade metodológica dificulta comparações sobre a eficiência do resveratrol no modelo. Por exemplo, encontramos a utilização da dose 0,3 mg/kg (200) ou 30 mg/kg (201), coadministrada com o LPS pela via i.p., apresentando um efeito significativo de melhora da doença. Com relação ao tratamento pela via oral, encontramos a dose 5 ou 45 mg/kg, administrada por 3 dias seguidos antes do estímulo intratraqueal do LPS, apresentando efeito anti-inflamatório (203). Em comum, os trabalhos que investigam o efeito do tratamento com resveratrol livre na lesão pulmonar aguda, apresentam eficácia inferior em comparação ao efeito visto com as nanocápsulas contendo resveratrol neste trabalho.

No presente estudo, utilizamos nanocápsulas poliméricas contendo resveratrol, preparadas pelo método de nanoprecipitação. Desde o seu desenvolvimento por Fessi (1989) (299), a técnica de nanoprecipitação tem sido usada para o encapsulamento de drogas, principalmente, as hidrofóbicas em ambas nanocápsulas ou nanoesferas (300). As vantagens da técnica incluem a simplicidade, obtenção espontânea das nanopartículas, facilidade de escalabilidade, boa reprodução, utilização de baixas quantidades de solventes tóxicos e obtenção de tamanhos de partículas submicrométricas, sem a necessidade de uso de grande quantidade de energia (300, 301). O polímero de escolha para o desenvolvimento das nanocápsulas foi a poli(ϵ -caprolactona), que apresenta uma biodegradação lenta quando comparado a outros polímeros, sendo considerado adequado para administração controlada de medicamentos devido à alta permeabilidade a muitos fármacos, excelente biocompatibilidade e capacidade de ser totalmente excretado do organismo uma vez bioabsorvido (302). As nanocápsulas contendo resveratrol utilizadas neste trabalho, foram previamente desenvolvidas e estudadas em um modelo experimental de Doença de Alzheimer em ratos por Frozza e cols. Além de apresentarem boa estabilidade e alta capacidade de encapsulamento, a administração pela via intraperitoneal das nanocápsulas aumentou a biodistribuição tecidual o resveratrol, bem como apresentou efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores (284).

Nos nossos ensaios utilizamos a via oral para avaliar o efeito do resveratrol, a qual permite a administração única, assim como pode ser aplicado em protocolos de tratamentos que necessitem múltiplas administrações. A escolha do tratamento pela via oral é considerada uma das mais comuns para administração de medicamentos, apesar de que características como, a baixa solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de muitos fármacos, levarem à redução dos níveis terapêuticos através do trato gastrintestinal (303). O epitélio intestinal humano é composto

de vilosidades que aumentam a área de absorção total da superfície no trato gastrointestinal, onde estão presentes os enterócitos (absortivos) e células caliciformes (secretoras de muco), formando regiões linfóides, conhecidas como placas de Peyer, as quais são cobertas com células M especializadas para amostragem de antígenos (303). A maioria dos fármacos administrados por via oral é absorvida pela veia porta através dos enterócitos intestinais, e após metabolização no fígado, entra na circulação sistêmica, reduzindo a biodisponibilidade do medicamento. No entanto, quando altamente lipofílicos ou entregues em nanossistemas como as nanopartículas (lipídicas ou poliméricas), os fármacos alcançam o sistema linfático intestinal pelas placas Peyer, até alcançarem a circulação sistêmica sem sofrer metabolismo de primeira passagem (304). De acordo com a literatura, as nanopartículas poliméricas de tamanho menor (100-200 nm) são absorvidas pelas células M dos fragmentos de Peyer, as quais apresentam um papel importante na liberação de fármacos, uma vez que são relativamente menos protegidas pelo muco e possuem alta capacidade de transcitose (303, 304). Dessa forma, as nanopartículas utilizadas nos nossos ensaios, apresentam características que permitem a sua absorção intestinal e distribuição tecidual.

Como controle das nanocápsulas, utilizamos nanocápsulas brancas ou NC-brancas, preparadas tal qual as nanocápsulas contendo resveratrol, porém sem adição desse. Em todos os ensaios realizados observamos que os animais tratados com as NC-brancas não apresentaram diferenças com relação à resposta desencadeada pela provocação com LPS, sendo consideradas inertes nos parâmetros avaliados, estando de acordo com estudos realizados previamente (284). Além disso, nosso grupo demonstrou, em trabalhos anteriores, que a administração destes nanocarreadores em quantidades superiores às utilizadas aqui não alterou parâmetros inflamatórios quando tratados por via oral (85). Os resultados reforçam a biocompatibilidade e segurança na utilização de polímeros biodegradáveis no desenvolvimento de nanocarreadores farmacológicos. A toxicidade das nanocápsulas preparadas da mesma forma às utilizadas nesse trabalho, foram investigadas previamente (302). Foi observado que a administração de apenas uma dose, ou de forma subcrônica (28 dias) com o volume de até 3 mL de nanocápsulas, pela via intravenosa, não induziu mortalidade ou alterações permanentes no peso corporal durante os experimentos, entretanto, observou-se reação granulomatosa de corpo estranho no fígado e no baço nos tratamentos agudo e subcrônico. Em nível de comparação, o volume máximo utilizado neste trabalho foi de 300 μ L por animal. Estudos sobre a toxicidade das nanocápsulas poliméricas ainda são escassos, necessitando de mais pesquisas sobre o efeito crônico da administração em animais.

A dexametasona foi utilizada como um controle positivo, nos nossos ensaios, para promover um efeito anti-inflamatório e para validar a funcionalidade do nosso modelo. A dexametasona é amplamente utilizada na literatura científica como um controle positivo experimental em diferentes doses e vias de administração (305-310). A aplicação clínica de corticoides em pacientes com SDRA é questionável, apresentando dados inconclusivos (311). Com relação à prevenção da SDRA em pacientes com sepse, Weigelt e cols. mostraram que a metilprednisolona administrada na dose de 30 mg/kg, por via intravenosa a cada 6 horas por 48 horas, não preveniu a SDRA em pacientes de alto risco. Este estudo também demonstrou uma maior incidência de complicações infecciosas com o uso de corticosteróides (312).

Além de infecções secundárias, o uso de corticosteróides está associado a inúmeros efeitos adversos, como hiperglicemia, retenção de líquidos, desequilíbrio eletrolítico, pancreatite, aumento da taxa de infecção, fraqueza neuromuscular, sangramento gastrointestinal (GI), entre outros que limitam o uso na clínica (311). Devido à etiologia heterogênea da SDRA, os esteroides podem ter efeitos benéficos apenas algumas etiologias, por exemplo, pneumonia, mas não para a SDRA associada à influenza H1N1 (313). Isso pode resultar em uma decisão complicada na prática, já que a etiologia da SDRA nem sempre é fácil de determinar. Dessa forma, além da dexametasona ter sido usada em nosso estudo como um controle positivo, o resveratrol pode ter vantagens sobre a dexametasona na clínica, como a ausência de efeitos adversos causados pelo uso de corticosteróides, a possibilidade de atuar em vários estágios da SDRA e em condições de resistência ao corticoide.

Com o objetivo de comprovar nossa hipótese, camundongos A/J receberam pela via oral 2,5, 5 ou 10 mg/kg da nanoformulação do resveratrol (resveratrol-NC), de maneira prévia ou posterior à indução do modelo experimental da SDRA por LPS. As doses foram escolhidas para serem menores do que aquelas utilizadas na literatura (que variam em uma média de 50 mg/kg), para atestar o benefício da diminuição de dose associado ao uso dos nanocarreadores. Em resumo, os nossos achados demonstraram que tanto o pré- quanto o pós-tratamento com resveratrol-NC melhoraram as principais características da SDRA: acúmulo de neutrófilos para o espaço broncoalveolar, liberação de citocinas, dano histológico, estresse oxidativo, inibição da ativação de vias pró-inflamatórias e indução da resposta gênica antioxidante. Além disso a nanoestruturação permitiu que o resveratrol exercesse seus efeitos farmacológicos mesmo quando administrado pela via oral em baixas doses, pelo fato de possibilitar o aumento da quantidade de resveratrol no tecido alvo. A eficácia inferior do resveratrol livre, nas nossas condições, sugere

que a nanoestruturação do resveratrol em nanocápsulas poliméricas é uma estratégia efetiva para melhorar o efeito do resveratrol no tratamento da lesão pulmonar aguda.

Utilizando nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com resveratrol, foi demonstrado que a liberação do resveratrol das nanocápsulas *in vitro* ocorreu em duas etapas, a primeira etapa com uma liberação rápida inicial, nas primeiras 4 h (com uma média de $34,66 \pm 5,82$ % de resveratrol liberado) seguido de uma liberação sustentada, ao longo de 24 h atingindo $80,48 \pm 12,20$ % de resveratrol liberado (314). As nanocápsulas poliméricas são consideradas um sistema vesicular reservatório, o qual possibilita a liberação sustentada do princípio ativo. Está bem estabelecido que a liberação do fármaco das nanocápsulas é impulsionada por vários fatores que levam à biodegradação do polímero, como alterações no pH, estado redox e conteúdo iônico nos tecidos e nas células. Tais alterações levam à difusão do fármaco para fora da matriz, até alcançar o ambiente e produzir o efeito biológico. Esse processo pode ocorrer em alguns segundos, horas ou até durante os dias (203, 257, 315). Uma vez imerso no meio de liberação, os sistemas poliméricos de entrega de fármacos para liberação controlada, apresentam uma rápida e curta liberação do fármaco, conhecido como “*burst release*” seguida por um perfil estável de platô (316).

Considerando que existe um tempo mínimo necessário para a liberação do princípio ativo, realizamos um ensaio para elucidar o tempo necessário para que ocorra o efeito anti-inflamatório do resveratrol nanoestruturado na prevenção da migração leucocitária no modelo de SDRA (40). Inicialmente, escolhemos o protocolo de pré-tratamento, por ser uma abordagem bem difundida no estudo de novos compostos com potencial farmacológico.

O tratamento com resveratrol-NC, na dose de 5 mg/kg, apresentou inibição da migração de células inflamatórias quando tratados 1, 4, 6 ou 12 h antes da instilação com LPS. Entretanto, o pré-tratamento de 24 h não foi capaz de inibir a resposta pulmonar leucocitária. Observamos que com 1 h de tratamento ocorreu a inibição da resposta leucocitária em cerca de 26 % e que entre 4-12 h essa inibição foi de, aproximadamente, 80 %, sugerindo que, nas nossas condições, o conteúdo das nanocápsulas necessita de um período de tempo maior que 1 h para alcançar um efeito farmacológico superior a 50 % de inibição. Esse resultado comprova o papel de reservatório das nanocápsulas e sua capacidade de liberar o princípio ativo de forma sustentada. Em contrapartida, a ausência de efeito no pré-tratamento de 24 h indica que o resveratrol possa ter sido liberado e metabolizado antes de alcançar quantidades locais suficientes para evitar a infiltração de células inflamatórias. Nessas mesmas condições, o resveratrol na sua forma livre (5

mg/kg) não preveniu a infiltração de leucócitos em nenhum dos tempos avaliados, indicando o papel fundamental das nanocápsulas para o efeito anti-inflamatório do resveratrol administrado por via oral. Com base nesses resultados, escolhemos o pré-tratamento de 4 h antes da instilação do LPS, considerando um tempo tecnicamente viável para as subseqüentes análises.

A SDRA é uma lesão pulmonar multifatorial caracterizada por intensa inflamação, liberação de mediadores pró-inflamatórios, acúmulo de leucócitos, edema pulmonar e comprometimento da mecânica pulmonar e, apesar dos mais 50 anos de pesquisas, até o momento, não possui estratégia terapêutica eficiente, apresentando alta taxa de mortalidade (317). A instilação das vias aéreas com LPS bacteriano é um modelo bem estabelecido para simular a SDRA experimentalmente (75, 318), promovendo intensa inflamação pulmonar através da ativação do receptor TLR4 presente nas células do sistema imune, desencadeando a liberação de mediadores pró-inflamatórios, acúmulo de leucócitos no pulmão, lesão epitelial/endotelial e edema pulmonar (79). Segundo Martin e cols., idealmente, os modelos animais de LPA devem reproduzir os mecanismos e as conseqüências da SDRA, observados em seres humanos, incluindo aumento na permeabilidade microvascular e no epitélio alveolar, influxo de neutrófilos nos espaços alveolares e exsudatos alveolares ricos em proteína na fase aguda (72).

