

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Estratégias de formulação com vista à melhoria dos resultados terapêuticos na doença pulmonar obstrutiva crónica: Desafios e oportunidades

Cátia Sofia Estorãos da Silva

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Ana Margarida Grenha

2022

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Estratégias de formulação com vista à melhoria dos resultados terapêuticos na doença pulmonar obstrutiva crónica: Desafios e oportunidades

Cátia Sofia Estorãos da Silva

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Ana Margarida Grenha

2022

Estratégias de formulação com vista à melhoria dos resultados terapêuticos na doença pulmonar obstrutiva crónica: Desafios e oportunidades

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve, 2022

(Cátia Sofia Estorãos da Silva)

Copyright © Cátia Sofia Estorãos da Silva

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Ana Margarida Grenha, por toda a paciência, disponibilidade e compreensão que mostrou ao longo do percurso de escrita da minha dissertação. Agradeço também as palavras motivadoras que me ofereceu quando mais precisei.

À minha mãe, pelo apoio incondicional que me deu ao longo de todos estes anos, e pela grande Mulher que é. Por ser minha mãe, minha melhor amiga, minha conselheira, minha confidente, e muito mais. Foi graças à sua força e determinação, que sempre admirei e tentei ter como exemplo, que me tornei na pessoa que sou hoje e fui capaz de chegar até aqui.

A todos os meus amigos – aqueles que estão comigo desde pequena, aqueles que conheci no ensino secundário, e aqueles que fiz ao longo do meu percurso académico. Sempre acreditaram em mim e conseguiram convencer-me de que eu era capaz de concluir este último desafio, mesmo quando eu duvidava de mim mesma.

E por fim, a todos aqueles que estiveram presentes ao longo desta etapa e que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse aqui, deixo o meu mais sincero obrigado.

“It always seems impossible until it’s done.”

– Nelson Mandela

Resumo

A doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) é uma doença do foro pulmonar que é caracterizada por sintomas respiratórios persistentes, como a dispneia e a tosse, e uma limitação contínua do fluxo de ar. O fumo de tabaco é considerado o principal fator de risco, mas alguns fatores do indivíduo também exercem um papel importante no desenvolvimento desta patologia. Atualmente, o tratamento existente foca-se no alívio da sintomatologia através da administração de broncodilatadores de longa duração e, quando necessário e adequado, corticosteróides inaláveis. A via pulmonar continua a ser a via preferencial para o tratamento desta doença, pelo facto de permitir uma administração localizada e oferecer várias vantagens, como um início de ação mais rápido e efeitos adversos reduzidos. Porém, o pulmão é um órgão muito complexo, pelo que também existem alguns desafios na utilização desta via.

Apesar de ser uma das doenças crónicas mais comuns, a DPOC continua a ser um grande problema de saúde pública, apresentando morbilidade e mortalidade crescentes. Estes dados provam que as terapêuticas convencionais nem sempre são suficientes para controlar a doença, pelo que existe uma necessidade crescente de encontrar alternativas que permitam melhorar os resultados terapêuticos.

Várias estratégias de formulação têm surgido ao longo dos últimos anos para tentar colmatar os obstáculos que impedem o sucesso terapêutico nos doentes com DPOC. Neste sentido, a nanotecnologia, as terapêuticas com RNA, e outras estratégias, têm-se mostrado cada vez mais prevalentes e têm vindo a ganhar peso a nível de investigação, com o intuito de explorar as oportunidades que cada uma delas pode oferecer, bem como os desafios que terão de ser solucionados na eventualidade da sua implementação.

Neste contexto, o objetivo desta dissertação consiste em explorar algumas das estratégias de formulação que estão atualmente em investigação e que apresentam resultados promissores no tratamento da DPOC, juntamente com as oportunidades e os desafios a elas associados.

Palavras-chave: doença pulmonar obstrutiva crónica; estratégias de formulação; nanotecnologia; sistemas de administração pulmonar.

