

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FRANCISCO DA SILVA DOS SANTOS

**EFEITO DO ÔMEGA 3 NANOESTRUTURADO EM ANIMAIS DESAFIADOS
COM LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) NO PULMÃO**

Rio de Janeiro – Niterói

2024

FRANCISCO DA SILVA DOS SANTOS

**EFEITO DO ÔMEGA 3 NANOESTRUTURADO EM ANIMAIS
DESAFIADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) NO PULMÃO**

Trabalho desenvolvido no laboratório de imunofarmacologia no Instituto Oswaldo Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense, Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPERJ, IOC, UNIRIO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia da Universidade Federal Fluminense no Rio de Janeiro – Niterói como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Albuquerque. Coorientadoras: Patrícia Burth e Adriana Ribeiro Silva.

Rio de Janeiro

2024

FRANCISCO DA SILVA DOS SANTOS

**EFEITO DO ÔMEGA 3 NANOESTRUTURADO EM ANIMAIS
DESAFIADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) NO PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia da Universidade Federal Fluminense no Rio de Janeiro – Niterói como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências e Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque (Presidente)
Universidade federal Fluminense - UFF

Prof. Dra. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão Universidade Federal
Fluminense - UFF

Prof. Dr. Caroline de Souza Barros Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dra. Cristiane Rocha Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro -
UNIRIO (Membro Externo)

Prof. Dr. Kauê Francisco Corrêa de Souza e Souza - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO (Membro suplente)

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

E237e	<p>Santos, Francisco da Silva EFEITO DO ÔMEGA 3 NANOESTRUTURADO EM ANIMAIS DESAFIADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO (LPE) NO PULMÃO / Francisco da Silva Santos. - 2024. 70 f.: il.</p> <p>Orientador: Cassiano Albuquerque. Coorientador: Adriana Ribeiro Silva. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, 2024.</p> <p>1. Imunofarmacologia. 2. Produção intelectual. I. Albuquerque, Cassiano, orientador. II. Silva, Adriana Ribeiro, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>CDD - XXX</p>
-------	---

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

Dedico todo meu esforço ao meu pai, meu herói e a memória de minha mãe que sempre incentivou e despertou na minha vida o amor pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a oportunidade de crescer intelectualmente e profissionalmente através dos conhecimentos científicos que são constantemente enaltecidos pela academia. Agradeço por estar presente nesse lugar onde a ciência e a história são escritas, vivenciando diariamente conhecimentos na prática e incentivando a divulgação dos saberes, difusão das informações para a sociedade.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, e em especial meus orientadores, Cassiano Albuquerque por me receber no laboratório em momento pandêmico, onde a esperança na ciência estava reduzida pelos constantes cortes que as universidades recebiam e pela situação delicada do momento. Agradeço por sempre apresentar a capacidade de solucionar e contornar qualquer situação que atrapalhe o encaminhar dos experimentos. Agradeço a minha coorientadora Patrícia Burth, sempre atenciosa. Agradeço imensamente a minha coorientadora professora Doutora Adriana Ribeiro por ser uma profissional completa e humanizada, sendo acolhedora e amável em todos os momentos. Em especial os mais delicados. Agradeço pelo incentivo e confiança depositada. Agradeço pelas palavras encorajadoras e gentis, sem sombra de dúvidas, hoje, minha coorientadora é meu maior exemplo de profissional. Devolver um trabalho de excelência é uma das formas de retribuir a sua dedicação e acolhimento, sendo assim, muito obrigado Doutora Adriana Ribeiro.

Agradeço a minha família, meu pai que sempre foi meu herói, meu maior apoiador, sem ele não conseguiria estar onde estou. Agradeço aos meus irmãos Gabriel da Silva e João Victor que são meu maior orgulho. Agradeço aos amigos próximos como Fernanda Tavares, Rayza Maia, Stephane Lourenço e Lucas França que são amizades leais que a vida me deu. Agradeço ao meu amor, Leandro Rocha o ser mais amável que eu poderia encontrar, obrigado por suportar tudo ao meu lado.

Finalmente, agradeço a memória da minha mãe, sem ela não estaria aqui, e graças a ela sou apaixonado pelo conhecimento e pela ciência, devo tudo a ela.

Sumário

Lista de ilustrações.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 SINDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO – (SDRA)	17
1.2 SEPSE	21
1.3 ÔMEGA 3.....	23
1.4 ÔMEGA 3 (DHA) NANOESTRUTURADO.....	27
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS:	32
4. RESULTADOS	38
5. DISCUSSÃO	48
6.1 CONCLUSÃO.....	56
7. Referências Bibliográficas.....	58
8 Obras Consultadas.....	74

Lista de abreviaturas

A549 - Célula do epitélio pulmonar Tipo II

AINES – Anti-inflamatório não esteroidais

AKT - Proteína quinase B

COX1 – Ciclooxygenase 1

COX2 – Ciclooxygenase 2

CXCL1/KC – Quimiocina (murino)

DHA - Ácido docosahexaenoico

FFA4 – Receptor de ácido graxo 4

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

EPA - Ácido eicosapentaenoico

EPM - Erro médio padrão

ERN – Espécie reativa de Nitrogênio

ERO – Espécie reativa de oxigênio

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HOCl – Ácido hipocloroso

IL – 12 - Interleucina-12

IL- 10 - Interleucina-10

IL- 8/CXCL8 - Interleucina 8

IL- 1 β - Interleucina-1beta

IL- 6 - Interleucina-6

JNK – Proteína quinase ativada por mitógeno

LBA - Lavado broncoalveolar

LPS - Lipopolissacarídeo

MAPK - Proteínas-quinase ativada por mitógeno

M1 - Macrófago M1

M2 - Macrófago M2

mg - Miligramas

mL - Mililitros

MODS – Disfunção de múltiplos órgãos

NBT - Tetrazólio nitroazul

NF-kB - Fator de Transcrição kB

NHLBI – Instituto do coração, pulmão e sangue

ng – Nanograma

NO – Óxido Nítrico

O₂⁻ - Radical iônico superóxido

OH⁻ –Hidroxila

PDX – Protectina DX

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PMN – Neutrófilos Polimorfonucleados

PaO₂/FiO₂ - Pressão arterial de oxigênio/ fração inspirada de oxigênio

PPAR - Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma

PUFA - Ácidos graxos poli-insaturados

Rhoa – Proteína transportadora

ROS – Radicais livres

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

TAB1 - proteína codificada que interage com MAP3K7

TAK1 – Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno 7

TLR4 – Receptor do tipo Toll

TNF α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

uM – Micromolar

UTI – Unidade de terapia intensiva

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fisiopatologia da SDRA.....	19
Figura 2: Efeito anti-inflamatório dos PUFAS ômega 3	26
Figura 3: Desenho experimental <i>In vivo</i> do modelo de indução de inflamação pulmonar (SDRA) através da instilação com LPS ou Salina e pré-tratamento com o ômega 3 nanoestruturado via intraperitoneal.....	36
Figura 4: Desenho experimental <i>In vitro</i> do modelo de indução de inflamação pulmonar (SDRA) através do desafio com LPS e pré-tratamento com o ômega 3 livre e nanoestruturado nas células do epitélio pulmonar do tipo II A549.....	38
Figura 5: Lâminas do Lavado Broncoalveolar (LBA).....	41
Figura 6: Efeito do tratamento com a NanoDHA nas concentrações de Leucócitos induzidos pelo LPS.....	43
Figura 7: Efeito do tratamento com a NanoDHA nas concentrações de citocinas induzidas pelo LPS.....	44
Figura 8: Teste de Griess determinando concentração de óxido nítrico nas amostras do LBA estimuladas com LPS e tratadas com NanoDHA.....	45
Figura 9: Ensaio de viabilidade em célula do epitélio alveolar tipo II - A549.....	47
Figura 10: Efeito do tratamento com a NanoDHA e DHA Livre nas concentrações de citocinas induzidas pelo LPS no pneumócito pulmonar do tipo II A549.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado da distribuição e intensidade das nanopartículas LNC DHA gerado pelo Nanosizer. Todas as análises realizadas em triplicatas.....XXXIX

Tabela 2 - Tamanho e distribuição das nanopartículas LNC DHA – Realizado pelo Mastersize.....XL

RESUMO

O efeito da administração do ômega 3 (DHA) nanoestruturado na resposta imunológica decorrente do desafio inflamatório utilizando Lipopolissacarídeo (LPS) no pulmão de camundongos *in vivo*, assim como seu efeito na inflamação das células do epitélio pulmonar do tipo II A549 *in vitro*. Quarenta e dois camundongos foram divididos em 6 grupos tendo 7 indivíduos cada: Salina, NanoBranco, NanoDHA, LPS, LPS+NanoBranco e LPS+NanoDHA. Os grupos NanoDHA e LPS+NanoDHA foram pré-tratados com o DHA nanoestruturado via intraperitoneal a 3mg/kg no primeiro dia e os demais grupos foram pré-tratados com salina a nível intraperitoneal. No segundo dia os animais sofreram o desafio com o LPS 500 ng instilado via intratraqueal. Após 24h foi realizada a eutanásia, seguido da coleta do lavado broncoalveolar (LBA), contagem de leucócito total e diferencial, concentração de proteínas totais, medições de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 e CXCL1/KC e concentração de óxido nítrico NO no LBA. Os resultados *in vivo* mostram que o pré-tratamento diminui o número total de leucócitos, células mononucleadas, neutrófilos, assim como o conteúdo de proteínas totais, óxido nítrico, IL-1 β , TNF- α , IL-10. Contudo, não houve redução significativa na concentração de CXCL1 e IL-6 entre os grupos desafiados com LPS e pré-tratados com a NanoDHA. Nos experimentos *in vitro* utilizando as células do epitélio pulmonar do tipo II (A549), foi possível analisar que nenhuma das concentrações do DHA livre e o nanoestruturado apresentaram citotoxicidade. Na medição das citocinas foi possível verificar redução IL-8/CXCL8 com NanoDHA 1 μ M, embora o DHA nanoencapsulado tenha sido utilizado a uma concentração 200 vezes menor. Concluímos que o pré-tratamento com o (DHA) nanoestruturado apresenta potencial para minimizar processos inflamatórios pulmonares frente ao estímulo com LPS em estudos *in vivo* e *in vitro*.

Palavras-chave: ômega 3; nanoDHA; SDRA; injúria pulmonar; LPS.

ABSTRACT

The effect of administration of nanostructured omega 3 (DHA) on the immune response resulting from the inflammatory challenge using Lipopolysaccharide (LPS) in the lung of mice in vivo, as well as its effect on the inflammation of type II A549 lung epithelial cells in vitro. Forty-two mice were divided into 6 groups with 7 individuals each: Saline, NanoBranco, NanoDHA, LPS, LPS+NanoBranco and LPS+NanoDHA. The NanoDHA and LPS+NanoDHA groups were pre-treated with nanostructured DHA intraperitoneally at 3mg/kg on the first day and the other groups were pre-treated with saline intraperitoneally. On the second day, the animals were challenged with LPS 500 ng instilled intratracheally. After 24 hours, euthanasia was performed, followed by collection of bronchoalveolar lavage (BAL), total and differential leukocyte count, total protein concentration, measurements of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 and CXCL1/KC and nitric oxide NO concentration in BAL. In vivo results show that pretreatment decreases the total number of leukocytes, mononucleated cells, neutrophils, as well as the content of total proteins, nitric oxide, IL-1 β , TNF- α , IL-10. However, there was no significant reduction in the concentration of CXCL1 and IL-6 between the groups challenged with LPS and pre-treated with NanoDHA. In in vitro experiments using type II lung epithelial cells (A549), it was possible to analyze that none of the concentrations of free and nanostructured DHA showed cytotoxicity. When measuring cytokines, it was possible to verify a reduction in IL-8/CXCL8 with NanoDHA1 μ M, although nanoencapsulated DHA was used at a concentration 200 times lower. We conclude that pre-treatment with nanostructured (DHA) has the potential to minimize pulmonary inflammatory processes in the face of LPS stimulation in in vivo and in vitro studies.

Keywords: omega 3; nanoDHA; ARDS; lung injury; LPS.

1. INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO – (SDRA)

Uma diversidade de enfermidades que culminam em inflamação pulmonar, dano alveolar e edema pulmonar é denominada de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (LUYT *et al.*, 2020). Seu desenvolvimento é caracterizado pela perda sequencial da integridade da membrana alvéolo capilar, acúmulo de líquido no espaço extravascular e perda de volume de troca gasosa pulmonar, que resulta em lesões difusas das células epiteliais alveolares e endoteliais nos capilares do pulmão (LIU, Chang; XIAO, Kun; XIE, Lixin., 2022; Gonçalves-deAlbuquerque., 2015).

Classificada como uma síndrome de inflamação e aumento da permeabilidade capilar pulmonar, a SDRA foi redefinida por um consenso de especialistas sendo excluído o termo lesão pulmonar aguda (LPA), pois segundo a nova e mais atual definição desenvolvida em Berlim no ano de 2012, forneceu a primeira descrição sistemática desta condição, enfatizando a classificação no grau de hipoxemia: leve, moderada e grave, por meio da avaliação da relação entre a pressão parcial de oxigênio no sangue (PaO₂) e a fração inspirada de oxigênio (FiO₂) (SÁ, Amanda Vianna de Souza de., 2019; Roux J *et al.*, 2013).

Essa inflamação vigorosa ocasiona lesão alveolar resultando em ruptura da barreira alvéolo-capilar, levando ao extravasamento de proteínas plasmáticas. Além da ativação de outras células efetoras, como neutrófilos, macrófagos, endotélio e ativação do epitélio (YILDIRIM, Fatma. *et al.*, 2021;

MATTHAY, Michael A. *et al.*, 2012) (Figura 1). Na fase aguda, citocinas e lipídios são liberados, levando à perda da barreira alvéolo-capilar e formação de membrana hialina (YILDIRIM, Fatma, *et al.*, 2021; M. A. Matthay, *et al.*, 2012). O epitélio pulmonar é composto por uma camada compacta de células epiteliais alveolares planas tipo I com células epiteliais alveolares tipo II intercaladas, e com base na expressão de moléculas de adesão e ativação de vias pró-inflamatórias no local a gravidade da lesão do epitélio pulmonar pode variar (RIZZO, Alicia N. *et al.*, 2022). Lesão nas células do tipo II pode prejudicar a produção de surfactante, podendo aumentar a suscetibilidade à infecção secundária. O dano à barreira epitelial do pulmão facilita a inundação alveolar e prejudica o transporte de fluido pelo epitélio alveolar, impossibilitando o mecanismo normal para manter o espaço aéreo seco (BOS, Lieuwe DJ; WARE, Lorraine B., 2022). O surfactante pulmonar cobre o espaço alveolar e reduz bastante a tensão superficial alveolar, tornando a respiração possível em gradientes normais de pressão transpulmonar (WASNICK, Roxana *et al.*, 2023). A lesão nos alvéolos causa consequências graves no sistema surfactante e na homeostase alveolar, induzindo um ciclo vicioso de aumento da tensão superficial (WASNICK, Roxana *et al.*, 2023).