Em nossos ensaios, camundongos A/J estimulados intranasalmente com LPS exibiram uma resposta exacerbada após a exposição à metacolina no parâmetro de elastância, indicando a hiper-reatividade das vias aéreas. O pré-tratamento com resveratrol-NC inibiu a resposta exacerbada das vias aéreas em todas as doses testadas (2,5, 5 e 10 mg/kg), enquanto a molécula na forma livre demonstrou efeito somente com a dose mais alta (10 mg/kg). Os mostram que a nanoestruturação do resveratrol permitiu o efeito do resveratrol em uma dose 4 vezes menor em comparação com sua forma livre.

Na SDRA, além da resposta inflamatória, é comum ocorrer o aumento da elastância pulmonar (inversamente proporcional a complacência) de todo o sistema respiratório (230). A elastância capta a rigidez elástica dos pulmões, podendo ser definida como a medida do trabalho que tem que ser exercido pelos músculos da inspiração para expandir os pulmões (319). A abordagem clássica para determinar a mecânica pulmonar e a responsividade das vias aéreas em camundongos é a medição da resistência pulmonar e a complacência dinâmica, em resposta a broncoconstritores não-específicos. Além da elastância pulmonar aumentada, a hiper-reatividade das vias aéreas (AHR) contribui para as complicações da SDRA (320, 321). O aumento da AHR a agentes broncoconstritores inespecíficos pode ser desencadeado pelo LPS via ativação do

receptor TLR4 em modelos animais e pode contribuir para o aumento da AHR também em pacientes com asma e SDRA (322).

Em paralelo ao aumento da AHR também observamos o aumento expressivo nos leucócitos totais no lavado brocoalveolar, majoritariamente de neutrófilos, tanto no espaço broncoalveolar quanto no tecido, demonstrado através da maior atividade da enzima MPO. A MPO, uma proteína heme presente em seus grânulos azurófilos dos neutrófilos, tem papel importante na produção de espécies reativas de oxigênio, produzindo ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrogênio na presença de íons cloreto (76, 323). A atividade da MPO do tecido correlaciona-se significativamente com o número de neutrófilos presentes no tecido inflamado (324), sendo, portanto, frequentemente utilizado para estimar o acúmulo de neutrófilos no tecido (325). O acúmulo e ativação de neutrófilos nos pulmões, em resposta a macrófagos alveolares ativados é, via de regra, observado experimentalmente e em pacientes com SDRA, estando associada à gravidade da doença (40, 326).

Além da melhora da AHR, o pré-tratamento com resveratrol-NC, mas não a forma livre, aboliu o número de células totais, neutrófilos e atividade de MPO a níveis basais, apresentando um efeito importante na inibição da migração de leucócitos. O efeito do resveratrol da lesão pulmonar aguda foi anteriormente obtido com o pré-tratamento por 3 dias consecutivos com resveratrol livre (5 ou 45 mg/kg) (203), porém com menor eficácia quando comparado aos nossos resultados com a molécula nanoestruturada. Nossos resultados comprovam que a nanoencapsulação do resveratrol é capaz de inibir tanto o processo inflamatório quanto as alterações na mecânica pulmonar induzida pelo LPS.

A ativação de neutrófilos sequestrados na circulação pulmonar durante o processo inflamatório resulta na liberação de moléculas citotóxicas, incluindo enzimas granulares, radicais livres, espécies reativas de oxigênio, mediadores lipídicos e citocinas, induzindo a ruptura e disfunção endotelial, responsáveis pelas principais manifestações clínicas da síndrome (40, 327, 328). Para verificar o dano histológico causado pelo excesso da migração e ativação neutrofílica, avaliamos pelo sistema de escore semiquantitativo cortes histológicos de amostras pulmonares corados com H&E. Observamos que apenas o tratamento com resveratrol-NC, em todas as doses testadas, melhorou os danos causados pelo LPS no tecido pulmonar, enquanto nenhuma alteração foi vista nos tratamentos com a molécula livre, estando de acordo com os resultados da inibição da migração celular e melhora da hiper-reatividade. Adicionalmente, o mesmo padrão de resposta foi obtido na análise das citocinas pró-inflamatórias, onde o pré-tratamento com resveratrol-NC,

mas não a molécula livre, reduziu os níveis de IL-6, TNF- α , KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-2 e RANTES.

As citocinas pró-inflamatórias desempenham papel importante durante a SDRA com níveis elevados nos pulmões dos pacientes e estão intimamente associadas à presença de leucócitos, principalmente neutrófilos, no local inflamado. IL-6 e TNF- α são importantes mediadores sistêmicos da fase aguda de inflamação, com níveis aumentados associados à piora da condição clínica (329), enquanto que as quimiocinas MIP-2, KC, RANTES, MIP-1 e MCP-1 estão associadas à ação quimiotática de neutrófilos e monócitos (320, 330-332). Os níveis mais baixos desses mediadores encontrados após o tratamento com resveratrol-NC têm importante papel na resolução da inflamação, além de confirmar os resultados de migração leucocitária. Dados prévios da literatura mostraram o efeito do resveratrol na redução do mRNA da MIP-1 α (204), nos níveis de IL-6 (200) e MIP-2 (333) e redução do dano histológico durante a inflamação pulmonar induzida por LPS (203, 204, 333).

Nós demonstramos que o aumento do estresse oxidativo no pulmão endotoxêmico, indicado pelos níveis maiores de MDA, foi prevenido pelo tratamento apenas com resveratrol-NC, mas não pelo tratamento com a molécula livre. Um estudo publicado recente, mostrou que 30 mg/kg de resveratrol livre (i.p) administrado 1 h após a lesão pulmonar aguda induzida por sepsis inibiu o aumento dos níveis de MDA, aumentada nos animais doentes (333). Em adição, o pré-tratamento com resveratrol-NC, mas não com o resveratrol livre, inibiu significativamente a atividade da SOD no tecido pulmonar. Diferente do que observamos, geralmente o resveratrol leva à indução da SOD, uma enzima antioxidante (333). Tal discrepância pode ser o reflexo da melhora da inflamação e das condições oxidativas pelo resveratrol, diminuindo a necessidade de ativação dos sistemas de defesa antioxidante. A diminuição dos níveis da SOD após o tratamento com resveratrol foi visto anteriormente (334).

Existem muitas evidências experimentais demonstrando o papel de oxidantes e lesões oxidativas na patogênese da SDRA. Por exemplo, pacientes com SDRA apresentam níveis aumentados de H₂O₂ no condensado do ar exalado (63, 335). O desbalanço oxidativo produz espécies reativas de oxigênio e leva a peroxidação lipídica descontrolada, gerando produtos aldeídicos, tais como o MDA, referidos como substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico. A peroxidação lipídica descontrolada pode causar lesão e morte celular por meio de danos às membranas celulares a biomoléculas como o DNA (336). No contexto do aumento do estresse oxidativo, a célula ativa um sistema de defesa endógeno baseado na atividade de enzimas

antioxidantes como a SOD, que degenera superóxidos em oxigênio e peróxido, evitando danos graves às células (337). Os efeitos antioxidantes do resveratrol são relacionados ao anéis fenólicos, a dupla ligação conjugada e o potencial de deslocalização eletrônica na molécula estrutural (338). O resveratrol pode atuar de forma antioxidante por neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através de mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio e transferência eletrônica sequencial de perda de prótons ou aumentando a expressão gênica de várias enzimas antioxidantes, como heme oxigenase 1, catalase, glutathiona peroxidase e SOD, por meio da regulação de várias vias de sinalização, incluindo a SIRT1, o fator 2 relacionado ao fator eritróide-2 nuclear (NRF2) e o NF- κ B (338).

Os efeitos benéficos do resveratrol estão fortemente relacionados à sua capacidade de modulação simultânea envolvendo múltiplos alvos moleculares (130). Uma série de estudos anteriores demonstrou que o resveratrol pode inibir a sinalização do NF- κ B, MAPKs e PI3K/Akt (339) como mecanismo para a diminuição da produção de citocinas e da prevenção de infiltração de leucócitos (145, 146, 340). Considerando o efeito anti-inflamatório do pré-tratamento com o resveratrol-NC, procuramos confirmar os possíveis mecanismos moleculares associados a este efeito no modelo utilizado no presente estudo. A avaliação de proteínas por *western blotting* revelou uma redução significativa nas formas fosforiladas das proteínas pró-inflamatórias Akt Ser473 e ERK1/2, sem alterações na fosforilação das proteínas p38MAPK e JNK e na expressão da SIRT1.

A via de sinalização da ERK foi a primeira cascata das MAP cinases a ser caracterizada, sendo um mediador vital de vários destinos celulares, incluindo crescimento, proliferação e sobrevivência. Existem duas isoformas de ERK que são ubiquamente expressas, ERK1 e ERK2, e estas são frequentemente referidas como p42/p44 MAP cinases (341). A inibição dessa via é descrita como mecanismo para melhora de diferentes modelos da lesão pulmonar aguda (342, 343). A proteína cinase B (PKB ou Akt) desempenha um papel no metabolismo, crescimento, proliferação e sobrevivência das células (344). Sua ativação é controlada por um processo de várias etapas que envolve a fosfoinositida-3-cinase (PI3K). É descrito que a fosforilação da proteína Akt no resíduo Ser473 leva à ativação da via PI3K/Akt (339), a qual, quando inibida pode suprimir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α (345). A inibição da via PI3K/Akt também está envolvida com a melhora da lesão pulmonar aguda (346-348). Com base nisso, propomos que o efeito anti-inflamatório observado no pré-tratamento com resveratrol-NC está relacionado com a regulação negativa das vias PI3K/Akt e ERK1/2.

O resveratrol é conhecido como um potente ativador do gene da proteína desacetilase SIRT1, que medeia a atividade antiproliferativa e anti-inflamatória, através da alteração da expressão gênica e modulação de inúmeras vias metabólicas (349). Entretanto, não foi possível observar alterações na expressão da SIRT1 no nosso modelo. A diferença encontrada em nossos resultados pode ser explicada pela discrepância entre os protocolos. Por exemplo, Li e cols. descobriram que animais injetados intraperitonealmente com 10 mg/kg de LPS tiveram uma redução na expressão de SIRT-1, que aumentou após 15 ou 30 mg/kg de resveratrol em duas administrações (após 6 e após 12 horas de injeção com LPS). Neste estudo, os animais foram mortos após 18 h de injeção de LPS (202). Também usando o modelo indução por LPS (3 mg/kg - intratraqueal) para induzir inflamação pulmonar aguda, Jiang e cols. observaram que a injeção intraperitoneal de resveratrol (30 mg/kg), imediatamente antes do LPS, reduziu a inflamação e aumentou a expressão de SIRT-1. Neste ensaio, os animais foram mortos após 6 h de injeção de LPS (201). Outro estudo, investigando o efeito do resveratrol livre em um modelo de rato com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica mostrou que o tratamento com resveratrol (50 mg/kg), via oral por 20 dias levou ao aumento da expressão de SIRT1 em ratos em comparação com animais doentes não tratados (350). Com base nas diferenças metodológicas, podemos sugerir que em nosso protocolo o tempo utilizado para avaliar a expressão de SIRT-1 pode ter sido um fator determinante para avaliar as diferenças entre os grupos, visto que o resveratrol pode ativar diretamente a SIRT1 (136). Além disso, a dose menor e/ou a única antes da estimulação com LPS podem ser outra variável importante a ser considerada. Pretendemos avaliar a expressão precoce de SIRT-1 em nosso modelo, bem como o efeito de sua inibição em ensaios futuros.

É recorrente a utilização do tratamento preventivo ou concomitante a indução da doença nos ensaios de avaliação de compostos no tratamento da SDRA em modelo animal, como prova de conceito. Entretanto, a intervenção terapêutica se torna clinicamente mais relevante após o estabelecimento da doença. Visando a melhor compreensão da resolução da SDRA, investigamos o efeito do resveratrol-NC após o estabelecimento da inflamação induzida pelo LPS. Escolhemos tratar os animais 6 h após a instilação com LPS, considerando dados da literatura que confirmam o estabelecimento da inflamação nesse período (351, 352). Optamos por continuar no pós-tratamento com a dose intermediária de 5 mg/kg, uma vez que não houve diferença significativa entre as doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg nos ensaios anteriores, e buscando reduzir o número de animais nos ensaios. A escolha da dose intermediária se deu pela quantidade administrada da

formulação, a qual é muito reduzida na dose de 2,5 mg/kg, podendo apresentar variações no tratamento.

De maneira surpreendente, o pós-tratamento com resveratrol-NC reverteu todas as alterações induzidas pelo LPS. O tratamento com resveratrol-NC, 6 h após a indução da lesão com LPS, reduziu a hiper-reatividade das vias aéreas após o estímulo local com metacolina, assim como inibiu o acúmulo de neutrófilos no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar, reduzindo os danos teciduais e a produção de citocinas pró-inflamatórias. O resveratrol livre, nas mesmas condições, assim como as NC-brancas não apresentaram efeito nos parâmetros avaliados. Entretanto, observamos que para a resposta oxidativa, ambos os tratamentos com o resveratrol livre ou nanoestruturado diminuíram os níveis de MDA e reestabeleceram a atividade da catalase.