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a lung disease characterized by persistent respiratory symptoms, like dyspnea and cough, and a continuous airflow limitation. Cigarette smoke is considered the main risk factor, but some factors of the individual also play an important role in the development of this disease. At present, the existing treatment focuses on relieving symptoms through the administration of long-acting bronchodilators and, when deemed necessary and appropriate, inhaled corticosteroids. The pulmonary route continues to be preferential for the treatment of this disease, as it allows a localized delivery and offers several advantages, such as a faster onset of action and reduced side effects. However, the lungs are a very complex organ, so there are some challenges in using this route.

Despite being one of the most common chronic diseases, COPD continues to be a major public health problem, with growing morbidity and mortality. This data proves that conventional therapies are not always sufficient to control the disease, so there is a rising need to find alternatives to help improve therapeutic results.

Several formulation strategies have emerged over the last few years to try to overcome the obstacles that prevent therapeutic success in COPD patients. In this sense, nanotechnology, RNA therapies, and other strategies, have become increasingly prevalent and gather popularity in the research field, with the intent of studying the opportunities each has to offer, as well as the challenges that will need to be resolved in the event of their implementation.

In this context, the purpose of this dissertation is to explore some of the formulation strategies that are currently under investigation and show promising results in the treatment of COPD, along with the associated opportunities and challenges.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease; formulation strategies; nanotechnology; pulmonary drug delivery systems.

Índice de conteúdo

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
3. Metodologia	3
4. O sistema respiratório	4
4.1. Anatomia e fisiologia do pulmão	6
4.1.1. Árvore respiratória	7
4.1.2. Bronquíolos respiratórios e alvéolos	9
5. Doença pulmonar obstrutiva crônica	12
5.1. Epidemiologia	13
5.2. Causas e fatores de risco	16
5.2.1. Fatores genéticos	17
5.2.2. Desenvolvimento e função pulmonar.....	18
5.2.3. Idade e sexo	20
5.2.4. Fatores ambientais.....	21
5.3. Fisiopatologia.....	23
5.4. Sinais e sintomas	24
5.5. Exacerbações.....	25
5.6. Diagnóstico e avaliação	26
6. Opções farmacológicas e algoritmos terapêuticos utilizados no tratamento da DPOC	29
6.1. Fármacos para administração pulmonar	29
6.2. Fármacos para administração sistêmica	31
7. O pulmão como via de administração	34
7.1. Deposição, dissolução e eliminação das partículas de um aerossol.....	35
7.2. Tipos de dispositivos para administração pulmonar	37

7.2.1. Inaladores pressurizados com válvula doseadora.....	37
7.2.2. Inaladores de pó seco	37
7.2.3. Inaladores de névoa suave.....	38
7.2.4. Nebulizadores.....	39
8. Estratégias de formulação para o tratamento da DPOC	40
8.1. Estratégias de formulação com base na nanotecnologia.....	40
8.1.1. Nanopartículas poliméricas	41
8.1.2. Lipossomas.....	47
8.1.3. Nanopartículas inorgânicas	52
8.2. Terapêuticas com base em RNAs	56
8.2.1. Micro-RNAs.....	57
8.2.2. Pequenos RNAs de interferência	58
8.3. Outras estratégias de formulação de interesse	60
9. Conclusão.....	67
10. Referências bibliográficas	68