Numerosas citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis importantes na inflamação aguda e no desenvolvimento da SDRA. Citocinas como, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 apresentam níveis elevados nos pulmões de pacientes com SDRA, assim como os altos níveis dessas citocinas foram encontrados em pacientes que vinham a óbito (OLIVEIRA, Maria Talita Pacheco *et al.*, 2019). As quimiocinas também apresentam papel importante no desencadeamento da inflamação, a literatura tem mostrado que a IL-8 (CXCL8), parece desempenhar um papel central na regulação do recrutamento de neutrófilos e, conseqüente, no dano tecidual, alterando a permeabilidade alvéolo-capilar em humanos e animais (GOMES, Sharla Paes., 2023; Han S, Mallampalli RK., 2015; OLIVEIRA).

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 (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e ácido hipocloroso ($HOCl$); espécies reativas de nitrogênio (ERN), derivados do óxido nítrico (NO) sendo o catabolismo do (NO) considerado um importante indicador do estresse oxidativo no processo inflamatório. (SANTOS, Laise Aline Martins dos *et al.*, 2018). As espécies reativas de oxigênio podem levar à lesão do DNA, peroxidação lipídica com formação de moléculas vasoativas e pró-inflamatórias, oxidação de proteínas e alteração de fatores de transcrição, como o NF- κ B e ativação da fosforilação da MAPK, aumentando a expressão de genes pró-inflamatório (OLIVEIRA, Maria Talita Pacheco *et al.*, 2019).

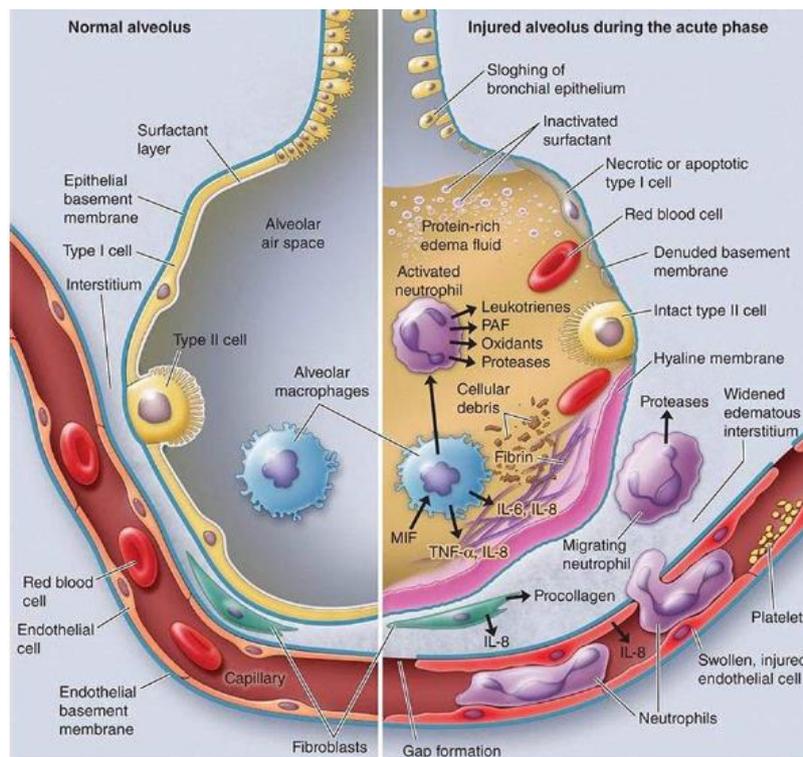


Figura 1. Fisiopatologia da SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. Alvéolo pulmonar normal (lado esquerdo) e Alvéolo pulmonar lesionado na SDRA (lado direito). Copyright 2000 Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados. (BORGES, Aline Morás, 2018).

Em 2016, um estudo de pacientes em 459 unidades de terapia intensiva (UTIs) de 50 países relatou que 10% dos pacientes de UTI e 23% dos pacientes em ventilação mecânica preenchem os critérios para SDRA. A mortalidade hospitalar de 35–45% se assemelhava muito à descrita pelos grandes conjuntos de dados usados para validar a definição de Berlim (MEYER, Nuela J *et al.*, 2021). A mortalidade precoce muitas vezes está relacionada ao fator causal da lesão pulmonar, e a mortalidade tardia está mais associada as complicações, por exemplo: sepse e falência de múltiplos órgãos (MÁCA, *et al.*, 2017).

Décadas de pesquisa não conseguiram encontrar terapias eficazes que reduzissem a mortalidade na SDRA estabelecida. Existem dados pré-clínicos promissores que apoiam o papel das terapias preventivas. O *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI) recomendou que futuras pesquisas sobre SDRA fossem direcionadas principalmente para a sua prevenção, e tem financiado uma rede de ensaios clínicos para tratamento precoce na SDRA (WILLIAMS, H.K *et al.*, 2021; SPRAGG, Roger G. *et al.*, 2010). A prevenção primária é onde há uma tentativa de mitigar os fatores de risco para o desenvolvimento de uma doença, alterando os comportamentos e exposições antes do início da doença. As estratégias de prevenção primária tendem a ser universais, sendo dadas a todos os pacientes, sejam eles considerados com risco aumentado de desenvolver SDRA ou não. (Yadav H, *et al.*, 2017).

Estímulos tão variados quanto hipóxia, citocinas, quimiocinas, trombina, leucócitos, lipopolissacarídeos (LPS) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) podem levar o endotélio para um estado desregulado e permeável que atrai células inflamatórias (Millar FR *et al.*, 2016). Os modelos experimentais de SDRA utilizam ferramentas diversas para causar a inflamação pulmonar e a utilização do LPS é um dos modelos mais difundidos, devido à facilidade de administração e reprodutibilidade dos protocolos experimentais, apresentando respostas semelhantes às infecções bacterianas,

além de serem protocolos rápidos e confiáveis para triagem e otimização de novas drogas (REIS, Gustavo Oliveira dos *et al.*, 2022). O LPS causa dano pulmonar agudo em camundongos 24h após a administração intranasal ou intratraqueal, com o influxo de neutrófilos e citocinas acontecendo a partir de 4-6h (Chen H, Bai C, Wang X., 2010).

1.2 SEPSE

A sepse é uma síndrome clínica caracterizada por uma inflamação sistêmica, gerada por uma resposta imune desregulada em decorrência a uma infecção (BARICHELLO, Tatiana *et al.*, 2022; BECKER *et al.*, 2009). A resposta sistêmica à infecção é marcada pela presença expressiva de citocinas, acarretando um descontrole hemodinâmico e metabólico que pode resultar em choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos (MODS) e morte (VACHHARAJANI *et al.*, 2014). Muitos fatores podem desencadear a sepse como infecções por bactérias Gram (-), polimicrobiana (MAGNO *et al.*, 2020; Gonçalves-de-Albuquerque *et al.*, 2018) ou por pneumonia induzida por bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (Gonçalves-de-Albuquerque *et al.*, 2016a), entre outras causas.

A presença expressiva de citocinas durante a sepse pode levar a inflamação pulmonar e ao desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (LI, Wenli *et al.*, 2022), pois a síndrome pode ser considerada uma lesão pulmonar difusa aguda, dividida em dois grupos: a SDRA pulmonar que é provocada por insultos diretos ao epitélio alveolar (pneumonia) e a SDRA extrapulmonar que é provocada por insultos indiretos por meio do endotélio vascular (pancreatite, lesões traumáticas graves, sepse e

múltiplas transfusões são as mais comuns) (BOS, Lieuwe DJ; WARE, Lorraine B., 2022; MARON-GUTIERREZ, 2013).

O sistema imunológico inato funciona como a primeira linha de defesa contra patógenos através do reconhecimento de seus padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) microbianos altamente conservados que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão, incluindo receptores semelhantes a Toll nas células do sistema imunológico (KUMAR, Vijay *et al.*, 2020). Essa interação desencadeia a liberação de mediadores pró-inflamatórios através da ativação do fator de transcrição NF- κ B, recrutamento de neutrófilos e liberação de citocinas, TNF- α , interleucina 1, interleucina 2, interleucina 6, interleucina 8 e outras, causando adesão neutrófilo-célula endotelial, ativam o sistema complemento através de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e ativação das cascatas de coagulação (LIU, Di *et al.*, 2022.; HOTCHKISS Richard S *et al.*, 2016). A IL-8 apresenta uma homologia funcional em camundongos que é a KC (CXCL1), usualmente dosada em modelos experimentais (PINHEIRO, Nathalia Montouro., 2016). Muitos componentes da imunidade inata apresentam efeitos paradoxais na regulação da homeostase (LIU, Di *et al.*, 2022). Esse processo de resposta imune, quando desregulado, pode levar a danos teciduais extensos e sequelas físicas, além de comprometimento cognitivo e incapacidade funcional em longo prazo (CASTRO Léo Victor G *et al.*, 2022).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde e a Assembleia Mundial da Saúde reconheceram como prioridade de saúde global, adotando um plano de ação para todos os membros das Nações Unidas, com foco na melhoria da prevenção, diagnóstico e tratamento da sepse (Gu, Xiaoying *et al.*, 2020; CASTRO Léo Victor G *et al.*, 2022). Para diminuir os riscos de sequelas em longo prazo da sepse, as diretrizes atuais para seu manejo, concentram-se no reconhecimento e tratamentos precoces (CASTRO Léo Victor G *et al.*, 2022).

A injeção de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram (-) pode induzir lesão pulmonar semelhante à observada nos modelos de sepse bacteriana (Domscheit *et al.*, 2020, Liu *et al.*, 2015). Em camundongos, induz dano pulmonar grave e é um modelo animal de SDRA prevalente (KASPI, Haggao *et al.*, 2021). Via estresse oxidativo mediado por TLR4 provoca infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, nos pulmões lesionados, agravando ainda mais a resposta inflamatória (DHLAMINI, Qhaweni *et al.* 2022).

1.3 ÔMEGA 3

A família dos ômega 3 são ácidos graxos poli-insaturados PUFAs, comumente encontrados em peixes considerados de água fria, por exemplo: salmão, atum, sardinha e bacalhau, podem ser encontrados também em óleos vegetais, sementes de linhaça, nozes e alguns tipos de vegetais (CANAS, Gustavo Jose Sandoval *et al.*, 2019). O ômega-3 é definido como o ácido graxo que têm seu primeiro carbono insaturado no terceiro carbono da extremidade ômega da molécula, a localização da primeira dupla ligação contada a partir do final ômega determina se um ácido graxo pertence à família ômega-6, ômega-3 ou outro ômega (AGUIAR NETO, Wanderlino de Sousa *et al.*, 2018). Os seres humanos não podem interconverter o ácido graxo ômega-3 e ômega-6 entre si, nem podem sintetizar qualquer um desses ácidos graxos a partir do zero, portanto o ácido α -linolênico (ômega 3) são ácidos graxos essenciais porque a dupla ligação, situada no terceiro carbono, não pode ser produzidas pelo organismo humano, de forma que os ácidos graxos essenciais devem ser obtidos a partir da dieta (SANTOS, Verônica Lisboa., 2016; AGUIAR NETO, Wanderlino de Sousa *et al.*, 2018).

Os ômega 3 são uma classe de PUFAs que estão envolvidos com a produção de diversos mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos (WATANABE, Yasuhiro., 2020; CALDER, 2013). Os derivados do ômega 3 ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) apresentaram diversas propriedades anti-inflamatórias, derivadas de seus mediadores como resolvina E1, resolvina D1 e protectina D1, que inibem a transmigração endotelial de neutrófilos para sítios de inflamação e a produção de IL-1 β e TNF- α (WATANABE, Yasuhiro., 2020; CALDER, 2013). Com a inibição da produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β e também na mudança do perfil ativatório de macrófago, pro-inflamatório M1 para perfil ativatório anti-inflamatório M2. O EPA e o DHA também regulam negativamente o NF- κ B, pois são agonistas dos PPAR gama (Jung, T et al., 2022; NOVAK, et al. 2003). Destacamos o fato de os ômega 3 serem agonistas dos PPAR gama, tendo efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos no pulmão, discutidos por nosso grupo (CARVALHO et al., 2021). A ação do PPAR está relacionada à capacidade de interferir na translocação de NF- κ B do citoplasma para o núcleo (CARVALHO et al., 2021; VANDEN BERGHE *et al.*, 2003). O NF- κ B quando ativado induz a transcrição de uma serie de genes inflamatórios, incluindo aqueles que codificam COX-2, molécula de adesão, interleucina-1 (ICAM-1), proteína de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), E-selectina, TNF- α , IL-1 β , óxido nítrico sintase e proteína de fase aguda (ZÚÑIGA-HERNÁNDEZ, Jessica et al., 2022).

A síntese induzível do NO (iNOS) foi identificada como um regulador na progressão da lesão pulmonar e a concentração de NO tem sido utilizada para avaliar o grau da lesão pulmonar (MA, Huayi et al., 2020). Por outro lado os PUFAs ômega-3 podem proteger o pulmão contra a disfunção endotelial por meio da redução do estresse oxidativo (ZHU, Jie et al., 2022; KEMSE, Nisha G et al., 2014). O ômega-3 ativa o receptor de ácido graxo FFA4 nos macrófagos, e isso desencadeia o mecanismo envolvendo a interação entre b-arrestina-2 e FFA4 e subsequente formação de complexo com TAB1, que interfere na

ativação de TAK1 e resulta na repressão da fosforilação de Akt/JNK e COX-2 mediada pela indução de NF-kB (Velloso, Licio A., 2015).

A dieta do mediterrâneo é considerada uma das dietas mais saudáveis, sendo rica em ácidos graxos ômega 3 e 9. O azeite de oliva vem sendo utilizado há séculos e possui efeitos antioxidante e anti-inflamatório (TOMÉ-CARNEIRO *et al.*, 2020). A dieta suplementada com azeite de oliva, cujo principal componente é o ômega 9 (aproximadamente 70%), protegeu os animais submetidos ao choque endotóxico induzido por LPS segundo Leite, Pacheco *et al.* (2005). O nosso grupo mostrou que a suplementação com PUFAs leva à diminuição da lesão hepática e renal, da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), assumindo papel anti-inflamatório e inibidor do crescimento bacteriano em camundongos submetidos à sepse experimental (SILVA; MORAES & GONÇALVES-DE- ALBUQUERQUE, 2020). Os PUFAs regulam a inflamação gerando mediadores lipídicos pró-resolutivos (WATANABE, Yasuhiro., 2020; DUVAL *et al.*, 2016) (Figura 2). Por exemplo, leucotrienos B5, que é derivado de EPA, tem um potencial quimiotático de 10 a 30 vezes menos potente em neutrófilos do que derivado de leucotrieno B4 do ácido araquidônico (AA). Portanto, as respostas com EPA como substrato na síntese de eicosanóides tem menor potencial pró-inflamatório do que aqueles com AA como substrato (KUS-YAMASHITA, Mahyara Markievicz Mancio; MANCINI FILHO, Jorge., 2022). Além disso, o DHA tem ação antioxidante protegendo o pulmão contra danos oxidativos (CHEN *et al.*, 2013). Os mediadores lipídicos procedentes de PUFA, como protectina D1 e D2 derivados do DHA, apresentam importantes efeitos protetores no pulmão relatados por YAN *et al.*, (2021), e por WU *et al.*, (2021).