Com relação aos mecanismos moleculares adjacentes ao efeito do resveratrol no pós-tratamento, confirmamos a inibição das vias ERK e Akt/PI3K. Adicionalmente, nas condições de pós-tratamento, conseguimos observar uma diminuição na fosforilação proteína p38 MAPK, não observada na condição de pré-tratamento, apenas nos animais tratados com resveratrol-NC e não no tratamento com a molécula livre. A inibição da via p38 MAPK leva à redução da produção de TNF- α induzida por LPS em camundongos e está associada a uma diminuição no recrutamento de neutrófilos e na liberação de TNF- α no lavado broncoalveolar em camundongos após a administração intratraqueal de LPS (365).

Adicionalmente, somente o tratamento com resveratrol-NC levou ao aumento da expressão do NRF2, um fator de transcrição que responde ao estresse celular direcionando vários programas de transcrição. Por exemplo, o NRF2 pode reduzir os níveis de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, controlando diretamente a formação enzimática de tais moléculas ou pela sua capacidade de induzir a expressão de enzimas antioxidantes, como a catalase (366). A catalase, junto a SOD e glutathiona peroxidase, são consideradas a primeira linha de defesa antioxidante (367). O aumento da expressão do NRF2 pode ser, pelo menos em parte, o mecanismo pelo qual o resveratrol inibe o estresse oxidativo nosso modelo, corroborado pelo aumento dos níveis de catalase após o tratamento com o resveratrol. Resultado semelhante foi reportado com o tratamento i.p. de 30 mg/kg de resveratrol em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por sepse (333).

Os resultados encontrados com o tratamento após 6 h do início da instalação da inflamação podem apresentar conflitos com os dados do pré-tratamento em 1 h antes da

inflamação, no qual o tratamento não apresentou efeito 25 h após. Nesse sentido, cabe ressaltar as diferentes condições nas quais se encontram os animais no momento do tratamento. No caso dos animais tratados 6 h após a indução com LPS, há uma grande relevância da presença do processo inflamatório, o qual apresenta um tropismo para as nanopartículas. Tais condições, ausentes nos animais saudáveis (no caso do pré-tratamento) sugerem a importância dos elementos da inflamação no tempo e na biodistribuição das nanopartículas.

De forma geral, o resveratrol, quando em nanocápsulas, apresentou tanto efeito preventivo quanto terapêutico no tratamento da inflamação pulmonar induzida por LPS. A dualidade desse efeito sugere que o resveratrol possua diferentes mecanismos anti-inflamatórios no nosso modelo. Enquanto no pré-tratamento observamos o que demonstra ser um bloqueio do início do processo inflamatório inibindo toda a cascata, o pós-tratamento, demonstra uma capacidade do resveratrol de atuar no *clearance* da inflamação.

Com relação ao efeito preventivo é possível levantar a hipótese de que o resveratrol possa atuar no bloqueio do receptor Toll-4, visto que já foi previamente demonstrado que o tratamento com resveratrol por 3 dias antes do estímulo com LPS (5 ou 45 mg/kg) diminuiu a expressão de Toll-4 em camundongos (203). Esse efeito também foi encontrado em modelo de faringite em coelhos (368). Adicionalmente, Yusuf e cols., utilizando modelo de carcinoma de pele em camundongos, observaram que o efeito protetivo do resveratrol está associado ao receptor Toll-4, visto que em animais deficientes para o receptor foi constatada a perda do efeito do resveratrol, observado em animais selvagens (369). Resultados *in vitro* corroboram esses achados. Utilizando linhagem de macrófagos murinos RAW264.7 foi demonstrado que o tratamento com resveratrol e LPS diminuiu a expressão do receptor Toll-4 (370); em outro estudo, utilizando células Ba/F3 (pró-células B), foi observado que resveratrol inibiu a oligomerização das subunidades do receptor Toll-4 (371). O papel do receptor Toll-4 deverá ser investigado a fundo nos ensaios futuros.

Por outro lado, o resveratrol apresentou um efeito igualmente benéfico quando administrado após o estabelecimento da inflamação, sendo capaz de realizar o *clearance* dos neutrófilos no tecido pulmonar. No processo de resolução da inflamação, a principal característica histológica é a depleção de neutrófilos dos locais inflamados, através de etapas programadas que ocorrem de forma simultânea (353). Dessa forma, a eliminação dos neutrófilos presentes no local da inflamação pode ocorrer pela cessação da migração dos leucócitos da corrente sanguínea, regulação das quimiocinas e citocinas, inibição das vias de sinalização

associadas à sobrevivência de leucócitos, assim como, pela indução de apoptose dos leucócitos e a subsequente remoção destes pelo processo de eferocitose com auxílio dos macrófagos, através da fagocitose (354). De acordo com a literatura, a capacidade do resveratrol de induzir a apoptose em células cancerígenas é extensamente difundida (355-361). Já em relação aos neutrófilos, foi descrito que após estímulo estressor o tratamento com resveratrol induziu a morte celular de neutrófilos humanos isolados do plasma (362). Em adição aos efeitos apoptóticos, o tratamento com resveratrol foi capaz de induzir o processo eferocitose em células RAW264.7 apoptóticas (363), em células HaCaT (queratinócitos) e em timócitos (364). Em conjunto, essas informações nos permite sugerir uma ação apoptótica adicionada a indução da eferocitose nos nossos ensaios, como um possível mecanismo de ação do resveratrol na resolução da inflamação aguda pulmonar. A possível indução da apoptose e eferocitose pelo resveratrol no nosso modelo deverão ser avaliados com detalhes em sequência.

A melhora significativa da resposta inflamatória pulmonar com o resveratrol nanoencapsulado, e o reduzido ou inexistente efeito quando administrado na forma livre, sugere que nanoestruturação do resveratrol possibilitou o aumento da biodisponibilidade oral da molécula no tecido-alvo associado à proteção do fármaco, permitindo um aumento das concentrações locais e conseqüente efeito farmacológico. A fim de investigar o possível aumento da biodisponibilidade e a vetorização passiva do resveratrol, quantificamos a molécula no tecido pulmonar através da técnica de HPLC. Utilizando as mesmas condições do pós-tratamento, encontramos quantidades superiores de resveratrol no tecido pulmonar quando os animais receberam as nanocápsulas contendo resveratrol em comparação aos animais que foram tratados com a molécula livre, nas mesmas doses. Observamos também que quantidades maiores foram alcançadas com o aumento da dose do resveratrol-NC. Nos grupos que foram tratados com a molécula livre nas doses 2,5 e 5 mg/kg não foi possível obter níveis detectáveis de resveratrol, apenas na dose de 10 mg/kg, porém, inferior àquela observada nos animais tratados com resveratrol-NC em uma dose 4 vezes menor (2,5 mg/kg).

Os resultados obtidos por HPLC comprovam nossa hipótese de que a utilização de um nanocarreador polimérico pode promover a vetorização passiva do resveratrol para o tecido inflamado e aumentar a quantidade deste no tecido pulmonar. Esse resultado deve-se às características da proteção proporcionada pelas nanocápsulas, resultando numa maior quantidade de fármaco absorvido após administração pela via oral, maior circulação na corrente sanguínea e melhor distribuição aos tecidos. A nanoencapsulação pode permitir um aumento na meia-vida de

fármacos lipofílicos, como o resveratrol, através da liberação gradual e sustentada. Além disso, é descrito que a presença de polissorbato 80, utilizado como estabilizante, pode atrasar a opsonização e aumentar o tempo da permanência das nanocápsulas no sangue antes de serem absorvidas pelas células do sistema fagocítico mononuclear (302).

Outro ponto, é que a presença robusta do resveratrol no tecido pulmonar nos animais tratados com resveratrol-NC pode ser explicado pelo efeito de retenção e permeabilidade melhorado (EPRM) que ocorre durante o processo inflamatório ou em tumores. Esse efeito leva ao direcionamento das partículas para tecidos inflamados, como resultado da angiogênese desregulada e/ou aumento da expressão e ativação de fatores de permeabilidade vascular. As fenestrações entre as células endoteliais podem variar de 300 nm a 4700 nm em tamanho (244), e permitem uma maior retenção de nanopartículas e, conseqüentemente, um maior efeito do princípio ativo. Em condições inflamatórias, o efeito EPRM também se desenvolve, com a permeabilidade vascular induzida pela contração das células inflamatórias que revestem os capilares (244, 372). Outro fator importante é a diminuição do pH no local da inflamação, resultado da produção e liberação de ácidos pelas células ou uma baixa remoção de CO₂ (373). Alterações no pH pode causar inchaço do polímero e liberação da molécula no local da inflamação (374).

No entanto, é importante ressaltar que a quantificação do resveratrol realizada por HPLC é uma avaliação indireta e não indica necessariamente a presença nas nanocápsulas neste tecido. O aumento da presença do resveratrol no tecido pulmonar pode ser resultado maior tempo de circulação do resveratrol no organismo. Da mesma forma, o efeito, claramente inferior, da molécula livre pode ser explicado pela sua ausência no tecido pulmonar, devido ao metabolismo que a molécula sofreu após administração oral. A possível migração e liberação local das nanocápsulas para o pulmão deverão ser confirmados com maior precisão a partir de ensaios utilizando a marcação radioativa ou fluorescente das nanocápsulas em ensaios de bio-imagem. Dessa forma, os mecanismos envolvidos no direcionamento das nanopartículas não estão totalmente elucidados e serão objetivos de próximas investigações.

Os efeitos farmacológicos do resveratrol são inquestionáveis diante dos dados científicos que demonstram seu efeito nos estudos publicados pela comunidade científica nos últimos anos. Entretanto, as características estruturais e químicas da molécula são fatores limitantes para a sua utilização farmacológica, a qual necessita de modificações e estratégias para alcançar um efeito farmacológico eficiente. Nós demonstramos que a nanoestruturação do resveratrol, utilizando

nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico, possibilitou, os efeitos farmacológicos do resveratrol em uma única administração pela via oral, utilizando doses consideradas baixas em comparação com a literatura, obtendo sucesso no tratamento do modelo experimental da SDRA.

8. Conclusões

- As nanocápsulas poliméricas contendo resveratrol, apresentaram variações de potência em diferentes tempos de pré-tratamento, necessitando de um período de 4 h para prevenir a inflamação pulmonar aguda induzida pelo LPS; enquanto que o resveratrol livre não apresentou efeito benéfico em nenhum tempo ou dose avaliados (Figura 8.1);
- Ambos os regimes de tratamentos profilático e terapêutico utilizando as nanocápsulas contendo resveratrol, mas não com a molécula livre foram capazes de melhorar os parâmetros de função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas, migração leucocitária, dano histológico, produção de citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo no tecido pulmonar (Tabela 8.1);
- O tratamento com resveratrol nanoencapsulado modulou negativamente as vias moleculares relacionadas ao processo inflamatório induzido por LPS, enquanto nenhum efeito foi observado no tratamento com o resveratrol livre;
- A nanoestruturação do resveratrol promoveu o aumento da biodisponibilidade do resveratrol no tecido pulmonar.

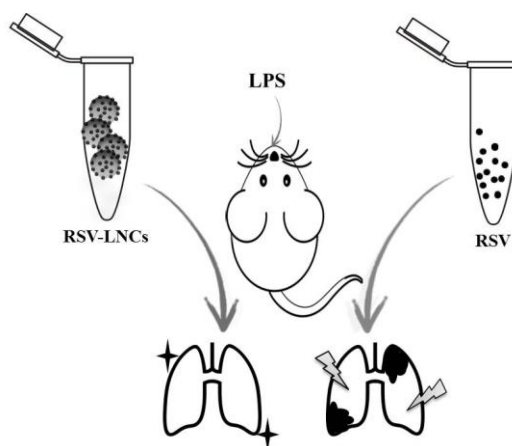


Figura 8.1. Representação gráfica da comparação entre o tratamento da lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Resveratrol-NC (à direita) e o resveratrol livre (RSV) (à esquerda).

| Parâmetro inflamatório | Resveratrol | | Resveratrol-NC | |
|---|-------------|-----|----------------|-----|
| | Pré | Pós | Pré | Pós |
| Hiper-reatividade | - | - | + | + |
| Acúmulo de leucócitos | - | - | + | + |
| Dano histológico | - | - | + | + |
| Estresse oxidativo | - | + | + | + |
| Produção de citocinas pró-inflamatórias | - | - | + | + |
| Inibição de vias moleculares | - | - | + | + |
| Aumento da biodistribuição | | - | | + |

Tabela 8.1. Resumo dos dados obtidos no pré- e pós-tratamento com ambos resveratrol livre ou nanoencapsulado. Na primeira coluna, os objetivos propostos no presente trabalho. Na segunda e terceira coluna, os tratamentos com resveratrol livre e nanoencapsulado (resveratrol-NC) respectivamente, subdivididos nos protocolos de pré- e pós-tratamento. O sinal de negativo (-) representa falta de efeito com relação ao parâmetro; o sinal positivo (+) representa efeito benéfico do tratamento com relação ao parâmetro.