Índice de figuras

Figura 4.1 – As diversas zonas do aparelho respiratório. Adaptado de (12).....	5
Figura 4.2 – A árvore respiratória: ramificação das vias aéreas. Adaptado de (19).....	7
Figura 4.3 – (a) Zona respiratória e fluxo sanguíneo a ela associado; (b) Estrutura de um alvéolo; (c) Composição da membrana respiratória. Adaptado de (15).....	11
Figura 5.1 – As principais causas de morte a nível mundial em 2000 e 2019. Adaptado de (41).....	15
Figura 5.2 – Tipos de trajetórias da função pulmonar desde o nascimento até à morte. Adaptado de (60).....	19
Figura 5.3 – Mecanismos celulares na DPOC. T_{H1} , linfócito T auxiliar; T_{C1} , linfócito T citotóxico. Adaptado de (78).....	24
Figura 7.1 – Mecanismos de deposição das partículas de um aerossol. Adaptado de (23).....	35
Figura 8.1 – Representação esquemática de uma nanocápsula e de uma nanoesfera. Adaptado de (122).....	42
Figura 8.2 – Libertação de teofilina (A) e de budesonida (B) em meio pulmonar simulado/metanol, a partir das nanopartículas formuladas com fármacos em associação e de forma individual, em comparação com o perfil de dissolução dos fármacos (concentração equivalente). Adaptado de (123).....	43
Figura 8.3 – Comparação dos perfis de deposição da teofilina (A) e da budesonida (B) das nanopartículas formuladas com os fármacos em associação e de forma individual nos diferentes estadios do impactador utilizado, quando administradas sob a forma de suspensão nebulizada. Adaptado de (123).....	44
Figura 8.4 – Imagens de fluorescência (A–C) e confocais (D–F) das nanopartículas marcadas com vermelho Nile presentes nas células A549 após 1 hora de incubação. (A e D) núcleos marcados com o corante DAPI; (B e E) nanopartículas marcadas com o vermelho Nile; (C e F) combinação das imagens A+B e D+E respetivamente. Adaptado de (124).....	46
Figura 8.5 – Representação esquemática da estrutura e dos diferentes tipos de lipossomas. Adaptado de (128).....	48
Figura 8.6 – Representação esquemática dos três tipos de lipossomas testados para avaliação das propriedades de penetração no muco. Adaptado de (129).....	49

Figura 8.7 – Liberação de BDP <i>in vitro</i> numa mistura de SLF e etanol pelos três tipos de lipossomas. Adaptado de (129).....	50
Figura 8.8 – Percentagem de lipossomas permeados no muco. Adaptado de (129).	51
Figura 8.9 – Distribuição relativa das AuNP (sozinhas, em aglomerados pequenos ou em aglomerados grandes) no tecido pulmonar. Adaptado de (132).....	54
Figura 8.10 – Imagens de microscopia eletrónica de transmissão representativas das AuNP nos macrófagos BAL. (A e B) ratinhos Scnn1b-Tg; (C e D) ratinhos Wt; (A e C) Grandes aglomerados de AuNP (> 100 nm) predominantemente localizados em vesículas de tamanho médio (150–1000 nm) e em vesículas grandes (> 1000 nm); (B e D) AuNP sozinhas ou em pequenos aglomerados (< 100 nm) contidas em pequenas vesículas (< 150 nm); de notar a proximidade das AuNP às membranas dos organelos. Adaptado de (132).....	55
Figura 8.11 – Dissolução do propionato de fluticasona e perfis de liberação deste fármaco em tampão PBS com SDS a partir das chit-SLM e das alg-SLM (FP-chit-SLM e FP-alg-SLM, respetivamente) ao longo de 48 h. Adaptado de (148).....	61
Figura 8.12 – Representação esquemática de micropartículas de fosfolípidos a interagirem com os cristais micronizados de fármacos, enquanto suspensas numa gotícula de propulsor. Adaptado de (150).	63
Figura 8.13 – Percentagens das doses administradas consoante as diferentes técnicas de agitação aplicadas ao MDI GFF com a tecnologia de co-suspensão e aos MDIs que continham apenas os cristais de fármaco. Adaptado de (151).....	64
Figura 8.14 – Percentagens das doses administradas de glicopirrolato e fumarato de formoterol de acordo com os diferentes tempos de atraso e os MDIs utilizados. Adaptado de (151).....	65

Índice de tabelas

Tabela 5.1 – Prevalência da DPOC segundo a faixa etária e o sexo. Adaptado de (39).	20
Tabela 5.2 – Classificação da severidade da obstrução respiratória na DPOC. Adaptado de (25).	28