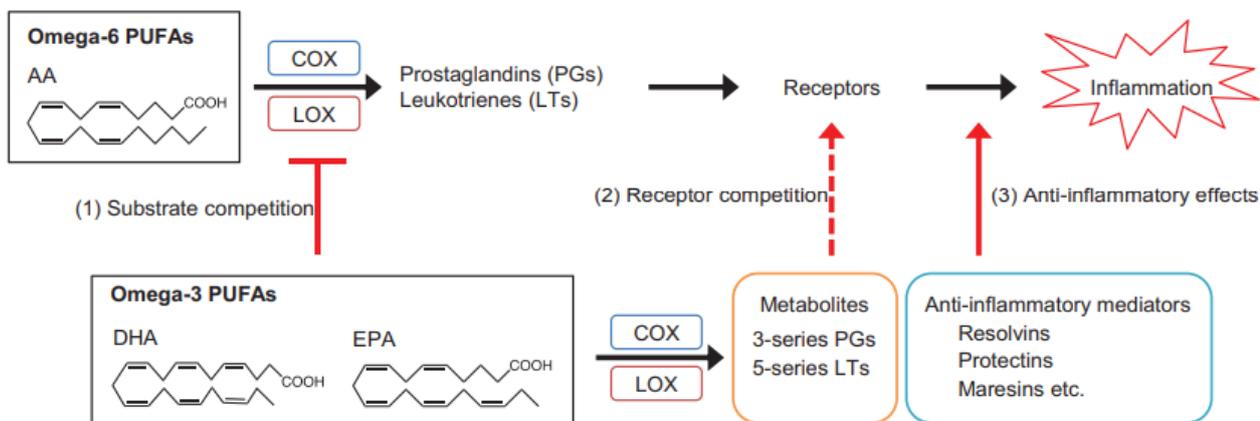


Figura 2. Efeitos anti-inflamatórios dos PUFAs ômega-3. Os PUFAs ômega-3 exercem seus efeitos benéficos pelos seguintes mecanismos: (1) substrato competição com ácido araquidônico (AA) ômega-6, (2) competição com receptores e (3) conversão em metabólitos anti-inflamatórios. (ISHIHARA, Tomoaki *et al.*, 2019).

O potencial preventivo dos n-3 PUFAs tornou-se um assunto de intenso interesse e debate. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como o ibuprofeno e o naproxeno, inibem COX1 e COX2 e são os analgésicos de venda livre mais popular, mostrando a eficácia dos metabólitos pró-inflamatórios do AA (DINICOLANTONIO, James J., 2018). Contudo, a inibição seletiva da COX-2 é uma faca de dois gumes, funcionando como um meio eficaz para a atividade anti-inflamatória, mas também promovendo eventos cardiovasculares trombóticos por perturbar a produção endotelial de prostaciclina (MITCHELL, Jane A. *et al.*, 2021; YU, Ying *et al.*, 2012). O risco elevado de complicações cardiovasculares em ensaios controlados por placebo resultou na retirada do mercado de alguns membros da classe de medicamentos inibidores seletivos da COX-2 (LI, Xinzhi *et al.*, 2013), abrindo perspectivas para a inclusão de diferentes terapias naturais que não apresentem os mesmos malefícios. Em vez de usar AINEs para inibir a COX-2 e formação de metabólitos do ômega-6 AA, a utilização do ômega 3 e seus mediadores lipídicos EPA/DHA na alimentação pode proporcionar um efeito

semelhante para prevenir a inflamação crônica de baixo grau (DINICOLANTONIO, James J., 2018).

1.4 ÔMEGA 3 (DHA) NANOESTRUTURADO.

Devido à barreira fisiológica pulmonar única, a eficiência na entrega de medicamentos aos pulmões é relativamente baixa, resultando em uma redução considerável na eficácia e em muitos efeitos colaterais. Além disso, a heterogeneidade da SDRA pode reduzir principalmente a eficácia terapêutica dos medicamentos testados (QIAO, Qi *et al.*, 2021). Fármacos livres podem não atingir o local e não apresentar o efeito desejado com a dose necessária, e as drogas em órgãos não-alvo podem estar associadas a reações colaterais (BLANCO, Elvin *et al.*, 2015).

Com distribuição de tamanho ajustável, propriedades de superfície ajustáveis e capacidade de modificação exclusiva para o direcionamento, os nanocarreadores demonstraram grande potencial na entrega de medicamentos para vários tratamentos de doenças (Gao HL *et al.*, 2016). Nanoencapsulação é definida como uma tecnologia para encapsular pequenos compostos bioativos e produzir formulações estáveis (Hardy A, Benford D. *et al.*, 2018). O sistema de nanotecnologia no campo dos medicamentos vem crescendo e trazendo diversos benefícios como o aumento de sua solubilidade, biodisponibilidade e liberação sustentada (sem picos de dosagem), possibilidade de ação direta na célula alvo, entre outras vantagens e tem sido usado para o tratamento de diversas doenças (PUTTAPPA *et al.*, 2019). Esses nanossistemas podem transportar drogas hidrofílicas e hidrofóbicas, pois possuem muitos grupos funcionais na periferia. Além disso, direcionam drogas para locais específicos e favorecem a captação celular, principalmente por

endocitose e difusão passiva (CHAVES, Janaina Braga *et al.*, 2022). Valores de diâmetro médio de partícula inferior a 300 nm e valores de índice de polidispersidade abaixo de 0,3 garantem homogeneidade na distribuição granulométrica e aglomeração reduzida (CLAYTON, Katherine N *et al.*, 2016). Essas características conferem aumento da fluidez da membrana facilitando a absorção transcelular, afrouxando as junções estreitas para permitir o transporte paracelular. Esses sistemas podem ser absorvidos diretamente pelo sistema linfático, evitando assim o metabolismo hepático (TRIPATHI, Chandra Bhushan *et al.*, 2018).

Entre os componentes disponíveis selecionados a nanocápsula de policaprolactona (PCL) é um polímero semicristalino que é biocompatível e biodegradável. PCL é um polímero rígido e a difusão do fármaco presente no núcleo das nanopartículas é muito devagar, assegurando a liberação sustentada (NIYOM, Yupapor *et al.*, 2019). O DHA tem maior afinidade pela albumina sérica humana, que é o principal transportador de PUFA's na corrente sanguínea, auxiliando também nessa liberação prolongada (BOR, Gizem *et al.*, 2022). Além de que o efeito terapêutico potencial do PUFA ômega-3 injetadas intravenosamente para condições inflamatórias, precisa apresentar atraso na sua depuração, sendo prolongado na circulação (BOR, Gizem *et al.*, 2022). O Polímero biodegradável, policaprolactona (PCL) possui muitas vantagens, incluindo capacidade hidrofóbica, boa solubilidade, resistência química, alta permeabilidade a pequenas moléculas, e tem sido amplamente utilizado em sistemas de entrega de drogas de longo prazo. Este tipo de nanopartículas à base de polímeros tem recebido grande atenção devido à sua economia e vantagens ambientais (KONG, Junjun *et al.*, 2017).

As nanopartículas de polímeros, especialmente quando revestidas com um surfactante, têm atraído interesse considerável para sistemas de liberação de fármacos. Muitos surfactantes foram investigados para comparar sua eficácia no transporte de medicamentos, mostrando que o Polissorbato80

(Tween-80) foi um dos mais eficazes no revestimento de nanopartículas, levando à absorção pelas células endoteliais (REN, Tianbin *et al.*, 2009). O Polissorbato 80 (Tween 80) é monooleato de sorbitano de polioxietileno, quimicamente uma mistura de éteres de polioxietileno é um tensoativo não iônico, utilizado como emulsificante em produtos farmacêuticos, oferecendo maior permeabilidade e efeito de retenção (KAUR, Harsheen *et al.*, 2021). São utilizados na formulação de soluções injetáveis para aumentar a absorção de drogas solúveis, adicionalmente, também são utilizados para estabilizar as proteínas em formulações de anticorpos monoclonais (DAMICO, Francisco Max *et al.*, 2017).

Em especial os nanocarreadores podem acumular-se passivamente nos locais de lesão pulmonar após sua administração sistêmica, o que pode ser atribuído ao aumento da permeabilidade da vascularização patológica em áreas inflamatórias (Ma B *et al.*, 2020, Shuvave VV *et al.*, 2016). É importante ressaltar que os pacientes com SDRA são mais propensos a sofrer com a disfunção de múltiplos órgãos, e a nanomedicina pode reduzir os efeitos colaterais melhorando a eficiência do direcionamento (Ma B *et al.*, 2020).

Os ácidos graxos insaturados geralmente são encontrados na forma líquida. São nutrientes benéficos e também suplementos dietéticos para a saúde humana. Eles também desempenham papéis essenciais nas atividades biológicas das células como componentes principais das membranas celulares (FU, Jingxin *et al.*, 2022). A incorporação do ácido graxo ômega 3, sua estabilidade e funcionalidade até serem metabolizados pelo organismo humano devido à sua alta suscetibilidade à deterioração oxidativa, ainda é um desafio para a indústria alimentícia; esta é a razão pela qual o encapsulamento ou outra forma de proteção do óleo é essencial (Timilsena YP *et al.*, 2017). Os sistemas nanoestruturados são uma alternativa promissora para proteger os ácidos graxos ômega 3 contra a oxidação, melhorando a solubilidade e estabilidade. Sendo um sistema promissor para promover a manutenção de

suas propriedades nutracêuticas, melhorando assim a eficácia terapêutica (VIEIRA, Maiana da Costa *et al.*, 2020).

Neste trabalho propomos que a administração intravenosa com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado tem efeito benéfico e protetor na doença pulmonar inflamatória induzida pelo componente de bactérias Gram (-) LPS. Os estudos sobre estes efeitos e os mecanismos de ação envolvidos neste modelo pré-clínico de SDRA podem impulsionar estudos clínicos e maior entendimento do potencial terapêutico do ômega 3 (DHA) nanoestruturado. Os estudos a respeito de medidas terapêuticas preventivas são muito relevantes no cenário de saúde mundial atual.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração do ômega 3 (DHA) nanoestruturado em modelo experimental de SDRA induzida pelo LPS *in vivo* e em células do epitélio pulmonar do tipo II (A549) *in vitro*.

2.2 Objetivo Especifico

A) Avaliar o efeito do pré-tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado, em camundongos Swiss desafiados com LPS no pulmão, analisando o número total e diferencial de células, juntamente com o conteúdo de proteínas presente no lavado bronco alveolar (LBA).

B) Avaliar os marcadores da inflamação pulmonar (citocinas e quimiocinas) no LBA de camundongos desafiados com LPS e tratados com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado.

C) Avaliar o efeito do pré-tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturados na produção de óxido nítrico (NO) no LBA.

D) Avaliar o efeito do pré-tratamento utilizando ômega 3 (DHA) nanoestruturado na viabilidade e na produção de citocinas pró-inflamatórias nas células do epitélio pulmonar do tipo II (A549), desafiadas com LPS.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 - Formulação do Ômega 3 (DHA) nanoestruturado - Desenvolvimento e caracterização dos nanossistemas formulados e cedidos pela parceria com a Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT

As suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico NLCs foram desenvolvidas pelo método descrito previamente baseado na deposição interfacial de polímero pré-formado [Jäger, 2009] e caracterizadas quanto ao seu diâmetro médio da nanopartículas por análise de espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer® NanoZS modelo ZEN 3600, Malvern Instruments, Reino Unido). Nessa análise, as nanocápsulas em suspensão foram diluídas 500 vezes (v:v) em água ultrapura, filtrada (membrana 0,45 µm) e o diâmetro cumulante médio (*Z-average*), o índice de polidispersão (PDI), resultantes da aplicação do método dos cumulantes, foram medidos num ângulo de detecção de 173° (25°C). Para confirmação do diâmetro médio particular, o diâmetro médio de esfera equivalente ($d_{4.3}$) e a distribuição de tamanho de partícula (*Span*) foram avaliadas por difração de laser (Mastersizer® 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido). Análises obtidas a 25 °C a partir de um pequeno volume da amostra (suficiente para obscuração do aparelho entre 2 e 8) foram efetuadas em aproximadamente 100 mL de água destilada como meio dispersante.

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro (Denver® Instrument VB-10, Nova Iorque) previamente calibrado com padrões pH 4,0 e 7,0 diretamente nas suspensões coloidais. E o potencial zeta foi

determinado após diluição das nanocápsulas de 500 vezes em solução de NaCl 10mM.L⁻¹ previamente filtrada através de membrana 0,45µm, sendo as medidas efetuadas em triplicata analisando a amostra pela sua mobilidade eletroforética no equipamento Zetasizer® NanoZS (modelo ZEN 3600, Malvern Instruments, Reino Unido).

Para estudar a estabilidade das formulações, foram monitorados diâmetro e pH das suspensões de nanocápsulas nos tempos 0, 15 e 30 dias (após o preparo). As formulações também foram avaliadas através do método de espalhamento múltiplo de luz (Turbiscan Lab, Formulation Co. França). Nesse equipamento, a amostra (20 mL) é submetida à verificação por um feixe de luz na região do infravermelho (850 nm) a 25°C por 1 hora. A aquisição dos dados se repete a cada 5 minutos, totalizando 13 varreduras. Dois sensores ópticos detectam a luz transmitida através da amostra e a luz retroespalhada pela amostra. O perfil obtido durante a análise para detectar fenômenos de migração de nanoestruturas e a tendência de desestabilização do sistema se baseia na variação nos sinais obtidos a partir da luz retroespalhada ou transmitida.

3.2 - Experimentos *In Vivo*

Modelo experimental de injúria pulmonar: Camundongos Swiss machos de 6-8 semanas foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da FIOCRUZ. No modelo experimental de injúria pulmonar induzido por LPS. Estes animais receberam pré-tratamento com ômega 3 (DHA) nanoestruturados a 3mg/kg por 1 dia (via intraperitoneal) antes da instilação com LPS. Essa concentração administrada da NanoDHA é

utilizada em nosso laboratório em outros experimentos, apoiado a informações descritas na literatura (BOR, Gizem et al., 2022). No dia seguinte foram submetidos à instilação intratraqueal de LPS 500 ng 24 horas antes das análises. Os experimentos encontram-se aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FIOCRUZ (CEUA) sob licença L-005/2023. Coleta do lavado broncoalveolar (LBA): Um dia após à exposição do LPS os camundongos foram sedados via inalatória (Isoflurano), submetidos a uma incisão cervical na linha média pela qual a traqueia fica exposta e os espaços aéreos foram lavados com cloreto de sódio 0,9% estéril, utilizando uma seringa de 1ml foi inserido 500ul de salina no pulmão dos camundongos três vezes e seu retorno coletado em eppendorf.

Contagem de células do LBA: A contagem total de leucócitos foi realizada por microscopia em câmaras de Neubauer após diluição das amostras de LBA em solução Turk (2% de ácido acético). Ao total a solução era composta por 180ul de Turk e 20ul da amostra. Após o preparo da solução foi a realizado centrifugação das amostras a 1500 rpm, por 10 minutos a 4°C o sobrenadante foi estocado e o pellet descartado.