Em conjunto, os dados obtidos nesse trabalho demonstram que a nanoestruturação do resveratrol em nanocápsulas poliméricas potencializa o efeito anti-inflamatório do fitocomposto no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, de forma equivalente para os tratamentos profilático e terapêutico. Utilizando as mesmas condições, o resveratrol em sua forma livre apresentou efeito reduzido ou inexistente na prevenção e na resolução da inflamação. Além disso, o uso do nanocarreador para entrega do resveratrol promoveu um aumento da quantidade do resveratrol no local da inflamação, não observado com a molécula livre e, conseqüentemente, uma maior potência após a administração de doses baixas pela via oral, apresentando-se como uma alternativa interessante para o tratamento da SDRA no futuro. A Figura 8.2 é uma representação gráfica dos efeitos benéficos alcançados no tratamento da inflamação pulmonar aguda utilizando o resveratrol nanoencapsulado.

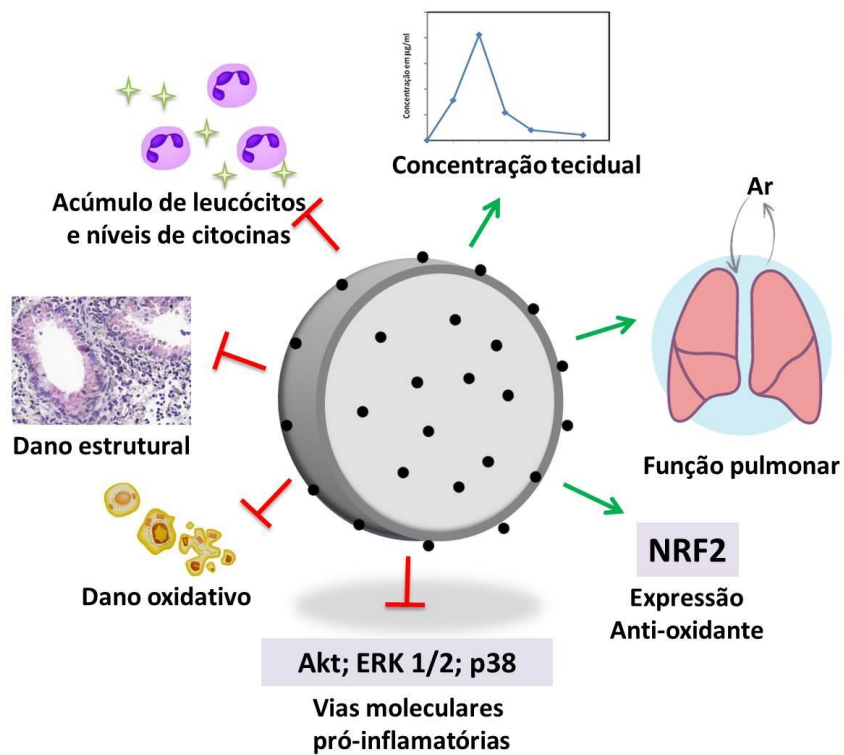


Figura 8.2. Resumo dos efeitos benéficos do resveratrol-NC na inflamação pulmonar aguda. O símbolo em vermelho indica a prevenção/ inibição, enquanto o símbolo em verde indica melhora/aumento.

9. Perspectivas

O nosso trabalho abre como perspectivas:

- Investigar o papel do receptor Toll-4 no efeito preventivo do resveratrol-NC;
- Estudar o efeito das nanocápsulas contendo resveratrol na resolução da inflamação, quanto à apoptose e esferocitose;
- Analisar o destino das nanocápsulas após a administração oral, utilizando nanocápsulas ligadas a sondas fluorescentes.
- Avaliar o efeito das nanocápsulas contendo resveratrol em modelos de doenças respiratórias resistentes aos esteroides, como a asma resistente;
- Investigar o efeito das nanocápsulas contendo resveratrol em modelos de doenças respiratórias crônicas como a doença pulmonar obstrutiva crônica e a silicose.

10. Referências bibliográficas

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967 Aug 12;2(7511):319-23.
2. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. *Intensive Care Med*. 1994;20(3):225-32.
3. Fan E, Brodie D, Slutsky AS. Acute Respiratory Distress Syndrome: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA*. 2018 Feb 20;319(7):698-710.
4. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med*. 2012 Oct;38(10):1573-82.
5. Viana WN. Síndrome de Angústia Respiratória Aguda após Berlim. *Pulmão RJ*. 2015;24(21):31-5.
6. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012 Jun 20;307(23):2526-33.
7. Umbrello M, Formenti P, Bolgiaghi L, Chiumello D. Current Concepts of ARDS: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 29;18(1).
8. 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 Feb 23;315(8):788-800.
9. Rezoagli E, Fumagalli R, Bellani G. Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome. *Ann Transl Med*. 2017 Jul;5(14):282.
10. Hudson LD. *Breathing in America: Diseases, Progress, and Hope*. New York: American Thoracic Society; 2010.
11. Raghavendran K, Pryhuber GS, Chess PR, Davidson BA, Knight PR, Notter RH. Pharmacotherapy of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Curr Med Chem*. 2008;15(19):1911-24.

12. 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 Apr 1;195(7):860-70.
13. Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, et al. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Jun;159(6):1849-61.
14. Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Feb 15;165(4):443-8.
15. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med.* 2005 Oct 20;353(16):1685-93.
16. Linko R, Okkonen M, Pettila V, Perttala J, Parviainen I, Ruokonen E, et al. Acute respiratory failure in intensive care units. FINNALI: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 2009 Aug;35(8):1352-61.
17. Manzano F, Yuste E, Colmenero M, Aranda A, Garcia-Horcajadas A, Rivera R, et al. Incidence of acute respiratory distress syndrome and its relation to age. *J Crit Care.* 2005 Sep;20(3):274-80.
18. Oliveira RH, Basille Filho A. Incidence of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the intensive care unit of a university hospital: a prospective study. *J Bras Pneumol.* 2006 Jan-Feb;32(1):35-42.
19. Franca SA, Toufen C, Jr., Hovnanian AL, Albuquerque AL, Borges ER, Pizzo VR, et al. The epidemiology of acute respiratory failure in hospitalized patients: a Brazilian prospective cohort study. *J Crit Care.* 2011 Jun;26(3):330 e1-8.
20. 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 Apr 4;17(2):R63.
21. Caser EB, Zandonade E, Pereira E, Gama AM, Barbas CS. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: prospective evaluation of 7,133 patients*. *Crit Care Med.* 2014 Mar;42(3):574-82.

22. Fialkow L, Farenzena M, Wawrzeniak IC, Brauner JS, Vieira SR, 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 (Sao Paulo)*. 2016 Mar;71(3):144-51.
23. Pierrakos C, Karanikolas M, Scolletta S, Karamouzou V, Velissaris D. Acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and therapeutic options. *J Clin Med Res*. 2012 Feb;4(1):7-16.
24. Groeneveld AB. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vascul Pharmacol*. 2002 Nov;39(4-5):247-56.
25. Henderson WR, Chen L, Amato MBP, Brochard LJ. Fifty Years of Research in ARDS. Respiratory Mechanics in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Oct 1;196(7):822-33.
26. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 2012 Aug;122(8):2731-40.
27. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000 May 4;342(18):1334-49.
28. Wang L, Taneja R, Wang W, Yao LJ, Veldhuizen RA, Gill SE, et al. Human alveolar epithelial cells attenuate pulmonary microvascular endothelial cell permeability under septic conditions. *PLoS One*. 2013;8(2):e55311.
29. Martin TR. Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. *Chest*. 1999 Jul;116(1 Suppl):2S-8S.
30. Rawal G, Yadav S, Kumar R. Acute Respiratory Distress Syndrome: An Update and Review. *J Transl Int Med*. 2018 Jun;6(2):74-7.
31. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2017 Aug 10;377(6):562-72.
32. Huang X, Xiu H, Zhang S, Zhang G. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of ALI/ARDS. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:1264913.
33. Short KR, Kroeze E, Fouchier RAM, Kuiken T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *Lancet Infect Dis*. 2014 Jan;14(1):57-69.
34. Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Apr 15;306(8):L709-25.

35. Eapen MS, Hansbro PM, McAlinden K, Kim RY, Ward C, Hackett TL, et al. Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Sci Rep*. 2017 Oct 17;7(1):13392.
36. Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T, Reyes L, Booy C, Schimmer RC. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respir Res*. 2005 Jun 22;6:61.
37. Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelan S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 May;46(5):566-72.
38. Han S, Mallampalli RK. The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation. *J Immunol*. 2015 Feb 1;194(3):855-60.
39. Yang CY, Chen CS, Yiang GT, Cheng YL, Yong SB, Wu MY, et al. New Insights into the Immune Molecular Regulation of the Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 16;19(2).
40. Fujishima S. Pathophysiology and biomarkers of acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care*. 2014;2(1):32.
41. Williams AE, Chambers RC. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Feb;306(3):L217-30.
42. Yamamoto T, Kajikawa O, Martin TR, Sharar SR, Harlan JM, Winn RK. The role of leukocyte emigration and IL-8 on the development of lipopolysaccharide-induced lung injury in rabbits. *J Immunol*. 1998 Nov 15;161(10):5704-9.
43. Zemans RL, Colgan SP, Downey GP. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 May;40(5):519-35.
44. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:147-63.
45. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol*. 2011 Jul;179(1):199-210.
46. Martin TR. Interactions between mechanical and biological processes in acute lung injury. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008;5(3):291-6.

47. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F, 2nd, Park DR, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 1):1896-903.
48. Yang J, Azat M, Peng P, Chang Y, Gao R, Li W, et al. Serum levels of TNF- α , IL-1 β , IL-9, and IL-15 in acute respiratory distress syndrome. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(1):781-8.
49. Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest*. 1995 Nov;108(5):1303-14.
50. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3720-32.
51. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013 Dec 12;39(6):1003-18.
52. Lin S, Wu H, Wang C, Xiao Z, Xu F. Regulatory T Cells and Acute Lung Injury: Cytokines, Uncontrolled Inflammation, and Therapeutic Implications. *Front Immunol*. 2018;9:1545.
53. Chen W, Sammani S, Mitra S, Ma SF, Garcia JG, Jacobson JR. Critical role for integrin-beta4 in the attenuation of murine acute lung injury by simvastatin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012 Aug 15;303(4):L279-85.
54. Denis M, Guojian L, Widmer M, Cantin A. A mouse model of lung injury induced by microbial products: implication of tumor necrosis factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 Jun;10(6):658-64.
55. Inoue G. Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS-induced acute lung injury. *J Infect Chemother*. 2000 Mar;6(1):51-60.
56. Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*. 2004 Feb;202(2):145-56.
57. Gerard C, Frossard JL, Bhatia M, Saluja A, Gerard NP, Lu B, et al. Targeted disruption of the beta-chemokine receptor CCR1 protects against pancreatitis-associated lung injury. *J Clin Invest*. 1997 Oct 15;100(8):2022-7.
58. Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, Danforth JM, Laichalk LL, McGillicuddy DC, et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis*. 1996 Jan;173(1):159-65.

59. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. *Infect Immun*. 1997 Sep;65(9):3847-51.
60. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, et al. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Sep;154(3 Pt 1):602-11.
61. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*. 1993 Mar 13;341(8846):643-7.
62. Williams AE, Jose RJ, Mercer PF, Brealey D, Parekh D, Thickett DR, et al. Evidence for chemokine synergy during neutrophil migration in ARDS. *Thorax*. 2017 Jan;72(1):66-73.
63. Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Oct;29(4):427-31.
64. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Aug 1;356(1):1-11.
65. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):245-313.
66. Fialkow L, Chan CK, Grinstein S, Downey GP. Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem*. 1993 Aug 15;268(23):17131-7.
67. Fialkow L, Chan CK, Rotin D, Grinstein S, Downey GP. Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants. *J Biol Chem*. 1994 Dec 9;269(49):31234-42.
68. Haddad JJ, Olver RE, Land SC. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1alpha and NF-kappa B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21130-9.
69. Fink MP. Role of reactive oxygen and nitrogen species in acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care*. 2002 Feb;8(1):6-11.
70. Ward PA. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Aug;1203:53-9.
71. Bastarache JA, Blackwell TS. Development of animal models for the acute respiratory distress syndrome. *Dis Model Mech*. 2009 May-Jun;2(5-6):218-23.