Lista de abreviaturas

AAT	Alfa-1 antitripsina
Alg-SLM	Micropartícula lipídica sólida de alginato, do inglês <i>alginate solid lipid microparticle</i>
ATP	Adenosina trifosfato, do inglês <i>adenosine triphosphate</i>
AuNP	Nanopartículas de ouro
BAL	Lavagem broncoalveolar, do inglês <i>bronchoalveolar lavage</i>
BDP	Dipropionato de beclometasona, do inglês <i>beclomethasone dipropionate</i>
Chit-SLM	Micropartícula lipídica sólida de quitosano, do inglês <i>chitosan solid lipid microparticle</i>
CVF	Capacidade vital forçada
DOTAP	Dióleoiltrimetilamónia propano
DPI	Inalador de pó seco, do inglês <i>dry powder inhaler</i>
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crónica
FAIM2	Do inglês <i>FAS apoptotic inhibitory molecule 2</i>
FF	Fumarato de formoterol
FP	Propionato de fluticasona, do inglês <i>fluticasone propionate</i>
GBD	Carga global da doença, do inglês <i>Global Burden of Disease</i>
GOLD	Iniciativa global para a doença pulmonar obstrutiva crónica, do inglês <i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
GP	Glicopirrolato
GRS	Grau de risco genético, do inglês <i>genetic risk score</i>
GWAS	Estudo de associação genómica, do inglês <i>genome-wide association study</i>
HFA	Hidrofluoroalcano
ICS	Corticosteróides inaláveis, do inglês <i>inhaled corticosteroids</i>
IRAK1	Cinase 1 associada ao recetor da interleucina 1, do inglês <i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
KLF5	Do inglês <i>Kruppel-like 5</i>

LABA	Agonista- β 2 de longa duração de ação, do inglês <i>long-acting β2-agonist</i>
LAMA	Antagonista muscarínico de longa duração de ação, do inglês <i>long-acting muscarinic antagonist</i>
LPS	Lipopolissacárido
MDI	Inalador pressurizado com válvula doseadora, do inglês <i>metered-dose inhaler</i>
MDI GFF	Inalador pressurizado com válvula doseadora de glicopirrolato com fumarato de formoterol, do inglês <i>glycopyrrolate/formoterol fumarate metered-dose inhaler</i>
miRNA	Micro-RNA
mRNA	RNA mensageiro, do inglês <i>messenger RNA</i>
NF-κB	Fator nuclear-kappaB, do inglês <i>nuclear factor-kappaB</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PDE4	Fosfodiesterase 4, do inglês <i>phosphodiesterase 4</i>
PEG2000PE	Do inglês <i>polyethylene glycol-2000-functionalized phosphatidylethanolamine</i>
PF127	Pluronic® F127
PLA	Ácido poliláctico, do inglês <i>poly(lactid acid)</i>
PM_{2,5}	Matéria particulada de 2,5 μ m, do inglês <i>particulate matter of 2,5 μm</i>
PTCH1	Do inglês <i>receptor for the pathway patched homolog 1</i>
Rip2	Do inglês <i>receptor-interacting protein 2</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SABA	Agonista- β 2 de curta duração de ação, do inglês <i>short-acting β2-agonist</i>
SAMA	Antagonista muscarínico de curta duração de ação, do inglês <i>short-acting muscarinic antagonist</i>
siRNA	Pequeno RNA de interferência, do inglês <i>small interfering RNA</i>
SLF	Fluido pulmonar simulado, do inglês <i>simulated lung fluid</i>
SLM	Micropartícula lipídica sólida, do inglês <i>solid lipid microparticle</i>

SMI	Inalador de névoa suave, do inglês <i>soft mist inhaler</i>
SNP	Polimorfismo de um único nucleótido, do inglês <i>single-nucleotide polymorphism</i>
SUV	Pequena vesícula unilamelar, do inglês <i>small unilamellar vesicle</i>
Tg	Transgénico
VEF₁	Volume expiratório forçado no 1º segundo
Wt	Do inglês <i>wild-type</i>