Fixação das amostras: Lâminas foram fixadas utilizando o fixador panotipo, na qual as lâminas foram submetidas à ação de três compostos: um fixador e duas soluções corantes que demarcam estruturas de acordo com seu pH. Estruturas ácidas tem a tendência de se corar em tons de vermelho (acidófilas) e estruturas básicas em tons de azul (basófilas), estruturas que apresentam um pH neutro irão apresentar coloração intermediária entre essas duas cores. Depois de fixadas podem ser lavadas com água destilada, onde são submetidas a contagem diferencial de células, diferenciando células mononucleares de polimorfonucleares.

Concentração das principais citocinas (ELISA): Citocinas avaliadas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 e KC (CXCL1): A dosagem das citocinas foi realizada utilizando o sobrenadantes de LBA livres de células através do kits ELISA,

segundo as instruções do fabricante (Duo Set, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Esse método permite avaliar a expressão de citocinas em uma amostra através de uma série de etapas de incorporação e que farão o reconhecimento da presença da proteína-alvo. Em seguida promove uma mudança de cor ou fluorescência que é detectada e lida em espectrofotômetro.

Dosagem de proteínas: Realizada pelo método BCA utilizando-se um kit comercial (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, EUA). Nesta reação forma-se um produto de cor roxa, solúvel em água, com pico de absorvância medida em espectrofotômetro em comprimento de onda 562 nm, sendo as amostras com maior quantidade de proteínas apresentando coloração roxa intensa.

Avaliação do NO (Teste de Griess): A medição dos níveis de NO foi realizada em volume 100 µL de sobrenadante do LBA, aplicados em placa de 96 poços, seguido pela adição dos reagentes de Griess, 50 µL de sulfanilamida (2%) e 50 µL de N-(1-Naftil) dicloridrato de etilenodiamina (0,1%). Após 30 min de incubação a 37 °C, a absorvância foi medida em espectrofotômetro comprimento de onda 540 nm (Sunrise, Tecan, Áustria). Concentração de NO em amostras foi determinado a partir da curva padrão linear estabelecido por 200 - 3.125 µmol/l de nitrito de sódio.

Análise Estatística: Os dados serão representados como média ± erro médio padrão (EPM) e analisados estatisticamente utilizando-se o teste pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

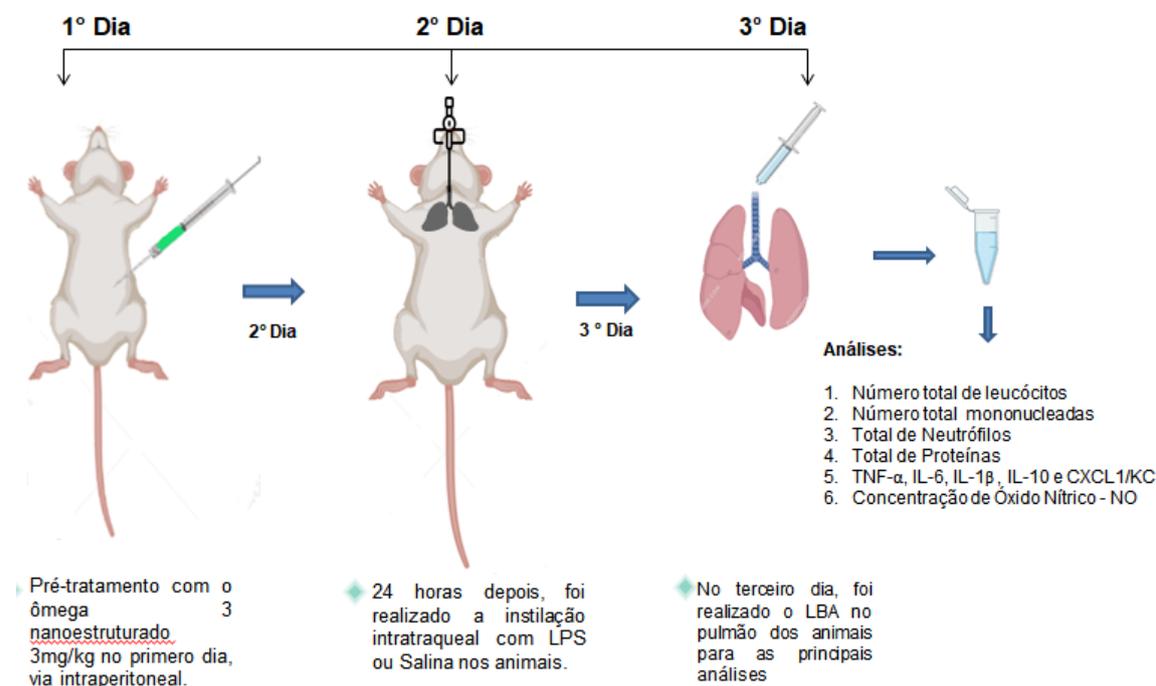


Figura 3. Desenho experimental *In vivo* do modelo de indução de inflamação pulmonar (SDRA) através da instilação com LPS ou Salina e pré-tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado via intraperitoneal. Ilustração feita no BIORENDER.

3.3 – Experimentos *In Vitro*

Cultura de células do epitélio pulmonar do tipo II (A549): Cultivadas em garrafa de poliestireno mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino previamente inativado a 56°C por 1 hora, antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina) e armazenadas em estufa na atmosfera de 5% de CO₂. Foram semeadas em placas de 24 e 92 poços para ensaio de ELISA. Para tal, células da linhagem A549 foram semeadas em 2 placas de 24 poços/densidade celular 3x10⁴ e após 24 horas sofreram o starving com meio sem soro por 3hs. Após esse tempo as células foram pre-tratadas com diferentes concentrações de DHA Livre (200 μ M), e NanoDHA (1 μ M), e NanoBranco (1 μ M), DMSO 0,1%

(veículo da diluição – controle negativo de morte celular), meio DMEM (veículo de diluição das substâncias) e triton X-100 0.1% (controle positivo para morte celular). Ao término de 1 hora do pré-tratamento, adicionou-se LPS (100 ng/mL) para simular lesão pulmonar induzida por sepse (XU, Baiye; WANG et al., 2021). Após 24 horas de incubação foi adicionado resazurina 0.01%. A resazurina é o composto ativo do reagente alamarBlue, permeável e não tóxico às células, de coloração azul e dificilmente fluorescente. Ao penetrar nas células vivas, a resazurina é reduzida a resofurina, um composto de coloração vermelha. A mensuração da absorvância foi realizada a 535 nm em espectrofotômetro. Todos os ensaios foram realizados em triplicata nas passagens #4, #6 e #9 da cultura.

Concentração das principais citocinas (ELISA): Citocinas avaliadas IL-6 e IL-8/CXCL8 foram feitas usando o sobrenadante das células usando kits ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (Duo Set, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Esse método permite avaliar a expressão de citocinas em uma amostra através de uma série de etapas de incorporação e que farão o reconhecimento da presença da proteína-alvo. Em seguida promove uma mudança de cor ou fluorescência que é detectada e lida em espectrofotômetro.

Análise Estatística: Os dados serão representados como média \pm erro médio padrão (EPM) e analisados estatisticamente utilizando-se o teste pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

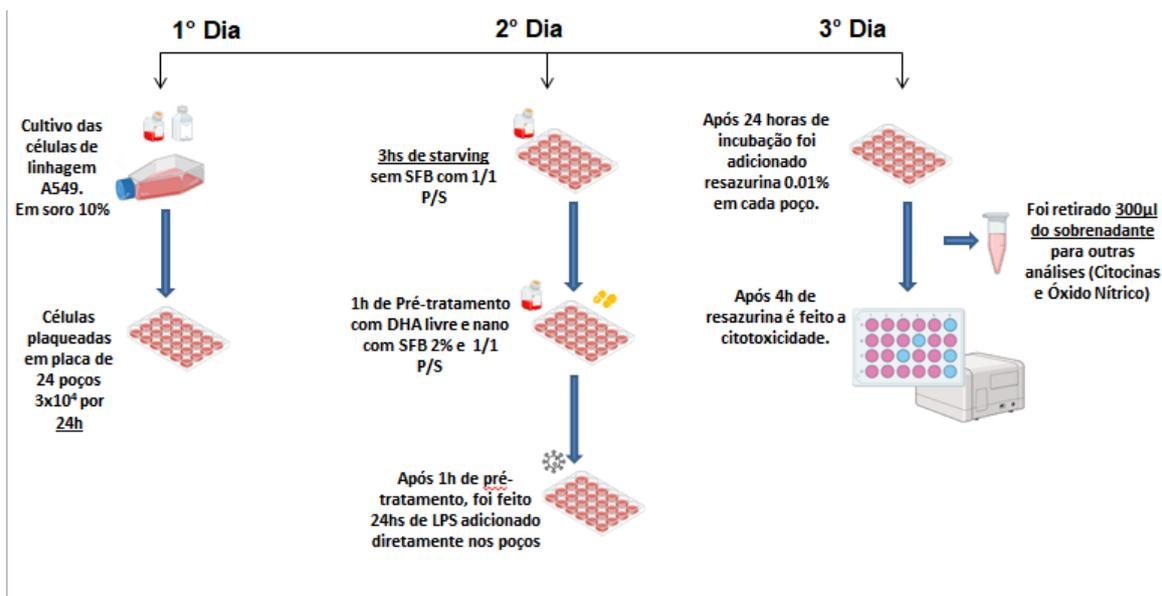


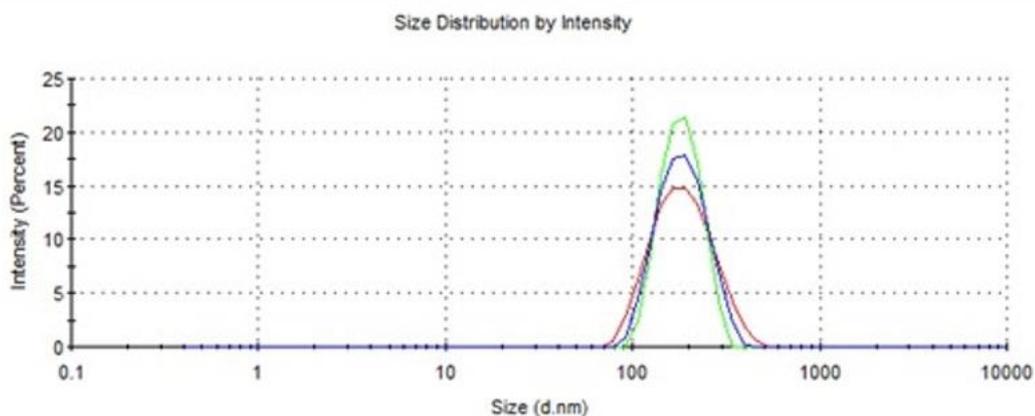
Figura 4. Desenho experimental *In vitro* do modelo de indução de inflamação pulmonar (SDRA) através do desafio com LPS e pré-tratamento com o ômega 3 livre e nanoestruturado nas células do epitélio pulmonar do tipo II A549. Ilustração feita no BIORENDER.

4. RESULTADOS

4.1 Nanoestrutura

Os nanossistemas apresentaram distribuição de tamanho monomodal e nanométrica nos três lotes como o esperado, apresentando-se menor que 300 nm. O potencial zeta das formulações se mostrou estável. O mecanismo de estabilização desse composto é o impedimento estérico. Os valores de PDI (Índice de polidispersão) foram $\leq 0,2$. Tabela 1. A parte superior da tabela exhibe a distribuição de tamanho das nanopartículas, representadas em cores diferentes, demonstrando três diferentes amostras utilizadas.

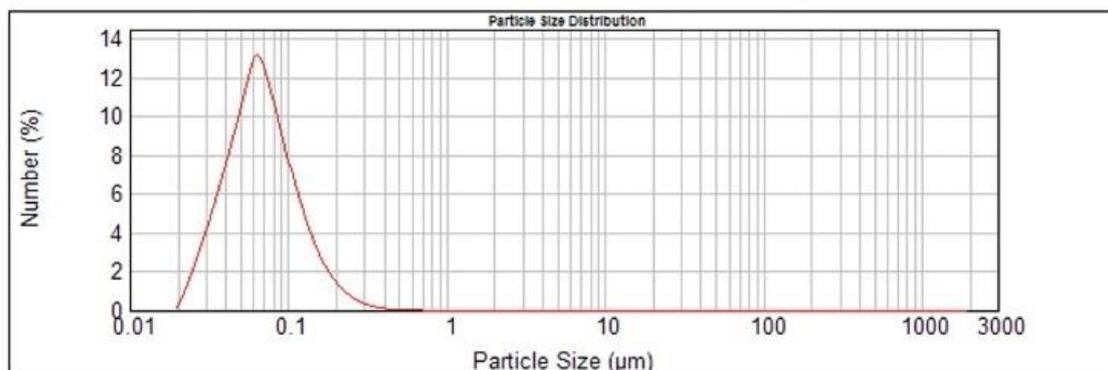
Tabela 1: Resultado da distribuição e intensidade das nanopartículas LNC DHA gerado pelo Nanosizer. Todas as análises realizadas em triplicatas.



Nanosizer	Z- average	PDI	Potencial Zeta
LNC DHA 1	172,7	0,113	-11,9
LNC DHA 2	176,5	0,01	-13,3
LNC DHA 3	175,2	0,068	-13,3
Média	174,8	0,0636	-12,8333
Desvio Padrão	1,931321	0,0516	0,808

Na análise macroscópica, as suspensões de nanocápsulas mostram aparência homogênea, aspecto leitoso, branco e opalescente e com reflexo azulado, resultante do movimento browniano das nanopartículas em suspensão. No estudo desenvolveu-se diferentes LNCs contendo o DHA co-encapsulados ou não. Esses nanossistemas apresentaram distribuição de tamanho monomodal e nanométrica nos três lotes, com span menor que 2,0,. Tabela 2. A parte superior da tabela exhibe a distribuição das nanopartículas.

Tabela 2: Tamanho e distribuição das nanopartículas LNC DHA – Realizado pelo Mastersize.



Mastersizer	D 4,3 (um)	Span
LNC DHA 1	0,223	1,453
LNC DHA 2	0,221	1,451
LNC DHA 3	0,224	1,455
Média	0,223	1,453
Desvio Padrão	0,00152	0,002

4.2 – Experimentos *In vivo*

Após o pré-tratamento com (DHA) nanoestruturado e indução de lesão pulmonar por LPS, os camundongos swiss foram submetidos à coleta do (LBA) para posteriores análises. Foi utilizado 100ul das amostras para realizar a fixação e coloração das lâminas com Panotipo. Nessas lâminas investigou-se a população de células obtidas do LBA dos grupos experimentais. As células foram observadas e contadas em microscópio óptico e caracterizadas como mononucleadas ou polimorfonucleadas. A figura 5 exibe as imagens das

lâminas utilizadas para realizar a contagem total de células por grupo, mostrando que a estimulação com LPS (C) induziu ao aumento nas contagens de leucócitos, em comparação com o pré-tratamento com NanoDHA+LPS (D) após 24h. O pré-tratamento com a NanoDHA (A) não causou aumento no número de células no lavado broncoalveolar (LBA), assemelhando-se ao grupo salina (B).