72. Martin TR, Matute-Bello G. Experimental models and emerging hypotheses for acute lung injury. *Crit Care Clin.* 2011 Jul;27(3):735-52.
73. Rocco PRM, Nieman GF. ARDS: what experimental models have taught us. *Intensive Care Med.* 2016 May;42(5):806-10.
74. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 Sep;295(3):L379-99.
75. Morris M, Li L. Molecular mechanisms and pathological consequences of endotoxin tolerance and priming. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012 Feb;60(1):13-8.
76. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* 2011;31(5):379-446.
77. Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jan;8(1):8-14.
78. de Souza Xavier Costa N, Ribeiro Junior G, Dos Santos Alemany AA, Belotti L, Zati DH, Frota Cavalcante M, et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. *PLoS One.* 2017;12(9):e0185474.
79. Chen H, Bai C, Wang X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. *Expert Rev Respir Med.* 2010 Dec;4(6):773-83.
80. Asti C, Ruggieri V, Porzio S, Chiusaroli R, Melillo G, Caselli GF. Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung damage. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000;13(2):61-9.
81. Knapp S, de Vos AF, Florquin S, Golenbock DT, van der Poll T. Lipopolysaccharide binding protein is an essential component of the innate immune response to *Escherichia coli* peritonitis in mice. *Infect Immun.* 2003 Dec;71(12):6747-53.
82. Berger J, Delphin E. Acute Lung Injury and Repair: Scientific Fundamentals and Methods. *Anesth Analg.* 2017 Sep 19;Chapter 2.
83. Alm AS, Li K, Chen H, Wang D, Andersson R, Wang X. Variation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in eight strains of mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010 Apr 30;171(2):157-64.
84. Carvalho VF, Barreto EO, Arantes ACS, Serra MF, Ferreira TPT, Jannini-Sa YAP, et al. Diabetes Downregulates Allergen-Induced Airway Inflammation in Mice. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:6150843.

85. D'Almeida APL, Pacheco de Oliveira MT, de Souza ET, de Sa Coutinho D, Ciambarella BT, Gomes CR, et al. alpha-bisabolol-loaded lipid-core nanocapsules reduce lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4479-91.
86. Serra MF, Cotias AC, Pao CRR, Daleprane JB, Jurgilas PB, Couto GC, et al. Repeated Allergen Exposure in A/J Mice Causes Steroid-Insensitive Asthma via a Defect in Glucocorticoid Receptor Bioavailability. *J Immunol*. 2018 Aug 1;201(3):851-60.
87. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*. 2003 Feb;3(2):169-76.
88. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013 Dec 6;45:e66.
89. Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines (Basel)*. 2017 Oct 4;5(4).
90. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*. 2004 Oct;113(2):153-62.
91. Wang X, Quinn PJ, Yan A. Kdo2 -lipid A: structural diversity and impact on immunopharmacology. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2015 May;90(2):408-27.
92. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Dec 30;1754(1-2):253-62.
93. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Apr;1802(4):396-405.
94. Kong G, Huang X, Wang L, Li Y, Sun T, Han S, et al. Astilbin alleviates LPS-induced ARDS by suppressing MAPK signaling pathway and protecting pulmonary endothelial glycocalyx. *Int Immunopharmacol*. 2016 Jul;36:51-8.
95. Xu X, Liu N, Zhang YX, Cao J, Wu D, Peng Q, et al. The Protective Effects of HJB-1, a Derivative of 17-Hydroxy-Jolkinolide B, on LPS-Induced Acute Distress Respiratory Syndrome Mice. *Molecules*. 2016 Jan 11;21(1):77.
96. Jiang Y, Zeng Y, Huang X, Qin Y, Luo W, Xiang S, et al. Nur77 attenuates endothelin-1 expression via downregulation of NF-kappaB and p38 MAPK in A549 cells and in an ARDS rat model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016 Dec 1;311(6):L1023-L35.

97. Peng S, Hang N, Liu W, Guo W, Jiang C, Yang X, et al. Andrographolide sulfonate ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by down-regulating MAPK and NF-kappaB pathways. *Acta Pharm Sin B*. 2016 May;6(3):205-11.
98. Famous KR, Delucchi K, Ware LB, Kangelaris KN, Liu KD, Thompson BT, et al. Acute Respiratory Distress Syndrome Subphenotypes Respond Differently to Randomized Fluid Management Strategy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Feb 1;195(3):331-8.
99. Calfee CS, Delucchi K, Parsons PE, Thompson BT, Ware LB, Matthay MA. Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomised controlled trials. *Lancet Respir Med*. 2014 Aug;2(8):611-20.
100. Bos LD, Martin-Loeches I, Schultz MJ. ARDS: challenges in patient care and frontiers in research. *Eur Respir Rev*. 2018 Mar 31;27(147).
101. Herridge MS, Tansey CM, Matte A, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Cooper A, et al. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2011 Apr 7;364(14):1293-304.
102. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev*. 2012 Jan;6(11):1-5.
103. McChesney JD. Natural products in drug discovery--organizing for success. *P R Health Sci J*. 2002 Jun;21(2):91-5.
104. Ojima I. Modern natural products chemistry and drug discovery. *J Med Chem*. 2008 May 8;51(9):2587-8.
105. Kalantari H, Das DK. Physiological effects of resveratrol. *Biofactors*. 2010 Sep-Oct;36(5):401-6.
106. Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, et al. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines*. 2018 Sep 9;6(3).
107. Nguyen C, Savouret JF, Widerak M, Corvol MT, Rannou F. Resveratrol, Potential Therapeutic Interest in Joint Disorders: A Critical Narrative Review. *Nutrients*. 2017 Jan 6;9(1).
108. Giovinazzo G, Ingrosso I, Paradiso A, De Gara L, Santino A. Resveratrol Biosynthesis: Plant Metabolic Engineering for Nutritional Improvement of Food. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012 2012/09/01;67(3):191-9.
109. Bavaresco L, Lucini L, Busconi M, Flamini R, De Rosso M. Wine Resveratrol: From the Ground Up. *Nutrients*. 2016 Apr 14;8(4):222.

110. Takaoka M. Resveratrol, a new phenolic compound, from *Veratrum grandiflorum* Chemical Society of Japan. 1939;60:1090–100.
111. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release*. 2012 Mar 10;158(2):182-93.
112. Wang Y, Halls C, Zhang J, Matsuno M, Zhang Y, Yu O. Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Metab Eng*. 2011 Sep;13(5):455-63.
113. Li M, Schneider K, Kristensen M, Borodina I, Nielsen J. Engineering yeast for high-level production of stilbenoid antioxidants. *Sci Rep*. 2016 Nov 11;6:36827.
114. Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazue F, Ghiringhelli F, et al. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jan;1215:48-59.
115. Pujara N, Jambhrunkar S, Wong KY, McGuckin M, Popat A. Enhanced colloidal stability, solubility and rapid dissolution of resveratrol by nanocomplexation with soy protein isolate. *J Colloid Interface Sci*. 2017 Feb 15;488:303-8.
116. Brittes J, Lucio M, Nunes C, Lima JL, Reis S. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chem Phys Lipids*. 2010 Nov;163(8):747-54.
117. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Gruoso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:837042-.
118. King RE, Bomser JA, Min DB. Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2006;5(3):65-70.
119. Mukherjee S, Dudley JI, Das DK. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response*. 2010 Mar 18;8(4):478-500.
120. Kursvietiene L, Staneviciene I, Mongirdiene A, Bernatoniene J. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Kaunas)*. 2016;52(3):148-55.
121. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. 2005 Jan;81(1 Suppl):230S-42S.

122. Constant J. Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Clin Cardiol.* 1997 May;20(5):420-4.
123. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol.* 2012;3:141.
124. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992 Jun 20;339(8808):1523-6.
125. Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, et al. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React.* 1995;17(1):1-3.
126. Olas B, Wachowicz B. Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets.* 2005 Aug;16(5):251-60.
127. Tsai H-Y, Ho C-T, Chen Y-K. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *Journal of Food and Drug Analysis.* 2017 2017/01/01;25(1):134-47.
128. Montero C, Cristescu SM, Jimenez JB, Orea JM, te Lintel Hekkert S, Harren FJ, et al. trans-Resveratrol and grape disease resistance. A dynamical study by high-resolution laser-based techniques. *Plant Physiol.* 2003 Jan;131(1):129-38.
129. Madrigal-Perez LA, Ramos-Gomez M. Resveratrol Inhibition of Cellular Respiration: New Paradigm for an Old Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2016 Mar 17;17(3):368.
130. Britton RG, Kovoov C, Brown K. Direct molecular targets of resveratrol: identifying key interactions to unlock complex mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Aug;1348(1):124-33.
131. de Sa Coutinho D, Pacheco MT, Frozza RL, Bernardi A. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol: Mechanistic Insights. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 20;19(6).
132. Saqib U, Faisal SM, Saluja R, Baig MS. Structural insights of resveratrol with its binding partners in the toll-like receptor 4 pathway. *J Cell Biochem.* 2019 Jan;120(1):452-60.
133. Oi N, Jeong CH, Nadas J, Cho YY, Pugliese A, Bode AM, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, suppresses pancreatic cancer by inhibiting leukotriene A(4)hydrolase. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9755-64.
134. Buryanovskyy L, Fu Y, Boyd M, Ma Y, Hsieh TC, Wu JM, et al. Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. *Biochemistry.* 2004 Sep 14;43(36):11417-26.

135. Pandey AK, Bhattacharya P, Shukla SC, Paul S, Patnaik R. Resveratrol inhibits matrix metalloproteinases to attenuate neuronal damage in cerebral ischemia: a molecular docking study exploring possible neuroprotection. *Neural Regen Res.* 2015 Apr;10(4):568-75.
136. Gertz M, Nguyen GT, Fischer F, Suenkel B, Schlicker C, Franzel B, et al. A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *PLoS One.* 2012;7(11):e49761.
137. Kim EN, Lim JH, Kim MY, Ban TH, Jang IA, Yoon HE, et al. Resveratrol, an Nrf2 activator, ameliorates aging-related progressive renal injury. *Aging (Albany NY).* 2018 Jan 11;10(1):83-99.
138. Azios NG, Krishnamoorthy L, Harris M, Cubano LA, Cammer M, Dharmawardhane SF. Estrogen and resveratrol regulate Rac and Cdc42 signaling to the actin cytoskeleton of metastatic breast cancer cells. *Neoplasia.* 2007 Feb;9(2):147-58.
139. Slater SJ, Seiz JL, Cook AC, Stagliano BA, Buzas CJ. Inhibition of protein kinase C by resveratrol. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jan 20;1637(1):59-69.
140. Pinto MC, Garcia-Barrado JA, Macias P. Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. *J Agric Food Chem.* 1999 Dec;47(12):4842-6.
141. Chen X, Lu J, An M, Ma Z, Zong H, Yang J. Anti-inflammatory effect of resveratrol on adjuvant arthritis rats with abnormal immunological function via the reduction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Mol Med Rep.* 2014 Jun;9(6):2592-8.
142. Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell.* 2012 Feb 3;148(3):421-33.
143. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1156-60.
144. Ren Z, Wang L, Cui J, Huoc Z, Xue J, Cui H, et al. Resveratrol inhibits NF-kB signaling through suppression of p65 and IκB kinase activities. *Pharmazie.* 2013 Aug;68(8):689-94.
145. Ma C, Wang Y, Dong L, Li M, Cai W. Anti-inflammatory effect of resveratrol through the suppression of NF-kappaB and JAK/STAT signaling pathways. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015 Mar;47(3):207-13.
146. Jiang H, Shang X, Wu H, Gautam SC, Al-Holou S, Li C, et al. Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *J Exp Ther Oncol.* 2009;8(1):25-33.

