

DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO MUCOADESIVA E TERMORRESPONSIVA NANOESTRUTURADA CONTENDO O FÁRMACO ANTI-INFLAMATÓRIO MELOXICAM: FASE II – VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA EM UM MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL

Yves Henrique Ramos Mansano (PIBIC/CNPq), Cristiano Correia Bacarin (Coorientador), Nathalia Akemi Neves Kohara, Jéssica Mendes Bonato, Marcos Luciano Bruschi, Maria Vitoria Gouveia Botan, Humberto Milani (Orientador).

E-mail: hmilani@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmacologia /Neuropsicofarmacologia.

Palavras-chave: administração intranasal, meloxicam, neuroinflamação.

RESUMO

O desenvolvimento de formulações capazes de conferir melhor biodisponibilidade cerebral para um grande número de fármacos é de grande relevância no campo da terapêutica farmacológica. Esse objetivo é dificultado por questões farmacocinéticas, como as influências do meio gastrointestinal, os processos de biotransformação e a passagem pela barreira hematoencefálica. A via intranasal vem sendo explorada para aumentar o acesso de fármacos ao cérebro (via *nose-to-brain*), devido à rica vascularização e às terminações nervosas que alcançam diretamente a região cerebral, além da facilidade de acesso. O Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Fármacos (LABSLiF) do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá concluiu os estudos sobre uma formulação nanoestruturada, mucoadesiva e termorresponsiva (MEL-nano) contendo o fármaco meloxicam (MEL), um anti-inflamatório não esteroide, que vem sendo estudado como possível candidato para a terapia de condições inflamatórias cerebrais, como a isquemia cerebral. O presente estudo objetiva avaliar se a MEL-nano administrada via intranasal é eficaz para reduzir a resposta inflamatória induzida por isquemia cerebral. Para isso, camundongos foram submetidos ao modelo de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) e, imediatamente após a isquemia e nos dois dias consecutivos, os animais receberam aplicação nasal (rinário) de MEL-nano (0,5 mg/kg, 20 µl), 1x/dia. Para fins de comparação, realizou-se o mesmo esquema para a administração oral de meloxicam® (1mg/kg). Ao final dos tratamentos, os animais foram eutanasiados e seus cérebros extraídos para análise imuno-histoquímica dos marcadores relacionados a inflamação, Iba-1 (micróglia) e GFAP (astrócitos).

INTRODUÇÃO

Milhões de pessoas em todo o mundo necessitam de tratamento com fármacos que estejam adequadamente disponíveis no sistema nervoso central (SNC). Muitas vezes, o alcance desse objetivo é dificultado por questões de natureza farmacocinética inerentes à via oral de administração, tais como as influências exercidas pelo meio gastrointestinal, processos de biotransformação e passagem pela barreira hematoencefálica. Portanto, o desenvolvimento de formulações capazes de conferir melhor biodisponibilidade cerebral para um grande número de fármacos é de grande relevância no campo da terapêutica farmacológica. A via intranasal (I.N.) possui grande área superficial e vascularização, além da presença de terminações nervosas (nervos trigêmeo e olfatório) que alcançam diretamente a região cerebral e, por isso, vem

sendo explorada como estratégia para aumentar o acesso de fármacos ao cérebro (Agrawal et al., 2020). O LABSLiF desenvolveu uma formulação nanoestruturada, mucoadesiva e termorresponsiva contendo o fármaco anti-inflamatório meloxicam (Botan et al., 2024), referido aqui como MEL-nano. Esta formulação foi devidamente caracterizada do ponto de vista físico-químico. Entretanto, uma fase subsequente desses estudos requer a avaliação *in vivo* da funcionalidade dessa plataforma nanoestruturada. A neuroinflamação é um elemento chave na progressão de diversas doenças do SNC, incluindo isquemia cerebral, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e outras. Efeitos protetores do meloxicam têm sido observados em modelos de isquemia cerebral focal (Ugidos et al., 2023).

Portanto, o presente estudo objetivou avaliar se a formulação MEL-nano administrada por via nasal, ou seja, no rinário, é eficaz para reduzir a resposta inflamatória desencadeada por uma condição experimental de isquemia cerebral global e transitória. O rinário é definido como a região globosa, sem pelos, em torno das narinas, e equivalente ao nariz. Vários estudos demonstraram a viabilidade desta via para a administração experimental de fármacos destinados ao cérebro (Lukas & Neumann 2012; Medina et al., 2014 Sinen et al., 2024).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: camundongos Swiss machos foram mantidos em condições padrões de alojamento. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo CEUA (nº 4343270524).