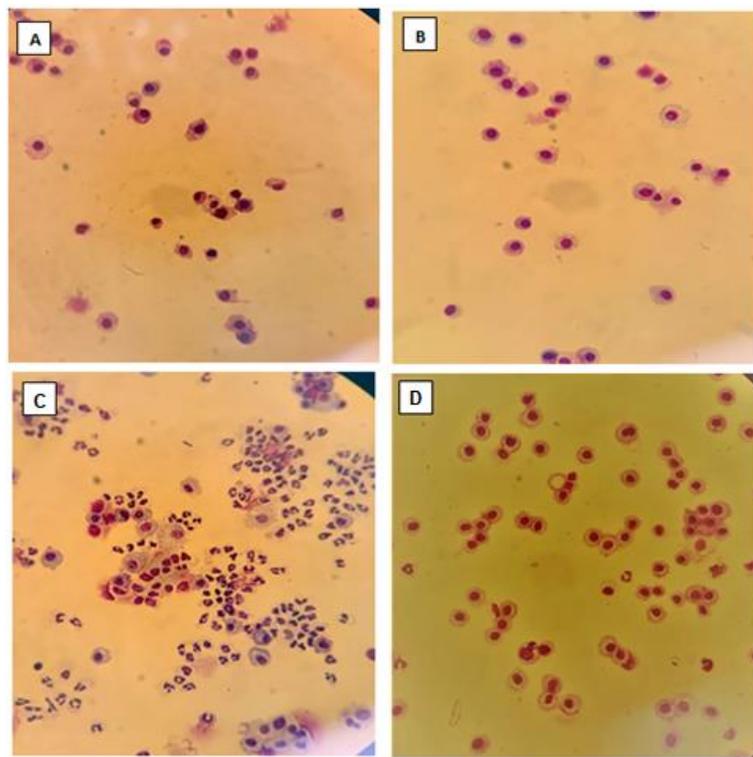


Figura 5. **Lâminas do Lavado Broncoalveolar LBA.** (A) Tratamento NanoDHA+Salina. (B) Tratados com Salina. (C) Desafio com LPS. (D) Tratado com a NanoDHA+LPS. Coradas em Panotipo. Aumento de 200x. Imagem representativa.

A figura 6 (A) mostra a contagem total de leucócitos estimulados pela indução de LPS, evidenciando que houve diminuição na contagem total de leucócitos no grupo de animais que receberam o pré-tratamento com a

NanoDHA+LPS ($p < 0,0001$). A figura 6 (B) mostra a contagem diferencial de células mononucleares evidenciando que a estimulação com LPS induziu ao aumento nas contagens de células mononucleares, que foi inibida pelo pré-tratamento com NanoDHA+LPS após 24h ($p < 0,0433$). A figura 6 (C) mostra a contagem diferencial de neutrófilos evidenciando redução no grupo que recebeu o pré-tratamento com a NanoDHA+LPS ($p > 0,0001$). O pré-tratamento com NanoDHA não causou aumento no número de leucócitos totais, células mononucleadas e neutrófilos nas amostras do lavado broncoalveolar (LBA), assemelhando-se ao grupo Salina, evidenciando que o pré-tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado não influencia negativamente nos parâmetros inflamatórios no pulmão.

Na figura 6 (D) foi analisado a concentração total de proteína nas amostras, evidenciando diferença entre o grupos LPS em comparação com o tratamento NanoDHA+LPS após 24h ($p > 0,0002$). Sugerindo que o tratamento NanoDHA diminuiu o conteúdo de proteínas totais nas amostras desafiadas com LPS, possivelmente reduzindo o extravasamento de proteínas para o pulmão. Não houve aumento de proteínas totais nos animais pré-tratados com NanoDHA, evidenciando que o pré-tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado não influencia negativamente nos parâmetros inflamatórios no pulmão.

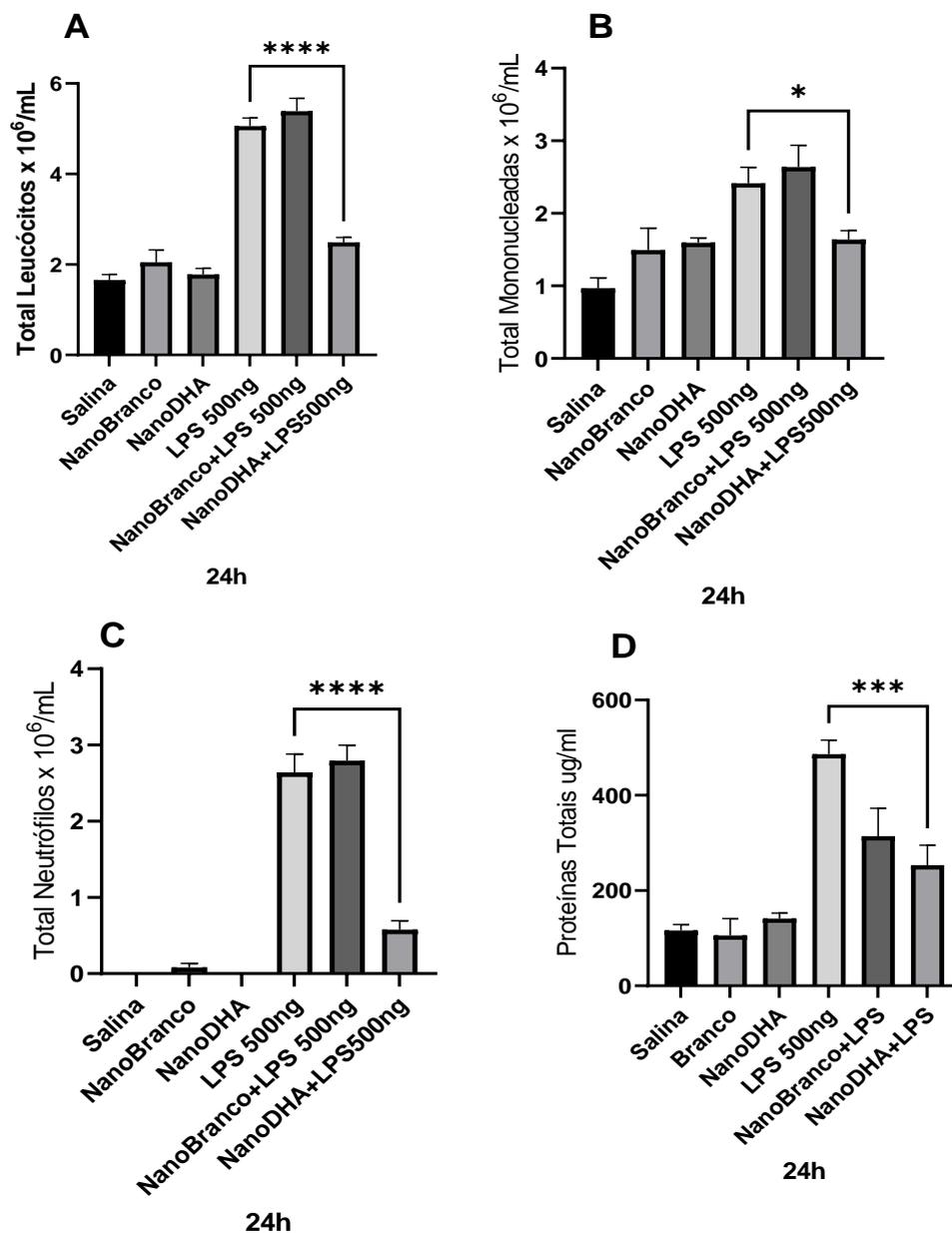


Figura 6. Efeito do tratamento com a NanoDHA nas concentrações de Leucócitos induzidos pelo LPS. (A) Total de Leucócitos. (B) Total mononucleadas. (C) Total de neutrófilos e (D) Proteínas totais utilizando o kit BCA. Analisados estatisticamente utilizando-se o teste pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos. Experimento repetidos em triplicatas com 7 animais em cada grupo.

A figura 7 mostra a concentração de citocinas no lavado broncoalveolar (LBA), onde o estímulo com o LPS no pulmão dos camundongos, resultou no aumento de todas as citocinas relacionadas com inflamação. Contudo, o pré-tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado apresentou redução significativa das citocinas, IL-1 β ($p < 0,0118$), TNF- α ($p > 0,0123$) e IL-10 no LBA. Porém o mesmo efeito não foi observado nos níveis das citocinas IL-6 ($p > 0,9999$) e CXCL1/KC ($p > 0,2693$). Nos grupos tratados apenas com NanoDHA não houve aumento das citocinas, assemelhando-se ao grupo salina.

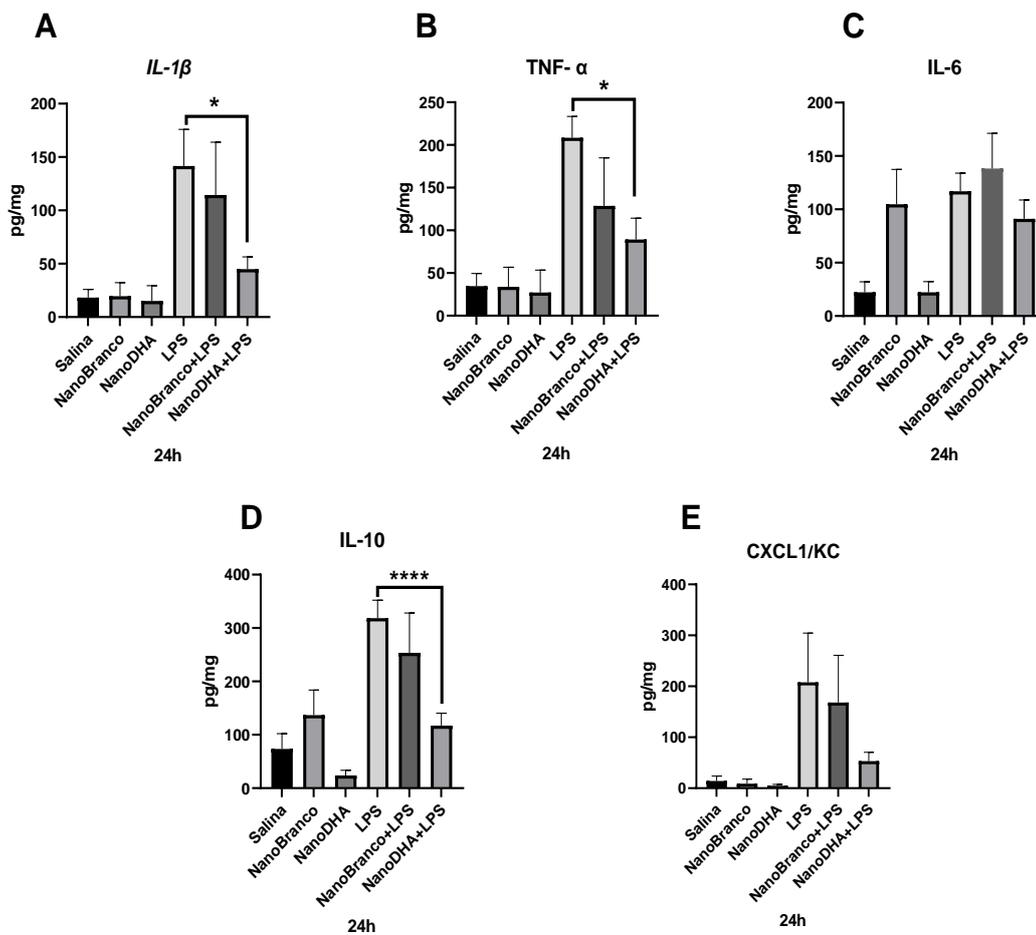


Figura 7. Efeito do tratamento com a NanoDHA nas concentrações de citocinas induzidas pelo LPS. (A) Níveis de IL-1 β . (B) Níveis de TNF- α . (C) Níveis de IL-6 (D)

Níveis de IL-10 e (E) Níveis de CXCL1/KC no lavado broncalveolar (LBA). Analisados estatisticamente utilizando-se o teste pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos. Experimento repetidos em triplicatas com 7 animais em cada grupo.

A concentração de NO também foi avaliada no lavado broncoalveolar (LBA) Figura 8. O grupo salina apresentou pequena produção de NO comparada ao grupo estimulado com LPS que apresentou valores elevados. No entanto, o grupo pré-tratado com NanoDHA e estimulado com LPS teve sua concentração de NO significativamente reduzida ($p < 0,0264$). O pré-tratamento com a NanoDHA não apresentou aumento de NO no LBA.

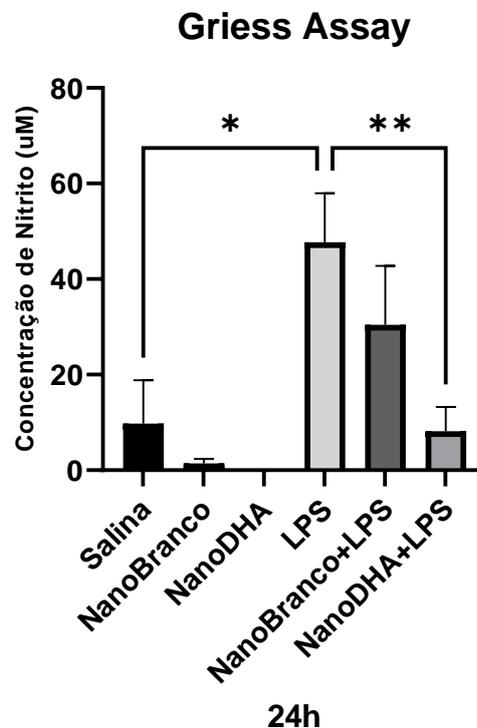


Figura 8. Teste de Griess determinando concentração de óxido nítrico nas amostras do LBA estimuladas com LPS e tratadas com NanoDHA. Analisados

estatisticamente utilizando-se o teste pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos. Experimento repetidos em triplicatas com 7 animais em cada grupo.

4.3 – Experimentos *In Vitro*

O ensaio de viabilidade foi realizado em cultura de células do epitélio pulmonar, pneumócito do tipo II (A549). Utilizando a resazurina permeável e não tóxica às células. Sendo reduzida a resazurina em resposta à atividade metabólica das células vivas. Na figura 9 podemos analisar que não houve citotoxicidade nas células tratadas com o DHA Livre (200 μ M) e o nanoestruturado NanoDHA (1 μ M). O LPS não induziu morte celular, pois pretendemos analisar a inflamação causada através da concentração das principais citocinas inflamatórias.

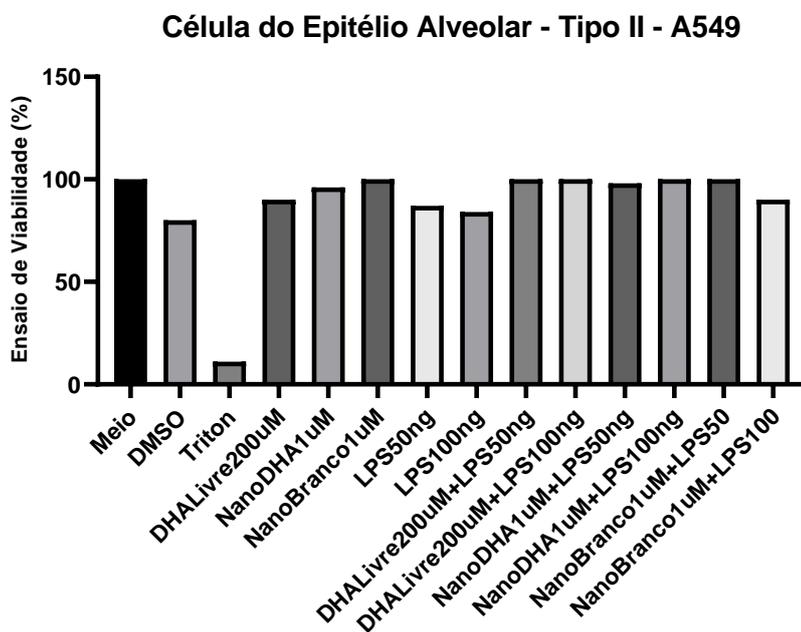


Figura 9 – **Ensaio de viabilidade em células do epitélio alveolar tipo II - A549.** Ensaio de viabilidade após 24h de tratamento. Foram utilizados como positivos para viabilidade (Meio e DMSO) e triton X-100 como controle negativo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata nas passagens #4, #6 e #9.