147. Wang G, Hu Z, Fu Q, Song X, Cui Q, Jia R, et al. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide-mediated acute inflammation in rats by inhibiting the TLR4/NF- κ Bp65/MAPKs signaling cascade. *Scientific reports*. 2017;7:45006-.
148. Liu M, Wilk SA, Wang A, Zhou L, Wang RH, Ogawa W, et al. Resveratrol inhibits mTOR signaling by promoting the interaction between mTOR and DEPTOR. *J Biol Chem*. 2010 Nov 19;285(47):36387-94.
149. Otsuka K, Yamamoto Y, Ochiya T. Regulatory role of resveratrol, a microRNA-controlling compound, in HNRNPA1 expression, which is associated with poor prognosis in breast cancer. *Oncotarget*. 2018;9(37):24718-30.
150. Lan F, Weikel KA, Cacicedo JM, Ido Y. Resveratrol-Induced AMP-Activated Protein Kinase Activation Is Cell-Type Dependent: Lessons from Basic Research for Clinical Application. *Nutrients*. 2017 Jul 14;9(7).
151. Chan WK, Delucchi AB. Resveratrol, a red wine constituent, is a mechanism-based inactivator of cytochrome P450 3A4. *Life Sci*. 2000 Nov 10;67(25):3103-12.
152. Ferrero ME, Bertelli AE, Fulgenzi A, Pellegatta F, Corsi MM, Bonfrate M, et al. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin Nutr*. 1998 Dec;68(6):1208-14.
153. Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precis Oncol*. 2017;1.
154. Poulsen MM, Fjeldborg K, Ornstrup MJ, Kjaer TN, Nohr MK, Pedersen SB. Resveratrol and inflammation: Challenges in translating pre-clinical findings to improved patient outcomes. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1852(6):1124-36.
155. Erdogan CS, Vang O. Challenges in Analyzing the Biological Effects of Resveratrol. *Nutrients*. 2016 Jun 9;8(6).
156. Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer*. 2014 Jun;21(3):R209-25.
157. Oyenihini OR, Oyenihini AB, Adeyanju AA, Oguntibeju OO. Antidiabetic Effects of Resveratrol: The Way Forward in Its Clinical Utility. *J Diabetes Res*. 2016;2016:9737483.
158. Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*. 2016 May 2;8(5).
159. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY. Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*. 2010 Jun;41(2-3):375-83.

160. Das S, Das DK. Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2007 Sep;6(3):168-73.
161. Baxter RA. Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *J Cosmet Dermatol*. 2008 Mar;7(1):2-7.
162. Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One*. 2008 Jun 4;3(6):e2264.
163. Csiszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Jul;297(1):H13-20.
164. Pirola L, Frojdo S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life*. 2008 May;60(5):323-32.
165. Kulkarni SS, Canto C. The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1852(6):1114-23.
166. Tome-Carneiro J, Larrosa M, Gonzalez-Sarrias A, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT, Espin JC. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des*. 2013;19(34):6064-93.
167. Smoliga JM, Vang O, Baur JA. Challenges of translating basic research into therapeutics: resveratrol as an example. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012 Feb;67(2):158-67.
168. Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA. Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res*. 2011 Aug;55(8):1129-41.
169. Smoliga MJ, Blanchard O. Enhancing the Delivery of Resveratrol in Humans: If Low Bioavailability is the Problem, What is the Solution? *Molecules*. 2014;19(11).
170. Subramanian L, Youssef S, Bhattacharya S, Kenealey J, Polans AS, van Ginkel PR. Resveratrol: challenges in translation to the clinic--a critical discussion. *Clin Cancer Res*. 2010 Dec 15;16(24):5942-8.
171. Brasnyo P, Molnar GA, Mohas M, Marko L, Laczy B, Cseh J, et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr*. 2011 Aug;106(3):383-9.
172. Zhu W, Qin W, Zhang K, Rottinghaus GE, Chen YC, Kliethermes B, et al. Trans-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. *Nutr Cancer*. 2012 Apr;64(3):393-400.

173. Moussa C, Hebron M, Huang X, Ahn J, Rissman RA, Aisen PS, et al. Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*. 2017;14(1):1-.
174. Agarwal B, Campen MJ, Channell MM, Wherry SJ, Varamini B, Davis JG, et al. Resveratrol for primary prevention of atherosclerosis: clinical trial evidence for improved gene expression in vascular endothelium. *Int J Cardiol*. 2013 Jun 5;166(1):246-8.
175. Chen S, Zhao X, Ran L, Wan J, Wang X, Qin Y, et al. Resveratrol improves insulin resistance, glucose and lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Dig Liver Dis*. 2015 Mar;47(3):226-32.
176. Gescher AJ. Resveratrol from red grapes - pedestrian polyphenol or useful anticancer agent? *Planta Med*. 2008 Oct;74(13):1651-5.
177. Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M, Crowell JA, Perloff M, Booth TD, et al. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res*. 2010 Nov 15;70(22):9003-11.
178. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*. 2004 Dec;32(12):1377-82.
179. Asghari S, Rafraf M, Farzin L, Asghari-Jafarabadi M, Ghavami SM, Somi MH. Effects of Pharmacologic Dose of Resveratrol Supplementation on Oxidative/Antioxidative Status Biomarkers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Adv Pharm Bull*. 2018 Jun;8(2):307-17.
180. Bode LM, Bunzel D, Huch M, Cho GS, Ruhland D, Bunzel M, et al. In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *Am J Clin Nutr*. 2013 Feb;97(2):295-309.
181. Detampel P, Beck M, Krahenbuhl S, Huwyler J. Drug interaction potential of resveratrol. *Drug Metab Rev*. 2012 Aug;44(3):253-65.
182. Chow HH, Garland LL, Hsu CH, Vining DR, Chew WM, Miller JA, et al. Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010 Sep;3(9):1168-75.
183. Zhu XD, Lei XP, Dong WB. Resveratrol as a potential therapeutic drug for respiratory system diseases. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:3591-8.

184. Li Y, Luo B, Zhang L, Ma M, Guo X. [Resveratrol attenuates endoplasmic reticulum stress and alveolar epithelial apoptosis in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2014 Jan;37(1):30-5.
185. Liu H, Ren J, Chen H, Huang Y, Li H, Zhang Z, et al. Resveratrol protects against cigarette smoke-induced oxidative damage and pulmonary inflammation. *J Biochem Mol Toxicol*. 2014 Oct;28(10):465-71.
186. Akgedik R, Akgedik S, Karamanli H, Uysal S, Bozkurt B, Ozol D, et al. Effect of resveratrol on treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Inflammation*. 2012 Oct;35(5):1732-41.
187. Zhou S, Li MT, Jia YY, Liu JJ, Wang Q, Tian Z, et al. Regulation of Cell Cycle Regulators by SIRT1 Contributes to Resveratrol-Mediated Prevention of Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomed Res Int*. 2015;2015:762349.
188. Shi Q, Geldenhuys W, Sutariya V, Bishayee A, Patel I, Bhatia D. CARG-driven GADD45alpha activated by resveratrol inhibits lung cancer cells. *Genes Cancer*. 2015 May;6(5-6):220-30.
189. Kim HY. Resveratrol in Asthma: A French Paradox? *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017 Jan;9(1):1-2.
190. Lee HY, Kim IK, Yoon HK, Kwon SS, Rhee CK, Lee SY. Inhibitory Effects of Resveratrol on Airway Remodeling by Transforming Growth Factor-beta/Smad Signaling Pathway in Chronic Asthma Model. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017 Jan;9(1):25-34.
191. Lee M, Kim S, Kwon OK, Oh SR, Lee HK, Ahn K. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2009 Apr;9(4):418-24.
192. Rong L, Wu J, Wang W, Zhao RP, Xu XW, Hu D. Sirt 1 activator attenuates the bleomycin-induced lung fibrosis in mice via inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016 May;20(10):2144-50.
193. Chen B, Xue J, Meng X, Slutzky JL, Calvert AE, Chicoine LG. Resveratrol prevents hypoxia-induced arginase II expression and proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells via Akt-dependent signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Aug 15;307(4):L317-25.

194. Yu L, Tu Y, Jia X, Fang K, Liu L, Wan L, et al. Resveratrol Protects Against Pulmonary Arterial Hypertension in Rats via Activation of Silent Information Regulator 1. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(1):55-67.
195. Xu D, Li Y, Zhang B, Wang Y, Liu Y, Luo Y, et al. Resveratrol alleviate hypoxic pulmonary hypertension via anti-inflammation and anti-oxidant pathways in rats. *Int J Med Sci*. 2016;13(12):942-54.
196. Yousef M, Vlachogiannis IA, Tsiani E. Effects of Resveratrol against Lung Cancer: In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrients*. 2017 Nov 10;9(11).
197. Luo H, Wang L, Schulte BA, Yang A, Tang S, Wang GY. Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells. *Int J Oncol*. 2013 Dec;43(6):1999-2006.
198. Nie P, Hu W, Zhang T, Yang Y, Hou B, Zou Z. Synergistic Induction of Erlotinib-Mediated Apoptosis by Resveratrol in Human Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Down-Regulating Survivin and Up-Regulating PUMA. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(6):2255-71.
199. Zhu Y, He W, Gao X, Li B, Mei C, Xu R, et al. Resveratrol overcomes gefitinib resistance by increasing the intracellular gefitinib concentration and triggering apoptosis, autophagy and senescence in PC9/G NSCLC cells. *Sci Rep*. 2015 Dec 4;5:17730.
200. Zhang HX, Duan GL, Wang CN, Zhang YQ, Zhu XY, Liu YJ. Protective effect of resveratrol against endotoxemia-induced lung injury involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014 Apr;27(2):150-5.
201. Jiang L, Zhang L, Kang K, Fei D, Gong R, Cao Y, et al. Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation. *Biomed Pharmacother*. 2016 Dec;84:130-8.
202. Li T, Zhang J, Feng J, Li Q, Wu L, Ye Q, et al. Resveratrol reduces acute lung injury in a LPS-induced sepsis mouse model via activation of Sirt1. *Mol Med Rep*. 2013 Jun;7(6):1889-95.
203. Zhang Z, Chen N, Liu JB, Wu JB, Zhang J, Zhang Y, et al. Protective effect of resveratrol against acute lung injury induced by lipopolysaccharide via inhibiting the myd88-dependent Toll-like receptor 4 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2014 Jul;10(1):101-6.
204. Cao Q, Jing C, Tang X, Yin Y, Han X, Wu W. Protective effect of resveratrol on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011 Mar;294(3):527-32.

205. Qi Y, Zhang G, Ma L, Wang K, Wu J, Sun B, et al. Effect of Resveratrol on the Expression of p38 Mitogen Activated Protein Kinase and Intercellular Adhesion Molecule-1 in Rats with Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2012;11:1831-6.
206. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res*. 2005 May;49(5):472-81.
207. Planas JM, Alfaras I, Colom H, Juan ME. The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Arch Biochem Biophys*. 2012 Nov 15;527(2):67-73.
208. Vargas JE, Souto AA, Pitrez PM, Stein RT, Porto BN. Modulatory potential of resveratrol during lung inflammatory disease. *Med Hypotheses*. 2016 Nov;96:61-5.
209. Chedea VS, Vicas SI, Sticozzi C, Pessina F, Frosini M, Maioli E, et al. Resveratrol: from diet to topical usage. *Food Funct*. 2017 Nov 15;8(11):3879-92.
210. Keylor MH, Matsuura BS, Stephenson CR. Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products. *Chem Rev*. 2015 Sep 9;115(17):8976-9027.
211. Singh A, Ahmad I, Ahmad S, Iqbal Z, Ahmad FJ. A novel monolithic controlled delivery system of resveratrol for enhanced hepatoprotection: nanoformulation development, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016 Sep;42(9):1524-36.
212. Summerlin N, Soo E, Thakur S, Qu Z, Jambhrunkar S, Popat A. Resveratrol nanoformulations: challenges and opportunities. *Int J Pharm*. 2015 Feb 20;479(2):282-90.
213. Colom H, Alfaras I, Maijo M, Juan ME, Planas JM. Population pharmacokinetic modeling of trans-resveratrol and its glucuronide and sulfate conjugates after oral and intravenous administration in rats. *Pharm Res*. 2011 Jul;28(7):1606-21.
214. Johnson JJ, Nihal M, Siddiqui IA, Scarlett CO, Bailey HH, Mukhtar H, et al. Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. *Mol Nutr Food Res*. 2011 Aug;55(8):1169-76.
215. De Santi C, Pietrabissa A, Spisni R, Mosca F, Pacifici GM. Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica*. 2000 Sep;30(9):857-66.
216. Mattarei A, Azzolini M, La Spina M, Zoratti M, Paradisi C, Biasutto L. Amino Acid Carbamates As Prodrugs Of Resveratrol. *Scientific reports*. [Article]. 2015;5:15216.