Isquemia cerebral: Sob anestesia (isoflurano/oxigênio), uma incisão foi feita na região ventral do pescoço para oclusão das artérias carótidas comuns (OBACC) com cliques de aneurisma. Após 20 minutos de oclusão, os cliques foram removidos, permitindo a reperusão cerebral. A incisão foi suturada, e o animal foi mantido em caixa térmica por cerca de 2 horas. No grupo controle (falso-isquêmico ou “sham”), as artérias carótidas foram expostas, mas não ocluídas.

Tratamento farmacológico: Os seguintes grupos foram definidos conforme os tratamentos: Grupo 1: Sham + Veículo (nasal, 20 µl), Grupo 2: OBACC + Veículo (nasal, 20 µl); Grupo 3: OBACC + MEL-nano (0,5 mg/ml, 20 µl); Grupo 4: Sham + veículo (oral, 1 ml/kg); Grupo 5: OBACC + meloxicam® (1 mg/kg, oral).

Imuno-histoquímica: Após os tratamentos, o animal foi perfundido e o cérebro foi criopreservado. Cortes histológicos de 50 µm foram submetidos a bloqueio de peroxidase e de reações inespecíficas. As secções foram incubadas com anticorpos primários anti-Iba-1 (micróglia) e GFAP (astrócitos) overnight a 4°C, seguidos por anticorpos secundários e complexo avidina-biotina (ABC). A reação foi revelada com DAB-níquel. Análise: A quantificação foi realizada em microscópio ótico, utilizando o software ImageJ para contar células imunorreativas ou medir densidade óptica integrada (DOI) em 6-8 secções/animal. Os dados são expressos como média ± EPM.

Estatísticas: Empregou-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste post hoc de Sidak para comparações entre grupos. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra os efeitos da isquemia e dos tratamentos com meloxicam oral ou nasal sobre a resposta glial.