A figura 10 (A) mostra que a concentração da citocina IL-6 nas células do pneumócito pulmonar tipo II apresenta tendência a redução nas amostras pré-tratadas com a NanoDHA1uM+LPS100ng ($p < 0.062$), porém não houve diferença com o pré-tratamento com o DHA livre. Na figura 10 (B), houve redução da citocina IL8/CXCL8 nas amostras pré-tratadas com NanoDHA1uM+LPS100ng ($p < 0,0100$), porém o DHA Livre não apresentou diferença significativa. Evidenciando que o pré-tratamento com o DHA Livre e a NanoDHA não apresentam aumento na concentração das citocinas IL-6 e IL8/CXCL8 no grupos controles.

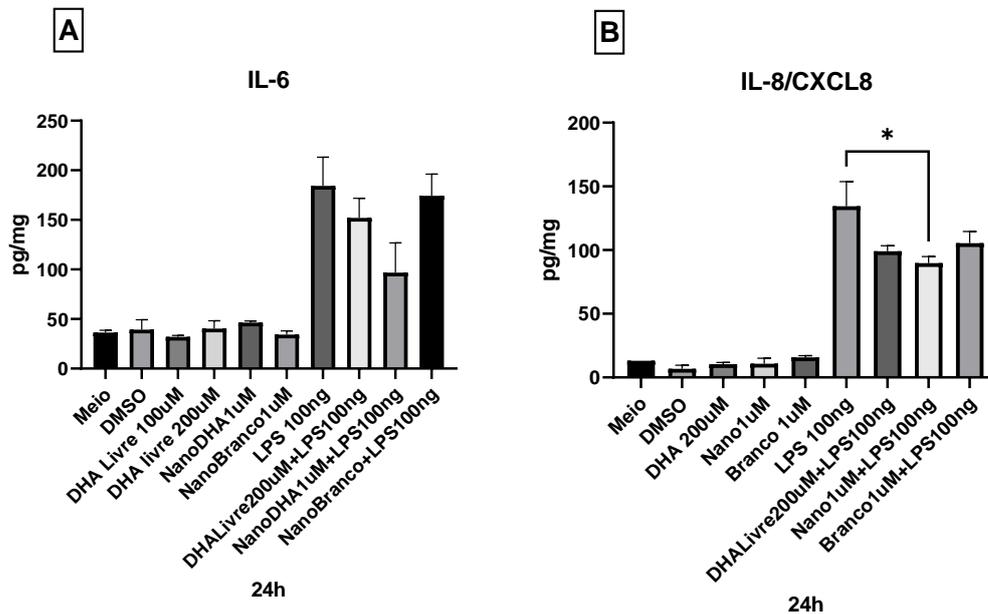


Figura 10. Efeito do tratamento com a NanoDHA e DHA Livre nas concentrações de citocinas induzidas pelo LPS no pneumócito pulmonar do tipo II A549. A) Níveis de IL-6. B) Níveis de IL-8 in vitro. Analisados estatisticamente utilizando-se o teste pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata nas passagens #4, #6 e #9.

5. DISCUSSÃO

Entre os nanocarreadores mais comuns usados para entrega de medicamentos no pulmão estão as nanopartículas poliméricas devido à sua biocompatibilidade, capacidade de modificação de superfície, capacidade de produção em larga escala, produção livre de solventes orgânicos, capacidade de transportar uma grande quantidade de medicamento lipofílico e proteção do medicamento, tendo um perfil de liberação controlada, as nanopartículas poliméricas são amplamente observadas na literatura de nanomedicina e pode ser aplicado à administração pulmonar (DE CARVALHO PATRICIO, Beatriz

Ferreira *et al.*, 2022). A incorporação do DHA, sua estabilidade e funcionalidade até serem metabolizados pelo organismo humano devido à sua alta suscetibilidade à deterioração oxidativa, ainda é um desafio para a indústria alimentícia; esta é a razão pela qual o encapsulamento ou outra forma de proteção do óleo é essencial para esse fim (Timilsena YP *et al.*, 2017).

A entrega pulmonar é um processo complexo que depende da formulação do fármaco e das características do paciente. Para efeito farmacológico, as partículas do medicamento devem ultrapassar as vias aéreas inferiores, para serem depositadas mais profundamente no pulmão. Este processo depende da distribuição de tamanho, morfologia e densidade das partículas, uma vez que estes fatores impactam diretamente a aerodinâmica das partículas (GHADIRI, Maliheh *et al.*, 2019; DE CARVALHO PATRICIO, Beatriz Ferreira *et al.*, 2022). Valores de diâmetro médio de partícula abaixo de 300 nm e valores de índice de polidispersidade abaixo de 0,3 garantem homogeneidade na distribuição granulométrica e aglomeração reduzida (CLAYTON, Katherine N. *et al.*, 2016). A LNC DHA apresenta distribuição de tamanho monomodal e nanométrica menor que 300 nm e os valores de PDI foram $\leq 0,2$ evidenciando maior grau de homogeneidade da amostra. Informações sobre o diâmetro médio das partículas é importante, pois é sabido que devido ao tamanho reduzido de partículas, as LNCs são capazes de penetrar e interagir com capilares e células endoteliais (CHAVES, Janaina Braga *et al.*, 2022). A LNC DHA demonstra valores de potencial zeta importantes, indicando estabilidade, devido à presença do tensoativo não iônico na interface partícula-água, visto que está relacionada com cargas de superfície provocadas pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula e o meio dispersante ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso onde as nanocápsulas estão dispersas, não demonstrando indícios de desestabilização ou aglomeração das partículas, o polissorbato 80 também possui afinidade e interação por proteínas plasmáticas (CHAVES, Janaina Braga *et al.*, 2022). O D[4,3] também analisa o tamanho média da

partícula em volume (SONG, Yan *et al.*, 2020) evidenciando valores ≤ 300 μm . Outro parâmetro seria o span menor que 2,0, indicando que não houve presença simultânea de micropartículas conforme apresenta a tabela 01. O pH das formulações manteve-se levemente ácido, característica que se deve ao veículo aquoso e ao polímero (PCL) utilizado. Além disso, o uso de polímero biodegradável (PCL) como uma barreira semipermeável, permite liberação controlada do fármaco nanoencapsulado, permanecendo por um longo período na circulação sanguínea mantendo por mais tempo o nível sérico.

O desafio com LPS promoveu no LBA, intensa infiltração celular nos alvéolos em decorrência da inflamação intersticial desenvolvida, e a presença em excesso de PMN nos alvéolos pode resultar em dano adicional ao tecido pela liberação de múltiplos mediadores citotóxicos. Contudo, tendo como base os resultados, foi possível observar que os grupos pré-tratados com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado e desafiados com LPS, apresentaram redução do acúmulo de células no pulmão nos experimentos *in vivo*. Os neutrófilos são as primeiras células imunes recrutadas para o local da inflamação, acompanhados pelo aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e edema pulmonar (FERREIRA, Larissa Adilis Maria Pava *et al.*, 2020). Clinicamente, o número de células inflamatórias, primordialmente neutrófilos, no LBA de pacientes com SDRA correlaciona-se estreitamente com a gravidade da doença e a atenuação desse infiltrado celular reduz o dano pulmonar e melhora da função alvéolo-capilar (FERREIRA, Larissa Adilis Maria Pava *et al.*, 2020; FUJISHIMA, S *et al.*, 2014). Nossas análises demonstraram que a administração de LPS induziu o acúmulo de células inflamatórias no LBA, principalmente PMN, sendo a maior parte composta por neutrófilos. Entretanto, o pré-tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado diminuiu acentuadamente o influxo dessas células na cavidade pulmonar nos animais doentes. A migração de células mononucleadas também foi revertida com o pré-tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado, conferindo a redução do processo inflamatório e consequente ativação neutrófilica. Esses resultados são expressivos, pois

indicam que a ômega 3 (DHA) nanoestruturado possa estar modulando negativamente a migração de PMN pela diminuição da expressão de moléculas de adesão, como selectinas e integrinas no endotélio pulmonar, bem como na diminuição de moléculas quimiotáticas demonstrado anteriormente por Nordgren, Tara M. *et al.*, (2014).

A permeabilidade vascular foi mensurada por meio do extravasamento proteico presente no LBA dos animais, de forma que a concentração de proteínas totais é diretamente proporcional à permeabilidade vascular, pois a alta concentração de proteínas no LBA é um dos indicadores que o LPS comprometeu a integridade da membrana alvéolo capilar, resultando em uma condição fisiopatológica caracterizada por inundação de líquido a nível alveolar e edema pulmonar e subsequente hipoxemia, podendo levar a hemorragia alveolar aguda onde as células endoteliais e os pneumócitos sofrem necrose (MOHAMMAD RIZWAN SIDDIQUI *et al.*, 2019). Nossos resultados demonstram que os animais doentes apresentaram aumento expressivo de conteúdo proteico no pulmão, caracterizando, portanto, a perda da integridade e conseqüente aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar. O pré-tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado nos animais pré-tratados diminuiu o excesso de conteúdo proteico no LBA (Figura 6 D). Esse efeito do ômega 3 (DHA) nanoestruturado na inflamação pulmonar é corroborado com resultados descritos em trabalhos anteriores que demonstram a atividade anti-edematogênica dos mediadores pro-resolutivos do ômega 3, em especial a Protectina DX (PDX) derivado do (DHA) administrada via intraperitoneal em modelos experimentais de edema pulmonar induzidos pela instilação intratraqueal de LPS (YANG, Jing-Xiang *et al.*, 2020). Assim como foi observado diminuição da permeabilidade vascular induzida por ventilação mecânica causada por paraquat (PQ) após administração do ômega 3 livre via oral a 500 mg/kg nos camundongos por CHEN, Jingjing *et al.*, 2013 (XIA, Haifa *et al.*, 2019; CHEN).

As citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e CXCL1 são importantes indicadores sistêmicos da fase aguda da inflamação, sendo seus níveis elevados associados à piora da condição clínica. Os resultados do presente estudo indicaram o aumento significativo nos níveis de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 e CXCL1 no LBA de animais desafiados com LPS. Os animais pré-tratados com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado e instilados com LPS apresentaram diminuição na produção de IL-1 β , TNF- α , IL-10, porém, na concentração de CXCL1 e IL-6 não foi reduzida. A IL-1 β tem como fonte de sua síntese os neutrófilos ativados presentes nos alvéolos pulmonares na SDRA (ZHANG *et al.*, 2017). Em pacientes com SDRA, a IL-1 β é o principal mediador inflamatório encontrado no LBA (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016; MOKRA; KOSUTOVA, 2015). Diversos estudos clínicos indicam que as interações entre a IL-1 β e sua família de ligantes e receptores em diversas populações celulares presente no tecido pulmonar desempenham papel crucial no desenvolvimento da SDRA, por estimular a produção de uma grande variedade de outros mediadores, como as quimiocinas CXCL-8, entre outros (BAUERNFEIND *et al.*, 2009; VAN DE VEERDONK *et al.*, 2011). Portanto a redução desta citocina corrobora com resultados descritos por LIU, Chenchen (2023) e através deste resultado podemos mais uma vez traçar um perfil de comparação do potencial do ômega 3 (DHA) nanoestruturado com o desempenho deste ácido graxo em sua forma livre amplamente descrita na literatura.

O TNF- α é a primeira citocina multifuncional produzida por macrófagos alveolares estimulados por LPS, e inicia a cascata inflamatória estimulando outras células a secretar citocinas e quimiocinas (YEH, C. H. *et al.*, 2014). Uma das características da resposta inflamatória esta ligada ao extravasamento do plasma e ao aumento dos níveis de TNF- α no pulmão. Quando sua concentração esta depletada, apresenta associação com a redução da inflamação pulmonar (PINHEIRO, Nathalia Montouro., 2016). Podemos inferir que o TNF- α esteja contribuindo para a lesão tecidual e ativando o endotélio pulmonar no sentido de permitir a migração de neutrófilos para o tecido. Assim

o ômega 3 (DHA) nanoestruturado esteja, reduzindo sua produção comparada com o grupo LPS e contribuindo para diminuição da lesão pulmonar neste modelo.

Entretanto, o nível de IL-6 no LBA não foi reduzido significativamente nos animais pré-tratados, evidenciando que o processo inflamatório está em curso e segundo FERREIRA, Larissa Adilis Maria (2020) os níveis elevados de IL-6 no líquido do lavado broncoalveolar LBA têm sido caracterizado como mal prognóstico em pacientes com SDRA mostrando a necessidade de possíveis ajustes em relação à concentração e número de vezes em que a nanoestrutura é administrada como pré-tratamento, com o objetivo de verificar se a resposta sistêmica desses mediadores anti-inflamatórios do ômega 3 poderia ser ainda mais eficaz.

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica cuja função primária na maioria dos tecidos é limitar a resposta inflamatória; no entanto, na infecção pelo SARS-CoV-2, outras patologias e processos inflamatórios pulmonares ela está dramaticamente elevada (KOCHERLAKOTA, Chandrashekhara *et al.*, 2022). Sendo encontrada em níveis elevados em doentes com SDRA (PINHEIRO, Nathalia Montouro., 2016). A IL-10 apresenta concentrações aumentadas nos grupos desafiados com LPS, confirmando informações contidas na literatura onde o equilíbrio de TNF- α e IL-10 é o resultado de um controle autócrino, em que TNF- α ativa a síntese e a secreção de IL-10, enquanto IL-10 regula negativamente a formação de TNF- α por feedback negativo (TESSARO, Fernando Henrique Galvão, *et al.*, 2014). Existe um estudo realizado por HÄß, Ulrike *et al.*, (2023) onde foi demonstrado que administração do ômega 3 ocasiona também na diminuição de marcadores anti-inflamatório circulantes IL-10, sendo interpretado por efeito compensatório com base na diminuição das concentrações inflamatórias. Contudo essa associação ainda não está totalmente clara. Foram medidos os níveis desta citocina presente no LBA e os grupos pré-tratados com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado reduziram os

níveis de IL-10 induzidos por LPS sugerindo que o aumento nos níveis de IL-10 está associado com níveis aumentados de inflamação pulmonar.