217. Howells LM, Berry DP, Elliott PJ, Jacobson EW, Hoffmann E, Hegarty B, et al. Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Sep;4(9):1419-25.
218. Frozza RL, Bernardi A, Paese K, Hoppe JB, da Silva T, Battastini AM, et al. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *J Biomed Nanotechnol*. 2010 Dec;6(6):694-703.
219. Wong IY, Bhatia SN, Toner M. Nanotechnology: emerging tools for biology and medicine. *Genes Dev*. 2013 Nov 15;27(22):2397-408.
220. Mirza AZ, Siddiqui FA. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. *International Nano Letters*. 2014 2014/02/20;4(1):94.
221. Kumar Gurjas Kaur Tanvir Singh A. *Nanotechnology: A Review*2012.
222. Contreras JE, Rodriguez EA, Taha-Tijerina J. Nanotechnology applications for electrical transformers—A review. *Electric Power Systems Research*. 2017 2017/02/01/;143:573-84.
223. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017 2017/05/18/.
224. Boulaiz H, Alvarez PJ, Ramirez A, Marchal JA, Prados J, Rodriguez-Serrano F, et al. Nanomedicine: application areas and development prospects. *Int J Mol Sci*. 2011;12(5):3303-21.
225. Appenzeller T. The man who dared to think small. *Science*. 1991 Nov 29;254(5036):1300.
226. Soete L, Schneegans S, Eröcal D, Angathevar B, Rasiah R. *Science Report, Towards 2030: Executive Summary.*: Unesco; 2015.
227. Tarafdar J, Adhikari T. *Nanotechnology in Soil Science*. 2015. p. 775-807.
228. Khodabandehloo H, Zahednasab H, Ashrafi Hafez A. Nanocarriers Usage for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Iran J Cancer Prev*. 2016 Apr;9(2):e3966.
229. Bayford R, Rademacher T, Roitt I, Wang SX. Emerging applications of nanotechnology for diagnosis and therapy of disease: a review. *Physiol Meas*. 2017 Jul 24;38(8):R183-R203.
230. Beck RC, Ourique AF, Guterres SS, Pohlmann AR. Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2012 Dec;6(3):195-208.
231. Kawasaki ES, Player A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine*. 2005 Jun;1(2):101-9.

232. Barenholz Y. Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*. 2012 Jun 10;160(2):117-34.
233. Weissig V, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4357-73.
234. 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 Jan;36(1):55-63.
235. 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 Aug 31;17(9).
236. Conte R, Marturano V, Peluso G, Calarco A, Cerruti P. Recent Advances in Nanoparticle-Mediated Delivery of Anti-Inflammatory Phytochemicals. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 28;18(4).
237. Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chem Rev*. 2016 Mar 9;116(5):2826-85.
238. 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 Jan;9(1).
239. McCarthy JR, Weissleder R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Aug 17;60(11):1241-51.
240. Jager E, Venturini CG, Poletto FS, Colome LM, Pohlmann JP, Bernardi A, et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *J Biomed Nanotechnol*. 2009 Feb;5(1):130-40.
241. Kashi TS, Eskandarion S, Esfandyari-Manesh M, Marashi SM, Samadi N, Fatemi SM, et al. Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:221-34.
242. 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.
243. Badrealam KF, Owais M. *Nanobiotechnology*. United Kingdom: One Central Press; 2014.

244. Nehoff H, Parayath NN, Domanovitch L, Taurin S, Greish K. Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:2539-55.
245. Elsaesser A, Howard CV. Toxicology of nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012 Feb;64(2):129-37.
246. 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 Sep-Oct;7(5):623-39.
247. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights*. 2007;2:147-57.
248. 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 Mar;83(5):366-81.
249. Kammari R, Das NG, Das SK. Chapter 6 - Nanoparticulate Systems for Therapeutic and Diagnostic Applications. In: Mitra AK, Cholkar K, Mandal A, editors. *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*. Boston: Elsevier; 2017. p. 105-44.
250. Gelperina S, Kisich K, Iseman MD, Heifets L. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(12):1487-90.
251. Jäger A, Stefani V, Guterres SS, Pohlmann AR. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007 2007/06/29;338(1):297-305.
252. Zhu X, Anquillare ELB, Farokhzad OC, Shi J. Chapter 22 - Polymer- and Protein-Based Nanotechnologies for Cancer Theranostics. In: Chen X, Wong S, editors. *Cancer Theranostics*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 419-36.
253. Poletto FS, Beck RCR, Guterres SS, Pohlmann AR. Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. In: Beck R, Guterres S, Pohlmann A, editors. *Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 49-68.
254. Grumezescu AM. *Nano- and microscale drug delivery systems : design and fabrication / edited by Alexandru Mihai Grumezescu. : Amsterdam Elsevier; 2017.*

255. Mishra B, Patel BB, Tiwari S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine*. 2010 Feb;6(1):9-24.
256. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview 2004.
257. Kamaly N, Yameen B, Wu J, Farokhzad OC. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev*. 2016 Feb 24;116(4):2602-63.
258. Kothamasu P, Kanumur H, Ravur N, Maddu C, Parasuramrajam R, Thangavel S. Nanocapsules: the weapons for novel drug delivery systems. *Bioimpacts*. 2012;2(2):71-81.
259. Bahadori M, Mohammadi F. Nanomedicine for respiratory diseases. *Tanaffos*. 2012;11(4):18-22.
260. Lu X, Zhu T, Chen C, Liu Y. Right or left: the role of nanoparticles in pulmonary diseases. *Int J Mol Sci*. 2014 Sep 29;15(10):17577-600.
261. Garcia Fde M. Nanomedicine and therapy of lung diseases. *Einstein (Sao Paulo)*. 2014 Oct-Dec;12(4):531-3.
262. Buxton DB. Nanomedicine for the management of lung and blood diseases. *Nanomedicine (Lond)*. 2009 Apr;4(3):331-9.
263. Sahib MN, Darwis Y, Peh KK, Abdulameer SA, Tan YT. Rehydrated sterically stabilized phospholipid nanomicelles of budesonide for nebulization: physicochemical characterization and in vitro, in vivo evaluations. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2351-66.
264. Meers P, Neville M, Malinin V, Scotto AW, Sardaryan G, Kurumunda R, et al. Biofilm penetration, triggered release and in vivo activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Apr;61(4):859-68.
265. Waters V, Ratjen F. Inhaled liposomal amikacin. *Expert Rev Respir Med*. 2014 Aug;8(4):401-9.
266. Matsuo Y, Ishihara T, Ishizaki J, Miyamoto K, Higaki M, Yamashita N. Effect of betamethasone phosphate loaded polymeric nanoparticles on a murine asthma model. *Cell Immunol*. 2009;260(1):33-8.
267. Ahmad Z, Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Novel chemotherapy for tuberculosis: chemotherapeutic potential of econazole- and moxifloxacin-loaded PLG nanoparticles. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Feb;31(2):142-6.

268. Ahmad J, Akhter S, Rizwanullah M, Amin S, Rahman M, Ahmad MZ, et al. Nanotechnology-based inhalation treatments for lung cancer: state of the art. *Nanotechnol Sci Appl*. 2015;8:55-66.
269. Jung J, Park SJ, Chung HK, Kang HW, Lee SW, Seo MH, et al. Polymeric nanoparticles containing taxanes enhance chemoradiotherapeutic efficacy in non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Sep 1;84(1):e77-83.
270. Boulikas T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. *Oncol Rep*. 2004 Jul;12(1):3-12.
271. Lim SB, Rubinstein I, Sadikot RT, Artwohl JE, Onyuksel H. A novel peptide nanomedicine against acute lung injury: GLP-1 in phospholipid micelles. *Pharm Res*. 2011 Mar;28(3):662-72.
272. Kim JH, Park EY, Ha HK, Jo CM, Lee WJ, Lee SS, et al. Resveratrol-loaded Nanoparticles Induce Antioxidant Activity against Oxidative Stress. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2016 Feb;29(2):288-98.
273. Pulliero A, Wu Y, Fenoglio D, Parodi A, Romani M, Soares CP, et al. Nanoparticles increase the efficacy of cancer chemopreventive agents in cells exposed to cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis*. 2015 Mar;36(3):368-77.
274. Karthikeyan S, Hoti SL, Prasad NR. Resveratrol loaded gelatin nanoparticles synergistically inhibits cell cycle progression and constitutive NF-kappaB activation, and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2015 Mar;70:274-82.
275. Augustin MA, Sanguansri L, Lockett T. Nano- and micro-encapsulated systems for enhancing the delivery of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 2013 Jul;1290:107-12.
276. Teskac K, Kristl J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int J Pharm*. 2010 May 5;390(1):61-9.
277. Neves AR, Martins S, Segundo MA, Reis S. Nanoscale Delivery of Resveratrol towards Enhancement of Supplements and Nutraceuticals. *Nutrients*. 2016 Mar 2;8(3):131.
278. Coimbra M, Isacchi B, van Bloois L, Torano JS, Ket A, Wu X, et al. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *Int J Pharm*. 2011 Sep 20;416(2):433-42.
279. Pandita D, Kumar S, Poonia N, Lather V. Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol. *Food Research International*. 2014 2014/08/01;62:1165-74.

280. Karthikeyan S, Rajendra Prasad N, Ganamani A, Balamurugan E. Anticancer activity of resveratrol-loaded gelatin nanoparticles on NCI-H460 non-small cell lung cancer cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2013 2013/01/01/;3(1):64-73.
281. Carletto B, Berton J, Ferreira TN, Dalmolin LF, Paludo KS, Mainardes RM, et al. Resveratrol-loaded nanocapsules inhibit murine melanoma tumor growth. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 Aug 1;144:65-72.
282. da Rocha Lindner G, Bonfanti Santos D, Colle D, Gasnhar Moreira EL, Daniel Prediger R, Farina M, et al. Improved neuroprotective effects of resveratrol-loaded polysorbate 80-coated poly(lactide) nanoparticles in MPTP-induced Parkinsonism. *Nanomedicine (Lond)*. 2015;10(7):1127-38.
283. Figueiro F, Bernardi A, Frozza RL, Terroso T, Zanotto-Filho A, Jandrey EH, et al. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces in vitro and in vivo glioma growth. *J Biomed Nanotechnol*. 2013 Mar;9(3):516-26.
284. Frozza RL, Salbego C, Bernardi A, Hoppe JB, Meneghetti A, Battastini AM, et al. Incorporation of resveratrol into lipid-core nanocapsules improves its cerebral bioavailability and reduces the A β -induced toxicity. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. 2011;7(4):S114.
285. Nanchal RS, Truwit JD. Recent advances in understanding and treating acute respiratory distress syndrome. *F1000Research*. 2018;7:F1000 Faculty Rev-322.
286. Cyriac JM, James E. Switch over from intravenous to oral therapy: A concise overview. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2014 Apr-Jun;5(2):83-7.
287. Liu MW, Su MX, Zhang W, Wang YQ, Chen M, Wang L, et al. Protective effect of Xuebijing injection on paraquat-induced pulmonary injury via down-regulating the expression of p38 MAPK in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Dec 16;14:498.
288. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85.
289. Lefort J, Motreff L, Vargaftig BB. Airway administration of Escherichia coli endotoxin to mice induces glucocorticosteroid-resistant bronchoconstriction and vasopermeation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Mar;24(3):345-51.
290. Zhu T, Wang D-x, Zhang W, Liao X-q, Guan X, Bo H, et al. Andrographolide Protects against LPS-Induced Acute Lung Injury by Inactivation of NF- κ B. *PLoS One*. 2013;8(2):e56407.

291. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
292. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279-312.
293. Pinto IC, Cerqueira-Coutinho C, Freitas ZMFd, Santos EPd, Carmo FAd, Ricci Junior E. Development and validation of an analytical method using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to determine ethyl butylacetylaminopropionate in topical repellent formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2017;53.
294. Frozza RL, Bernardi A, Hoppe JB, Meneghetti AB, Battastini AM, Pohlmann AR, et al. Lipid-core nanocapsules improve the effects of resveratrol against Abeta-induced neuroinflammation. *J Biomed Nanotechnol.* 2013 Dec;9(12):2086-104.
295. Diaspro A, Krol S, Cavalleri O, Silvano D, Gliozzi A. Microscopical characterization of nanocapsules templated on ionic crystals and biological cells toward biomedical applications. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2002 Sep;1(3):110-5.
296. Rossi D, Guerrini A, Bruni R, Brognara E, Borgatti M, Gambari R, et al. trans-Resveratrol in nutraceuticals: issues in retail quality and effectiveness. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2012;17(10):12393-405.
297. Aqil F, Munagala R, Jeyabalan J, Vadhanam MV. Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. *Cancer Lett.* 2013 Jun 28;334(1):133-41.
298. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(2):133-49.
299. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics.* 1989 1989/10/01;55(1):R1-R4.
300. Miladi K, Sfar S, Fessi H, Elaissari A. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. . In: Vauthier C. PG, editor. *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines Chapter 2.* Springer, Cham 2016.
301. Lassalle V, Ferreira ML. PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. *Macromol Biosci.* 2007 Jun 7;7(6):767-83.
302. Bulcão RP, Freitas FA, Venturini CG, Dallegrave E, Durgante J, Göethel G, et al. Acute and Subchronic Toxicity Evaluation of Poly(ϵ -Caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules in Rats. *Toxicological Sciences.* 2013;132(1):162-76.

303. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 May 1;64(6):557-70.
304. Managuli RS, Raut SY, Reddy MS, Mutalik S. Targeting the intestinal lymphatic system: a versatile path for enhanced oral bioavailability of drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2018 Aug;15(8):787-804.
305. Baradaran Rahimi V, Rakhshandeh H, Raucci F, Buono B, Shirazinia R, Samzadeh Kermani A, et al. Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activity of *Portulaca oleracea* Extract on LPS-Induced Rat Lung Injury. *Molecules.* 2019 Jan 1;24(1).
306. Zhang Q, Nie J, Chen SJ, Li Q. Protective effects of ethyl gallate and pentagalloylglucose, the active components of Qingwen Baidu Decoction, against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:71-7.
307. Tian C, Zhang P, Yang J, Zhang Z, Wang H, Guo Y, et al. The protective effect of the flavonoid fraction of *Abutilon theophrasti* Medic. leaves on LPS-induced acute lung injury in mice via the NF- κ B and MAPK signalling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019 2019/01/01;109:1024-31.
308. Ye J, Guan M, Lu Y, Zhang D, Li C, Zhou C. Arbutin attenuates LPS-induced lung injury via Sirt1/Nrf2/NF-kappaBp65 pathway. *Pulm Pharmacol Ther.* 2019 Feb;54:53-9.
309. Li W, Zang L, Liu F, Yao Q, Zhao J, Zhi W, et al. Fraxin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting the NF-kappaB and NLRP3 signalling pathways. *Int Immunopharmacol.* 2019 Feb;67:1-12.
310. Liu JX, Li X, Yan FG, Pan QJ, Yang C, Wu MY, et al. Protective effect of forsythoside B against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by attenuating the TLR4/NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol.* 2019 Jan;66:336-46.
311. Khilnani GC, Hadda V. Corticosteroids and ARDS: A review of treatment and prevention evidence. *Lung India.* 2011 Apr;28(2):114-9.
312. Weigelt JA, Norcross JF, Borman KR, Snyder WH, 3rd. Early steroid therapy for respiratory failure. *Arch Surg.* 1985 May;120(5):536-40.
313. Hough CL. Steroids for acute respiratory distress syndrome? *Clinics in chest medicine.* 2014;35(4):781-95.
314. Soldati PP, Polonini HC, Paes CQ, Restrepob JAS, Creczynski-Pasa TB, Chaves MGAM, et al. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect. *IFAC-PapersOnLine.* 2018 2018/01/01;51(27):16-21.

315. Lee JH, Yeo Y. Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers. *Chem Eng Sci.* 2015 Mar 24;125:75-84.
316. Kamaly N, Yameen B, Wu J, Farokhzad OC. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical reviews.* 2016;116(4):2602-63.
317. Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H. Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options. *J Thorac Dis.* 2013 Jun;5(3):326-34.
318. Mirzapioiazova T, Kolosova IA, Moreno L, Sammani S, Garcia JG, Verin AD. Suppression of endotoxin-induced inflammation by taxol. *Eur Respir J.* 2007 Sep;30(3):429-35.
319. Glaab T, Taube C, Braun A, Mitzner W. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respir Res.* 2007 Sep 14;8:63.
320. Balamayooran G, Batra S, Balamayooran T, Cai S, Jeyaseelan S. Monocyte chemoattractant protein 1 regulates pulmonary host defense via neutrophil recruitment during *Escherichia coli* infection. *Infect Immun.* 2011 Jul;79(7):2567-77.
321. Held HD, Uhlig S. Mechanisms of endotoxin-induced airway and pulmonary vascular hyperreactivity in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Oct;162(4 Pt 1):1547-52.
322. Gattinoni L, Chiumello D, Carlesso E, Valenza F. Bench-to-bedside review: chest wall elastance in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care.* 2004 Oct;8(5):350-5.
323. Zwahlen R, Walz A, Rot A. In vitro and in vivo activity and pathophysiology of human interleukin-8 and related peptides. *Int Rev Exp Pathol.* 1993;34 Pt B:27-42.
324. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982 Mar;78(3):206-9.
325. Sener G, Topaloglu N, Sehirli AO, Ercan F, Gedik N. Resveratrol alleviates bleomycin-induced lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20(6):642-9.
326. Lanz-Landazuri A, Portilla-Arias J, Martinez de Ilarduya A, Garcia-Alvarez M, Holler E, Ljubimova J, et al. Nanoparticles of esterified poly(malic acid) for controlled anticancer drug release. *Macromol Biosci.* 2014 Sep;14(9):1325-36.
327. Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J.* 1998 Mar;11(3):745-57.

328. Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K. Endotoxin-induced pulmonary vascular injury is mainly mediated by activated neutrophils in rats. *Thromb Res.* 1995 Apr 15;78(2):117-25.
329. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007 Nov;37 Suppl 1:S34-45.
330. De Filippo K, Henderson RB, Laschinger M, Hogg N. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J Immunol.* 2008 Mar 15;180(6):4308-15.
331. Pan ZZ, Parkyn L, Ray A, Ray P. Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential recruitment of neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Oct;279(4):L658-66.
332. Tumpey TM, Fenton R, Molesworth-Kenyon S, Oakes JE, Lausch RN. Role for macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), MIP-1alpha, and interleukin-1alpha in the delayed-type hypersensitivity response to viral antigen. *J Virol.* 2002 Aug;76(16):8050-7.
333. Wang Y, Wang X, Zhang L, Zhang R. Alleviation of Acute Lung Injury in Rats with Sepsis by Resveratrol via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Nuclear Factor-Erythroid 2 Related Factor 2/Heme Oxygenase-1 (PI3K/Nrf2/HO-1) Pathway. *Med Sci Monit.* 2018 May 30;24:3604-11.
334. Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, et al. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *J Physiol Pharmacol.* 2009 Oct;60 Suppl 4:111-6.
335. Kietzmann D, Kahl R, Muller M, Burchardi H, Kettler D. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med.* 1993;19(2):78-81.
336. Cetinkaya A, Kurutas EB, Buyukbese MA, Kantarceken B, Bulbuloglu E. Levels of malondialdehyde and superoxide dismutase in subclinical hyperthyroidism. *Mediators Inflamm.* 2005 Feb 24;2005(1):57-9.
337. Yasui K, Kobayashi N, Yamazaki T, Agematsu K, Matsuzaki S, Ito S, et al. Superoxide dismutase (SOD) as a potential inhibitory mediator of inflammation via neutrophil apoptosis. *Free Radic Res.* 2005 Jul;39(7):755-62.

338. Truong VL, Jun M, Jeong WS. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*. 2018 Jan;44(1):36-49.
339. Qin X, Jiang X, Wang Y, Miao Z, He W, Yang G, et al. Micheliolide inhibits LPS-induced inflammatory response and protects mice from LPS challenge. *Sci Rep*. 2016 Mar 17;6:23240.
340. Zong Y, Sun L, Liu B, Deng YS, Zhan D, Chen YL, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e44107.
341. Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*. 2003 Jan;52(1):144-51.
342. Li Y, Zeng Z, Cao Y, Liu Y, Ping F, Liang M, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 prevents lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury via suppressing the ERK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. *Sci Rep*. 2016 Jun 15;6:27911.
343. Wang B, Gong X, Wan JY, Zhang L, Zhang Z, Li HZ, et al. Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011 Aug;24(4):434-41.
344. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Sep 1;4(9):a011189.
345. Xie S, Chen M, Yan B, He X, Chen X, Li D. Identification of a role for the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in innate immune cells. *PLoS One*. 2014;9(4):e94496.
346. Yan J, Li J, Zhang L, Sun Y, Jiang J, Huang Y, et al. Nrf2 protects against acute lung injury and inflammation by modulating TLR4 and Akt signaling. *Free Radic Biol Med*. 2018 Jun;121:78-85.
347. Jiang K, Guo S, Yang C, Yang J, Chen Y, Shaikat A, et al. Barbaloin protects against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury by inhibiting the ROS-mediated PI3K/AKT/NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol*. 2018 Nov;64:140-50.
348. Zhou B, Weng G, Huang Z, Liu T, Dai F. Arctiin Prevents LPS-Induced Acute Lung Injury via Inhibition of PI3K/AKT Signaling Pathway in Mice. *Inflammation*. 2018 Dec;41(6):2129-35.
349. Mohar DS, Malik S. The Sirtuin System: The Holy Grail of Resveratrol? *J Clin Exp Cardiol*. 2012 Nov;3(11).

350. Wang XL, Li T, Li JH, Miao SY, Xiao XZ. The Effects of Resveratrol on Inflammation and Oxidative Stress in a Rat Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Molecules*. 2017 Sep 12;22(9).
351. Birukova AA, Meng F, Tian Y, Meliton A, Sarich N, Quilliam LA, et al. Prostacyclin post-treatment improves LPS-induced acute lung injury and endothelial barrier recovery via Rap1. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May;1852(5):778-91.
352. Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, Worthen GS. Transcriptional profiling of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Infect Immun*. 2004 Dec;72(12):7247-56.
353. Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol*. 2015 May;27(3):149-60.
354. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Frontiers in Immunology*. [Review]. 2016 2016-April-26;7(160).
355. Zhao H, Han L, Jian Y, Ma Y, Yan W, Chen X, et al. Resveratrol induces apoptosis in human melanoma cell through negatively regulating Erk/PKM2/Bcl-2 axis. *Onco Targets Ther*. 2018;11:8995-9006.
356. Takashina M, Inoue S, Tomihara K, Tomita K, Hattori K, Zhao QL, et al. Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells. *Int J Oncol*. 2017 Mar;50(3):787-97.
357. Madreiter-Sokolowski CT, Gottschalk B, Parichatikanond W, Eroglu E, Klec C, Waldeck-Weiermair M, et al. Resveratrol Specifically Kills Cancer Cells by a Devastating Increase in the Ca²⁺ Coupling Between the Greatly Tethered Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2016;39(4):1404-20.
358. Li L, Qiu RL, Lin Y, Cai Y, Bian Y, Fan Y, et al. Resveratrol suppresses human cervical carcinoma cell proliferation and elevates apoptosis via the mitochondrial and p53 signaling pathways. *Oncol Lett*. 2018 Jun;15(6):9845-51.
359. Qin Y, Ma Z, Dang X, Li W, Ma Q. Effect of resveratrol on proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells may involve inhibition of the Hedgehog signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2014 Nov;10(5):2563-7.
360. Venkatadri R, Muni T, Iyer AK, Yakisich JS, Azad N. Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell Death Dis*. 2016 Feb 18;7:e2104.

361. Blanquer-Rossello MD, Hernandez-Lopez R, Roca P, Oliver J, Valle A. Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017 Feb;1861(2):431-40.
362. Zielińska-Przyjemska M, Ignatowicz E, Krajka-Kuźniak V, Baer-Dubowska W. Effect of tannic acid, resveratrol and its derivatives, on oxidative damage and apoptosis in human neutrophils. *Food and Chemical Toxicology*. 2015 2015/10/01/;84:37-46.
363. Liu B, Zhang B, Guo R, Li S, Xu Y. Enhancement in efferocytosis of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptotic RAW264.7 cells through Sirt1-mediated autophagy. *Int J Mol Med*. 2014 Mar;33(3):523-33.
364. Tsay GJ. Resveratrol increases efferocytosis via both Mertk-GAS6/PROS and Integrin-TG2-Mfge8 pathway. *The Journal of Immunology*. 2018;200(1 Supplement):176.9.
365. Branger J, van den Blink B, Weijer S, Madwed J, Bos CL, Gupta A, et al. Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia. *J Immunol*. 2002 Apr 15;168(8):4070-7.
366. Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer*. 2012 Jul 19;12(8):564-71.
367. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2018 2018/12/01/;54(4):287-93.
368. Zhou ZX, Mou SF, Chen XQ, Gong LL, Ge WS. Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NFkappaB in animal models of acute pharyngitis. *Mol Med Rep*. 2018 Jan;17(1):1269-74.
369. Yusuf N, Nasti T, Elmets C. Toll like receptor-4 (TLR4): Novel target for chemoprevention of DMBA induced cutaneous carcinogenesis by Resveratrol. *Cancer Research*. 2008;68(9 Supplement):3057.
370. Yang Y, Li S, Yang Q, Shi Y, Zheng M, Liu Y, et al. Resveratrol reduces the proinflammatory effects and lipopolysaccharide- induced expression of HMGB1 and TLR4 in RAW264.7 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(5):1283-92.
371. Capiralla H, Vingtdoux V, Zhao H, Sankowski R, Al-Abed Y, Davies P, et al. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. *Journal of neurochemistry*. 2012;120(3):461-72.

372. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *The American journal of pathology*. 2000;156(4):1363-80.
373. Riemann A, Ihling A, Thomas J, Schneider B, Thews O, Gekle M. Acidic environment activates inflammatory programs in fibroblasts via a cAMP-MAPK pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1853(2):299-307.
374. Balamuralidhara V, Pramodkumar TM, Srujana N, Venkatesh MP, Vishal Gupta N, Krishn KL, et al. pH Sensitive Drug Delivery Systems: A Review. *American Journal of Drug Discovery and Development*. 2011(1):24-48.