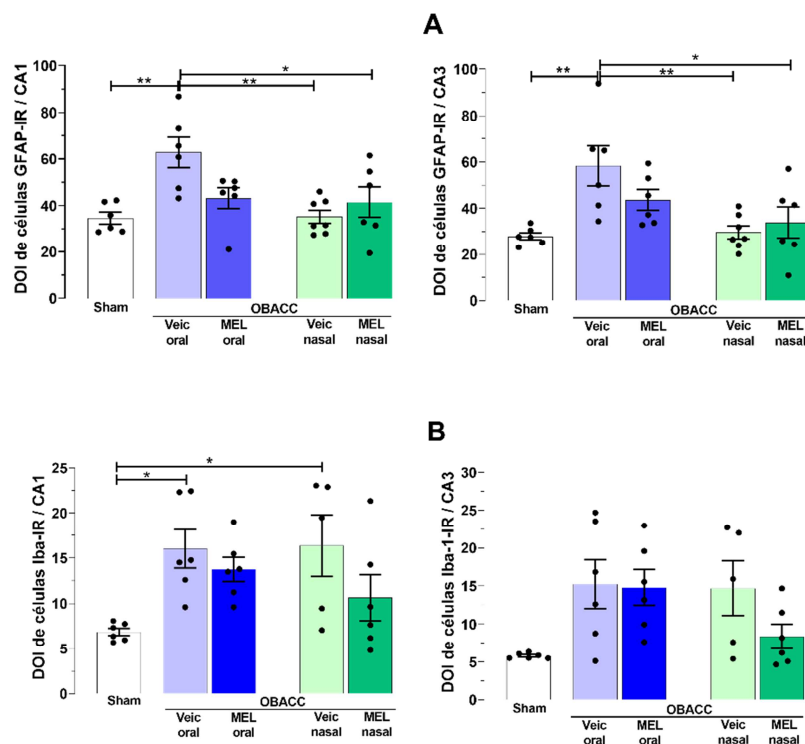


Figura 1 – Efeitos da formulação MEL-nano e do meloxicam® comercial administrados por via nasal ou oral, respectivamente, sobre a resposta das células gliais induzida pela OBACC. Painel **A**, astrócitos (marcador GFAP); painel **B**, micróglia (marcador Iba-1) medidos nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo de camundongos Swiss. As barras representam a média $\pm$ EPM ($n = 5-7$ /grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Para astrócitos (Fig. 1A), a densidade óptica integrada (DOI) aumentou nas regiões CA1 e CA3 do grupo isquêmico (OBACC) tratado com veículo por via oral (Veic oral, $p < 0,01$), comparado ao grupo controle ('sham'). Efeito semelhante da isquemia ocorreu sobre as micróglia na região CA1 do hipocampo (Fig. 1B, esquerda, $p < 0,05$), mas não significativamente na região CA3 (Fig. 1B, direita, $p > 0,05$). Comparado com o veículo oral, o meloxicam® oral reduziu a DOI sobre os astrócitos no CA1 e CA3. Esse efeito, porém, não alcançou significância estatística. Sobre as micróglia (Fig. 1B), essa tendência de efeito do meloxicam® oral foi menos evidente no CA1, e nenhum efeito sobre o CA3. Efeito interessante, porém, inesperado, ocorreu com o veículo da formulação nasal (Veic nasal). Neste grupo, a DOI para astrócitos (Fig. 1A) foi significativamente reduzida no CA1 e CA3 em comparação ao grupo Veic oral ($p < 0,01$). Este efeito do veículo nasal foi muito similar ao efeito da formulação MEL-nano nasal ($p < 0,05$) no sentido de proteger contra a neuroinflamação desencadeada pela isquemia. Se este efeito do veículo nasal se deve a algum excipiente da formulação (Poloxamer 407, hidroxipropil metilcelulose etc.) requer investigação. Isto não ocorreu, contudo, sobre o marcador Iba-1 (micróglia, Fig. 1B). De fato, na região CA1, uma significativa ativação

microglial ocorreu tanto no grupo Veic oral quanto no grupo Veic nasal, comparados ao grupo sham ($p < 0.05$, Fig. 1B, esquerda). Efeito similar da isquemia ocorreu no CA3, porém, sem significância estatística (Fig. 1B, direita). Importante notar que, a despeito da falta de significância estatística, o tratamento com a formulação MEL-nano nasal parece ter reduzido a DOI das células Iba-1 imunorreativas, indicando um efeito anti-inflamatório da formulação MEL-nano nasal. Esse “aparente” efeito anti-inflamatório não ocorreu, contudo, no grupo tratado com o meloxicam® oral.

CONCLUSÕES

Em que pese a falta de significância estatística, esses resultados preliminares indicam que a formulação MEL-nano para aplicação nasal foi superior à formulação convencional dada por via oral para entregar o fármaco meloxicam ao cérebro e exercer efeito anti-inflamatório na presente condição experimental de isquemia cerebral. Os estudos deverão continuar em outros modelos de neuroinflamação e com tamanho amostral maior, visando a validação farmacocinética e farmacológica da formulação MEL-nano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pelo financiamento, ao Laboratório pela oportunidade de aquisição de experiências e conhecimentos e aos meus orientadores.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, M., SARAF, S., SARAF, S., DUBEY S.K, PURI A., PATEL R.J., AJAZUDDIN, RAVICHANDIRAN, V., MURTY U.S., ALEXANDER, A. Recent strategies and advances in the fabrication of nano lipid carriers and their application towards brain targeting. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, 2020; 321, 372–415.

BOTAN, M.V.G., SILVA, J.B., BRUSCHI, M.L. Development of nanostructured environmentally responsive system containing hydroxypropyl methylcellulose for nose-to-brain administration of meloxicam. **Int J Biol Macromol**, 2024; 262(Pt 1):130015.

LUKAS, L., NEUMANN, I.D. Nasal application of neuropeptide S reduces anxiety and prolongs memory in rats: social versus non-social effects. **Neuropharmacology**, 2012;62(1):398-405.

MEDINA, G., JI G., GRÉGOIRE, S., NEUGEBAUER, V. Nasal application of neuropeptide S inhibits arthritis pain-related behaviors through an action in the amygdala. **Mol Pain**, 2014; 10:32.

SINEN, O., SINEN, A.G., DERIN, N., ASLAN, M.A. Nasal application of kisspeptin-54 mitigates motor deficits by reducing nigrostriatal dopamine loss in hemiparkinsonian rats. **Behav Brain Res**, 2024; 468:115035.

UGIDOS, I.F., RODRÍGUEZ, P.G., GALDIANO, M.S., BELMONTE, E.F., SOTO, B.A., RODRÍGUEZ, D.P., ORDEN, J.M.G., LÓPEZ, A.F. Neuroprotective effects of meloxicam on transient brain ischemia in rats: The two faces of anti-inflammatory treatments. **Neural Regeneration Res**, 2023;18(9):1961-1967.