Verificou-se que o LPS induziu um aumento no nível da citocina CXCL1/KC nos grupos de animais doentes. Esta é uma citocina homóloga à IL-8 humana (PINHEIRO, Nathalia Montouro., 2016). Estudos indicaram que CXCL1/KC contribui para o recrutamento de neutrófilos para os tecidos em resposta ao LPS (YIN, Zhigang *et al.*, 2021) e também tem sido utilizada para indicar inflamação nas células do epitélio pulmonar (KO, Hung-Shuo *et al.*, 2023). Surpreendentemente, nos nossos experimentos, o pré-tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado não foi capaz de reduzir seus níveis comparado ao grupo desafiado com LPS.

Enquanto que nos animais desafiados apenas com LPS, houve um aumento nos níveis de NO nas amostras. Em animais pré-tratados com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado levou a uma diminuição do NO no LBA. O estresse oxidativo é produzido no desenvolvimento da inflamação das vias aéreas e inicia um ciclo de feedback positivo que perpetua a inflamação, afetando sua resolução (WANG, Lei *et al.*, 2014). Dados experimentais sugerem que a produção de NO em maior quantidade pela iNOS possa ter efeitos nocivos sobre a circulação pulmonar em condições patológicas acompanhadas por intensa inflamação, como na SDRA. Pois foi observado que pacientes com SDRA apresentam concentrações pulmonares elevadas de metabólitos do NO (nitrito e nitrato) (DIAS-JUNIOR, *et al.*, 2008), contribuindo para o agravamento do quadro inflamatório. Os efeitos antioxidantes do ômega 3, como o EPA, são atribuídos à sua capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio associadas às membranas celulares e às lipoproteínas, inibindo a propagação de radicais livres através das múltiplas ligações duplas (TONG, Haiyan *et al.*, 2022). Foi observado uma diminuição na produção de NO no LBA em animais alimentados com óleo de bacalhau enriquecido com ômega 3 (SAINI, A.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S *et al.*, 2011). Em ensaios humanos a

suplementação dietética de PUFA n-3, verificou níveis mais baixos de eNOs, eosinófilos séricos no escarro (ZÚÑIGA-HERNÁNDEZ, Jessica *et al.*, 2022; SCHUBERT, R *et al.* 2009).

Nosso experimento *in vitro*, foi possível analisar que a concentração do ômega 3 livre (200 μ M) e o nanoestruturado (1 μ M) não apresentaram citotoxicidade. O pré-tratamento com a NanoDHA1 μ M+LPS100ng apresentou tendência a redução nas concentrações da citocina IL-6 próxima da significância. Contudo o DHA Livre 200 μ M não apresentou redução na concentração desta citocina. Nos resultados da citocina IL8/CXCL8, o pré-tratamento apresentou diferença significativa com NanoDHA1 μ M+LPS100ng, enquanto que o pré-tratamento com o DHA livre não apresentou redução desta citocina. Este dado pode estar relacionado ao potencial do ômega 3 (DHA) nanoestruturado mesmo estando em uma concentração 200 vezes menor. Esses resultados demonstram que o ômega 3 (DHA) nanoestruturado se demonstra promissor, visto seu potencial em reduzir IL-8 mesmo apresentando uma concentração drasticamente inferior a sua forma livre. A IL-8 prediz SDRA após trauma e é considerada um dos quimioatraentes de neutrófilos mais potentes na inflamação (Humphries DC, *et al.*, 2022). Um estudo anterior descobriu que RhoA medeia a ativação de NF-kB e a produção de IL-8/CXCL8 induzida por LPS em células epiteliais do trato respiratório (Qin L, *et al.*, 2014). IL-8/CXCL8 é uma quimiocina importante que promove o recrutamento de neutrófilos para a área em processo inflamatório. Os neutrófilos infiltrados podem piorar a resposta inflamatória ao liberar alguns mediadores, o que causa danos ao tecido do trato respiratório, hipersecreção de muco e insensibilidade aos esteroides (Yuliani FS *et al.*, 2022). Portanto a sua redução é extremamente promissora para uma boa resposta resolutiva mediante um modelo de SDRA.

A escolha do modelo experimental de SDRA induzida por LPS para averiguar os efeitos do ômega 3 (DHA) nanoestruturado se deve ao fato de que

a SDRA, é caracterizada como problema de saúde mundial, com morbimortalidade elevada. A SDRA é caracterizada por extensa reação inflamatória tecidual, marcada por neutrófilos, juntamente com a ruptura da barreira alvéolo-capilar levando ao grave comprometimento das trocas gasosas. Entretanto, até o presente momento não existe uma farmacoterapia adequada para tratar essa síndrome, sendo, portanto, urgente e necessário à busca por estratégias terapêuticas eficazes (CHANG et al., 2018; CRUZ; WEISS; ROCCO, 2016).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo tem algumas limitações que devem ser abordadas. Primeiro, não realizamos neste trabalho a administração do ômega 3 livre *in vivo*. Os custos para estas análises seriam proibitivos, fortalecendo a importância do desenvolvimento de nanoformulações o que viabilizou a execução do presente projeto. Trabalhos da literatura que utilizaram o ômega 3 livre e seus mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos foram importantes para a concepção do presente projeto. Os resultados atuais abrem perspectivas para análises futuras focando no potencial do ômega 3 (DHA) nanoestruturado.

6.1 CONCLUSÃO

O tratamento com o ômega 3 (DHA) nanoestruturado demonstrou atenuar parâmetros inflamatórios causados pelo desafio com LPS, de forma a

reduzir a migração celular, principalmente de neutrófilos, reduzir edema, e a concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-10 e NO no LBA *in vivo*. Tendo em vista que foi realizado uma única administração do ômega 3 (DHA) nanoestruturado via intraperitoneal como pré-tratamento nos animais, 24h antes do desafio com LPS, os resultados indicam seu potencial, considerando a capacidade do DHA em regular processo inflamatório. Os resultados *in vitro* se mostram consonantes visto que a nanoestrutura não alterou de maneira danosa a resposta inflamatória nas células do pneumócito pulmonar do tipo II – A549 e apresenta capacidade de diminuir uma das citocinas relacionadas ao processo inflamatório IL-8/CXCL8. Estes resultados são animadores e suportam a realização de mais experimentos para desvendar seus mecanismos de ação preventiva do DHA nanoestruturado.

6.2 PERSPECTIVAS:

Tendo como base os resultados deste trabalho, pretendemos realizar futuramente uma análise da inflamação sistêmica, contagem de células e níveis de mediadores pró-inflamatórios no sangue. Também analisaremos os processos oxidativos a nível pulmonar. Nos experimentos *in vitro* pretendemos traçar uma curva cinética das citocinas em diferentes tempos, 6, 12 e 24h, e em diferentes concentrações de LPS, auxiliando no entendimento das respostas metabólicas da inflamação, tendo em vista que os resultados em 24hs se demostam promissores com ausência de citotoxicidade, abrangendo mais alternativas para acompanhar o perfil anti-inflamatório do ômega 3 (DHA) nanoestruturado.

7. Referências Bibliográficas

AGUIAR NETO, Wanderlino de Sousa et al. Um breve levantamento bibliográfico sobre os ácidos graxos ômega-3 e suas características. 2018.

Akella A, Sharma P, Pandey R, Deshpande SB. Caracterização do modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo induzido por ácido oleico em ratos. *Indian J Exp Biol.* 2014;52(7):712-9.

BARICHELLO, Tatiana et al. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis—a narrative review. **Critical Care**, v. 26, n. 1, p. 14, 2022.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 2, p. 787–791, 15 jul. 2009.

BECKER, Joseph U. et al. Surviving sepsis in low-income and middle-income countries: new directions for care and research. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 9, p. 577-582, 2009.

BELLANI, G. et al. (2016). *Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries*. *JAMA*, v. 315, n. 8, p. 788-800. doi:10.1001/jama.2016.029.

BLANCO, Elvin; SHEN, Haifa; FERRARI, Mauro. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015.

BOR, Gizem et al. PEGylation of Phosphatidylglycerol/Docosahexaenoic Acid Hexosomes with d- α -Tocopheryl Succinate Poly (ethylene glycol) 2000 Induces Morphological Transformation into Vesicles with Prolonged

Circulation Times. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, n. 43, p. 48449-48463, 2022.

BOS, Lieuwe DJ; WARE, Lorraine B. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. **The Lancet**, 2022.

BOUKHENOUNA, Samia et al. Reactive oxygen species in chronic obstructive pulmonary disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

BUTT, Y.; KURDOWSKA, A.; ALLEN, T. C. Acute lung injury: A clinical and molecular review *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* College of American Pathologists, , 1 abr. 2016.

CALDER, Philip C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?. **British journal of clinical pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 645-662, 2013.

CANAS, Gustavo Jose Sandoval et al. Alimentos funcionais e seu potencial antioxidante: contextualizando a química na escola. 2019.

CARVALHO, Márcia V. de; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Cassiano F.; SILVA, Adriana R. PPAR gamma: from definition to molecular targets and therapy of lung diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 805, 2021.

CASTRO, Léo Victor G.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Cassiano F.; SILVA, Adriana R. Polarization of Microglia and Its Therapeutic Potential in Sepsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4925, 2022.

CAVALLI, Juliana et al. Chia oil prevents chemical and immune-mediated inflammatory responses in mice: Evidence for the underlying mechanisms. **Food Research International**, v. 149, p. 110703, 2021.

CHAVES, Janaina Braga et al. Potential of nanoformulations in malaria treatment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 999300, 2022.

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. doi: 10.1586/ers.10.71. PMID: 21128752.

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.

Chen J, Zeng T, Bi Y, Zhong Z, Xie K, Zhao X. Docosahexaenoic acid (DHA) attenuated paraquat induced lung damage in mice. *Inhal Toxicol*. 2013 Jan;25(1):9-16. doi: 10.3109/08958378.2012.750405. PMID: 23293968.

CLAYTON, Katherine N. et al. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. **Biomicrofluidics**, v. 10, n. 5, p. 054107, 2016.

DAMICO, Francisco Max et al. Injeção intravítrea de polissorbato 80: estudo funcional e morfológico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 44, p. 603-611, 2017.

DE CARVALHO PATRICIO, Beatriz Ferreira et al. Could the Lung Be a Gateway for Amphotericin B to Attack the Army of Fungi?. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2707, 2022.

DINICOLANTONIO, James J.; O'KEEFE, James H. Importance of maintaining a low omega-6/omega-3 ratio for reducing inflammation. **Open heart**, v. 5, n. 2, p. e000946, 2018.

DOMSCHEIT, Hannes et al. Molecular dynamics of lipopolysaccharide-induced lung injury in rodents. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 36, 2020.

DUVALL, Melody G.; LEVY, Bruce D. DHA-and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. **European journal of pharmacology**, v. 785, p. 144-155, 2016.

EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE et al. Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. **EFSA journal**, v. 16, n. 7, p. e05327, 2018.

FERREIRA, Larissa Adilis Maria Paiva et al. Efeito do alcaloide Curina nas vias de transdução de sinais TLR4/NFκB em granulócitos do pulmão no modelo experimental de lesão pulmonar aguda. 2020.

FU, Jingxin et al. A simple but efficient tumor-targeted nanoparticle delivery system constructed by oleic acid. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 2539-2548, 2022.

FUJISHIMA, S. Pathophysiology and biomarkers of acute respiratory distress syndrome *Journal of Intensive Care* BioMed Central Ltd., , 2014.

Gao HL. Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. *Acta Pharm Sin B* 2016;6:268e86.

GHADIRI, Maliheh; YOUNG, Paul M.; TRAINI, Daniela. Strategies to enhance drug absorption via nasal and pulmonary routes. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 113, 2019.

GOMES, Sharla Paes. **Estratificação das concentrações de interleucina 6 com potencial para identificação de novos biomarcadores de prognóstico na COVID-19**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Cassiano Felipe et al. Acute respiratory distress syndrome: role of oleic acid-triggered lung injury and inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

GONCALVES-DE-ALBUQUERQUE, Cassiano Felipe et al. The Yin and Yang of tyrosine kinase inhibition during experimental polymicrobial sepsis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 901, 2018.

Han S, Mallampalli RK. The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation. *J Immunol*. 2015 Feb 1;194(3):855-60.

HAß, Ulrike et al. Effects of Exercise and Omega-3-Supplemented, High-Protein Diet on Inflammatory Markers in Serum, on Gene Expression Levels in PBMC, and after Ex Vivo Whole-Blood LPS Stimulation in Old Adults. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 928, 2023.

HOTCHKISS, Richard S. et al. Sepsis and septic shock. **Nature reviews Disease primers**, v. 2, n. 1, p. 1-21, 2016. Boyd JH, Russell JA, Fjell CD. The meta-genome of sepsis: host genetics, pathogens and the acute immune response. *J Innate Immun* 2014; 6: 272–83.

HUMPHRIES, Duncan C. et al. Galectin-3 inhibitor GB0139 protects against acute lung injury by inhibiting neutrophil recruitment and activation. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 949264, 2022.

ISHIHARA, Tomoaki; YOSHIDA, Mio; ARITA, Makoto. Omega-3 fatty acid-derived mediators that control inflammation and tissue homeostasis. **International immunology**, v. 31, n. 9, p. 559-567, 2019.

Jung T, Hudson R, Rushlow W, Laviolette SR. Functional interactions between cannabinoids, omega-3 fatty acids, and peroxisome proliferator-activated receptors: Implications for mental health pharmacotherapies. *Eur J*

Neurosci. 2022 Feb;55(4):1088-1100. doi: 10.1111/ejn.15023. Epub 2020 Dec 20. PMID: 33108021.

KAUR, Harsheen et al. Ellagic acid-loaded, tween 80-coated, chitosan nanoparticles as a promising therapeutic approach against breast cancer: In-vitro and in-vivo study. **Life Sciences**, v. 284, p. 119927, 2021.

KEMSE, Nisha G.; KALE, Anvita A.; JOSHI, Sadhana R. A combined supplementation of omega-3 fatty acids and micronutrients (folic acid, vitamin B12) reduces oxidative stress markers in a rat model of pregnancy induced hypertension. PloS one, v. 9, n. 11, p. e111902, 2014.

KO, Hung-Shuo et al. Alteration in branching morphogenesis via YAP/TAZ in fibroblasts of fetal lungs in an LPS-induced inflammation model. **Molecular Medicine**, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2023.

KOCHERLAKOTA, Chandrashekhar et al. Inhalation of nebulized omega-3 fatty acids mitigate LPS-induced acute lung inflammation in rats: Implications for treatment of COPD and COVID-19. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 179, p. 102426, 2022.

KONG, Junjun et al. Polycaprolactone nanocomposite reinforced by bioresource starch-based nanoparticles. International journal of biological macromolecules, v. 102, p. 1304-1311, 2017.

KUMAR, Vijay. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1722, 2020.

KUS-YAMASHITA, Mahyara Markievicz Mancio; MANCINI FILHO, Jorge. Considerações sobre a participação dos ácidos graxos poli-insaturado ômega 3 na epidemia por COVID 19 Considerations on the role of omega-3

polyunsaturated fatty acids in the COVID 19 epidemic. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 3, p. 8655-8673, 2022.

LEITE, Milane S. et al. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. **Shock**, v. 23, n. 2, p. 173-178, 2005.

LI, Wenli et al. Classic signaling pathways in alveolar injury and repair involved in sepsis-induced ALI/ARDS: new research progress and prospect. **Disease Markers**, v. 2022, 2022.

LI, Xinzhi; YU, Ying; FUNK, Colin D. Cyclooxygenase-2 induction in macrophages is modulated by docosahexaenoic acid via interactions with free fatty acid receptor 4 (FFA4). **The FASEB Journal**, v. 27, n. 12, p. 4987-4997, 2013.

Liu H, Yu X, Yu S, Kou J. Molecular mechanisms in lipopolysaccharide-induced pulmonary endothelial barrier dysfunction. *Int Immunopharmacol*. 2015 Dec;29(2):937-946. doi: 10.1016/j.intimp.2015.10.010. Epub 2015 Oct 20. PMID: 26462590.

LIU, Chang; XIAO, Kun; XIE, Lixin. Advances in the use of exosomes for the treatment of ALI/ARDS. **Frontiers in Immunology**, p. 4449, 2022.

LIU, Chenchen et al. Alpha-linolenic acid pretreatment alleviates NETs-induced alveolar macrophage pyroptosis by inhibiting pyrin inflammasome activation in a mouse model of sepsis-induced ALI/ARDS. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1146612, 2023.

LIU, Di et al. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options. **Military Medical Research**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2022.

LUYT, C.-E. *et al.* (2020). *Pulmonary infections complicating ARDS. Intensive Care Medicine.* doi:10.1007/s00134-020-06292-z

M. A. Matthay, L. B. Ware, and G. A. Zimmerman, "The acute respiratory distress syndrome," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 8, pp. 2731–2740, 2012.

Ma B, Xu H, Zhuang W, Wang Y, Li G, Wang Y. Reactive oxygen species responsive theranostic nanoplatforM for two-photon aggregation-induced emission imaging and therapy of acute and chronic inflammation. *ACS Nano* 2020;14:5862e73.

MA, Huayi *et al.* Role and mechanism of maresin-1 in acute lung injury induced by trauma-hemorrhagic shock. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, v. 26, p. e923518-1, 2020.

MÁCA, Jan *et al.* Past and present ARDS mortality rates: a systematic review. **Respiratory care**, v. 62, n. 1, p. 113-122, 2017.

MAGNO, F. ; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, C ; MORAES, I. M. M. ; REIS, P. A. ; ROCHA, V. N. ; BOZZA, P; SILVA, A. R. ; CASTRO-FARIANETO, H. C. . Simvastatin Posttreatment Controls Inflammation and Improves Bacterial Clearance in Experimental Sepsis. *MEDIATORS OF INFLAMMATION*, v. 2020, p. 1-11, 2020.

MARON-GUTIERREZ, Tatiana (2013). Dose única de células mesenquimais reduz a injúria em modelos experimentais de síndrome do desconforto respiratório agudo: Análise da inflamação e remodelamento tecidual. 137 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MARSHALL, John C. The PIRO (predisposition, insult, response, organ dysfunction) model: toward a staging system for acute illness. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 27-35, 2014.

MATTHAY, Michael A. et al. The acute respiratory distress syndrome. *The Journal of clinical investigation*, v. 122, n. 8, p. 2731-2740, 2012.

MEYER, Nuala J.; GATTINONI, Luciano; CALFEE, Carolyn S. Acute respiratory distress syndrome. **The Lancet**, v. 398, n. 10300, p. 622-637, 2021.

MILLAR, Fraser R. et al. The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome: insights and therapeutic opportunities. **Thorax**, v. 71, n. 5, p. 462-473, 2016.

MITCHELL, Jane A. et al. Cyclooxygenases and the cardiovascular system. **PharWATANABE**, Yasuhiro; TATSUNO, Ichiro. Prevention of cardiovascular events with omega-3 polyunsaturated fatty acids and the mechanism involved. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 27, n. 3, p. 183-198, 2020.

MITCHELL, Jane A. et al. Cyclooxygenases and the cardiovascular system. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 217, p. 107624, 2021.

MOHAMMAD RIZWAN SIDDIQUI, M. T. M. S. K. M. T. S. MiR-144-3p não regulado atenua lesão pulmonar aguda induzida por LPS por inibição da via de sinalização ROCK1. *The FASEB Journal*, v. 33, n. No. 1_supplement, 2019.

MOKRA, D.; KOSUTOVA, P. Biomarkers in acute lung injury. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, v. 209, p. 52–58, 1 abr. 2015.

Murgia X, de Souza Carvalho C, Lehr CM. Overcoming the pulmonary barrier: new insights to improve the efficiency of inhaled therapeutics. *Eur J Nanomed* 2014;6:157e69.

NIYOM, Yupaporn et al. Synergy between polymer crystallinity and nanoparticles size for payloads release. *Journal of colloid and interface science*, v. 550, p. 139-146, 2019.

NORDGREN, Tara M. et al. The omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid attenuates organic dust-induced airway inflammation. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 5434-5452, 2014.

NOVAK, T.E., BABCOCK, T.A., JHO, D.H., HELTON, W.S., ESPAT, N.J. NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *American Journal of Physiology*, 284: L84–9, 2003.

OH, Da Young; WALENTA, Evelyn. *Omega-3 fatty acids and FFAR4. Frontiers in Endocrinology*. [S.l.: s.n.]. , 2014 ROUNDS, S.; LU, Q. (2018). *Cigarette smoke alters lung vascular permeability and endothelial barrier function* (2017 Grover Conference Series). *Pulm Circ*, v. 8, n. 3. <https://dx.doi.org/10.1177%2F2045894018794000>.

OLIVEIRA, Flora Magno de Jesus et al. Simvastatin Posttreatment Controls Inflammation and Improves Bacterial Clearance in Experimental Sepsis. 2020.

OLIVEIRA, Maria Talita Pacheco et al. **Nanocápsulas contendo resveratrol: redução da inflamação pulmonar aguda induzida por LPS**. 2019. Tese de Doutorado.

P. C. Calder, “*n*-3 Fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions,” *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 72, no. 3, pp. 326–336, 2013.

Paolo Cotogni, Antonella Trombetta, Giuliana Muzio, Marina Maggiora, Rosa Angela Canuto, "The Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid Modulates Inflammatory Mediator Release in Human Alveolar Cells Exposed to Bronchoalveolar Lavage Fluid of ARDS Patients", *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 642520, 11 pages, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/642520>

PINHEIRO, Nathalia Montouro. **Efeito da redução da função colinérgica na mecânica pulmonar e na histopatologia pulmonar em modelo experimental de inflamação aguda induzida por instilação de LPS em camundongos geneticamente modificados**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PINHEIRO, Nathalia Montouro. **Efeito da redução da função colinérgica na mecânica pulmonar e na histopatologia pulmonar em modelo experimental de inflamação aguda induzida por instilação de LPS em camundongos geneticamente modificados**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

QIAO, Qi et al. Nanomedicine for acute respiratory distress syndrome: The latest application, targeting strategy, and rational design. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 10, p. 3060-3091, 2021.

QIN, Lingzhi et al. p120 modulates LPS-induced NF- κ B activation partially through RhoA in bronchial epithelial cells. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

REIS, Gustavo Oliveira dos et al. Avaliação do potencial anti-inflamatório in vitro de cromenos sintéticos e revisão sistemática sobre a eficácia anti-

inflamatória de cumarinas em modelos murinos de inflamação aguda pulmonar induzida por LPS. 2022.

REN, Tianbin et al. Preparation and therapeutic efficacy of polysorbate-80-coated amphotericin B/PLA-b-PEG nanoparticles. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 20, n. 10, p. 1369-1380, 2009.

RIZZO, Alicia N. et al. Alveolar epithelial glycocalyx degradation mediates surfactant dysfunction and contributes to acute respiratory distress syndrome. **JCI insight**, v. 7, n. 2, 2022.

Roux J, McNicholas CM, Carles M, Goolaerts A, Houseman BT, Dickinson DA, et al. IL-8 inhibits cAMP-stimulated alveolar epithelial fluid transport via a GRK2/PI3K-dependent mechanism. *FASEB J.* 2013;27(3):1095-106.

SÁ, Amanda Vianna de Souza de. **Instrumento para mensuração dos riscos relacionados à pronação de pacientes críticos**. 2019. Dissertação de Mestrado.

SAINI, A.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Sea-cod oil supplementation alters the course of *Streptococcus pneumoniae* infection in BALB/c mice. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, v. 30, p. 393-400, 2011.

SANTOS, Laise Aline Martins dos et al. **Avaliação do potencial anti-inflamatório dos derivados tiazolidínicos LPSF/GQ-2 e LPSF/RA-4 em modelo de lesão pulmonar aguda**. 2018. Tese de Doutorado.

SCHUBERT, R. et al. Effect of n–3 polyunsaturated fatty acids in asthma after low-dose allergen challenge. *International archives of allergy and immunology*, v. 148, n. 4, p. 321-329, 2009.

Shuvaev VV, Muro S, Arguiri E, Khoshnejad M, Tliba S, Christofidou-Solomidou M, et al. Size and targeting to PECAM vs ICAM control endothelial delivery, internalization and protective effect of multimolecular SOD conjugates. *J Control Release* 2016;234: 115e23.

SILVA, A. R., MORAES, B. P. T., & GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. F. (2020). *Mediterranean Diet: Lipids, Inflammation, and Malaria Infection*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4489. doi:10.3390/ijms2112448

SPRAGG, Roger G. et al. Beyond mortality: future clinical research in acute lung injury. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 181, n. 10, p. 1121-1127, 2010.

SONG, Yan et al. Synthesis of polyurethane/poly (urea-formaldehyde) double-shelled microcapsules for self-healing anticorrosion coatings. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 38, p. 45-52, 2020.

TESSARO, Fernando Henrique Galvão. Ação da insulina na liberação de citocinas por macrófagos residentes de camundongos diabéticos estimulados com lipopolissacarídeo. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Timilsena YP, Vongsvivut J, Adhikari R, Adhikari B. Physicochemical and thermal characteristics of Australian chia seed oil. *Food Chem*. 2017;228:394-402.

TOMÉ-CARNEIRO, J. et al. (2020). *Olive oil consumption and its repercussions on lipid metabolism*. *Nutrition Reviews*. doi:10.1093/nutrit/nuaa014.

TONG, Haiyan et al. Lung function and short-term ambient air pollution exposure: differential impacts of omega-3 and omega-6 fatty acids. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 19, n. 4, p. 583-593, 2022.

TRIPATHI, Chandra Bhushan et al. ω -3 Fatty acid synergized novel nanoemulsifying system for rosuvastatin delivery: in vitro and in vivo evaluation. **AAPS pharmscitech**, v. 19, p. 1205-1218, 2018.

VACHHARAJANI, Vidula; LIU, Tiefu; MCCALL, Charles E. Epigenetic coordination of acute systemic inflammation: potential therapeutic targets. **Expert review of clinical immunology**, v. 10, n. 9, p. 1141-1150, 2014.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection *Trends in Immunology*, mar. 2011.

VELLOSO, Licio A.; FOLLI, Franco; SAAD, Mario J. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota, and metabolic inflammation. **Endocrine reviews**, v. 36, n. 3, p. 245-271, 2015.

VIEIRA, Maiana da Costa et al. The benefits of omega-3 fatty acid nanocapsulation for the enrichment of food products: a review. **Revista de Nutrição**, v. 33, 2020.

WANG, Lei et al. Effects of resolvin D1 on inflammatory responses and oxidative stress of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Chinese Medical Journal*, v. 127, n. 5, p. 803-809, 2014.

WASNICK, Roxana et al. Notch1 induces defective epithelial surfactant processing and pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 207, n. 3, p. 283-299, 2023

WATANABE, Yasuhiro; TATSUNO, Ichiro. Prevention of cardiovascular events with omega-3 polyunsaturated fatty acids and the mechanism

involved. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 27, n. 3, p. 183-198, 2020.

WHO, “*The top 10 causes of death*”. Geneva: World Health Organization, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

WILLIAMS, George W. et al. Fast-spiking Interneurons Contribute to Propofol-induced Facilitation of Firing Synchrony in Pyramidal Neurons of the Rat Insular Cortex. **ANESTHESIOLOGY**, v. 134, n. 2, p. 270-282, 2021.

Wu Z, Zhang L, Zhao X, Li Z, Lu H, Bu C, Wang R, Wang X, Cai T, Wu D. Protectin D1 protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibition of neutrophil infiltration and the formation of neutrophil extracellular traps in lung tissue. *Exp Ther Med*. 2021 Oct;22(4):1074. doi:

XIA, Haifa et al. Resolvin D1 alleviates ventilator-induced lung injury in mice by activating PPAR/NF- κ B signaling pathway. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

XU, Baiye; WANG, Haidao; CHEN, Zhen. Puerarin inhibits ferroptosis and inflammation of lung injury caused by sepsis in LPS induced lung epithelial cells. **Frontiers in pediatrics**, v. 9, p. 706327, 2021.

Yadav H, Thompson BT, Gajic O. Fifty Years of Research in ARDS. Is Acute Respiratory Distress Syndrome a Preventable Disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Mar 15;195(6):725-736. doi: 10.1164/rccm.201609-1767CI. PMID: 28040987.

YANG, Jing-Xiang et al. Protectin DX promotes epithelial injury repair and inhibits fibroproliferation partly via ALX/PI3K signalling pathway. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 24, n. 23, p. 14001-14012, 2020.

YEH, C. H. et al. Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK-NF- κ B pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 69, p. 249–257, abr. 2014.

YILDIRIM, Fatma; KARAMAN, İrem; KAYA, Akin. Current situation in ARDS in the light of recent studies: Classification, epidemiology and pharmacotherapeutics. **Tuberkuloz ve Toraks**, v. 69, n. 4, p. 535-546, 2021

YIN, Zhigang et al. An integrated network pharmacology and RNA-Seq approach for exploring the preventive effect of *Lonicerae japonicae* flos on LPS-induced acute lung injury. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113364, 2021.

YU, Ying et al. Vascular COX-2 modulates blood pressure and thrombosis in mice. **Science translational medicine**, v. 4, n. 132, p. 132ra54-132ra54, 2012.

YULIANI, Fara Silvia et al. Thrombin induces IL-8/CXCL8 expression by DCLK1-dependent RhoA and YAP activation in human lung epithelial cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 29, n. 1, p. 95, 2022.

ZHANG, A. et al. Protective effects of syringin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Journal of Surgical Research*, v. 209, p. 252–257, 2017.

ZHU, Jie et al. Do B vitamins enhance the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cardiovascular diseases? A systematic review of clinical trials. *Nutrients*, v. 14, n. 8, p. 1608, 2022.

ZÚÑIGA-HERNÁNDEZ, Jessica et al. N-3 PUFAs and their specialized pro-resolving lipid mediators on airway inflammatory response: beneficial effects

in the prevention and treatment of respiratory diseases. *Food & Function*, v. 13, n. 8, p. 4260-4272, 2022.

8 Obras Consultadas

Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012;307(23):2526-33.

ALESSANDRI, Francesco; PUGLIESE, Francesco; RANIERI, V. Marco. The role of rescue therapies in the treatment of severe ARDS. **Respiratory care**, v. 63, n. 1, p. 92-101, 2018.

MOKRA, D. et al. Effects of budesonide on the lung functions, inflammation and apoptosis in a saline-lavage model of acute lung injury. **J Physiol Pharmacol**, v. 67, n. 6, p. 919-932, 2016.