1. Introdução

A doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) é uma das doenças pulmonares mais comuns, sendo caracterizada por uma limitação progressiva e irreversível do fluxo de ar e sintomas respiratórios constantes (1,2). Esta patologia tipicamente resulta de uma exposição crónica a fumo de tabaco, mas o desenvolvimento pulmonar durante a infância, o sexo, bem como alguns fatores genéticos, entre outros, são cada vez mais reconhecidos como fatores de risco que contribuem para o seu desenvolvimento (3,4).

Devido à sua prevalência elevada, incidência crescente e custos pessoais, sociais e económicos associados, a DPOC é considerada um sério problema de saúde pública (5). Em 2019, esta doença foi identificada como a terceira causa de morte a nível mundial, sendo responsável por 3,23 milhões de mortes (6). A DPOC é uma doença de difícil gestão, dado que a terapêutica atualmente disponível não é curativa, e a sua heterogeneidade e complexidade tornam difícil a compreensão dos seus mecanismos. Estes aspetos são de especial importância, visto que existe uma necessidade crescente de encontrar novas estratégias terapêuticas, o que pode incluir alternativas de formulação, que permitam reduzir a progressão e a mortalidade desta doença (7–9).

Ao longo de vários anos, a comunidade científica tem investigado os potenciais benefícios da nanotecnologia, já que esta área tem vindo a proporcionar diversos avanços nos sistemas de veiculação de fármacos. Estes progressos permitem melhorar a eficácia dos tratamentos e ajudam a reduzir a toxicidade. Vários nanossistemas têm sido desenvolvidos e avaliados para o tratamento de doenças respiratórias crónicas, mas devido às diversas barreiras fisiológicas que é necessário ultrapassar para alcançar uma veiculação pulmonar bem sucedida, a aplicação destes agentes terapêuticos por via pulmonar é particularmente desafiante (10).

Entre as várias abordagens propostas, têm também sobressaído vários tipos de ácidos ribonucleicos (RNAs) não codificantes, os quais se têm mostrado viáveis como potenciais meios terapêuticos para o tratamento de várias doenças humanas, incluindo a DPOC. Nas últimas duas décadas têm-se registado consideráveis esforços na aplicação de estratégias baseadas na utilização de RNAs, tendo como alvo RNAs mensageiros (mRNAs) que codificam proteínas identificadas como potencialmente importantes na

patogénese desta doença. Porém, a estabilidade e o sistema de veiculação das moléculas de RNA continuam a ser os principais obstáculos ao sucesso clínico (9).

2. Objetivos

A presente dissertação tem como principal objetivo abordar as várias estratégias de formulação que estão atualmente em investigação e que têm como intuito otimizar os resultados terapêuticos na DPOC. Para cumprir este objetivo, esta monografia inicia-se com uma parte introdutória que visa elucidar as propriedades fundamentais do sistema respiratório, seguindo-se uma abordagem de aspetos gerais da doença, que incluem a epidemiologia, a fisiopatologia, e a terapêutica convencional, entre outros. Finalmente, serão abordadas as novas estratégias terapêuticas, sendo discutidas as vantagens e desvantagens de cada estratégia, bem como os desafios e oportunidades a elas associados.

3. Metodologia

Para a elaboração desta dissertação, foi realizada uma revisão bibliográfica da literatura disponível acerca da DPOC e das várias estratégias de formulação existentes para o tratamento desta doença, tendo sido tida em atenção a atualidade da informação recolhida (com um intervalo de 5 anos aplicado na pesquisa de artigos, salvo algumas exceções), bem como a autenticidade dos elementos descritos.

Foram utilizados diversos materiais para a composição desta monografia, de entre os quais artigos científicos, artigos de revisão e livros. A pesquisa bibliográfica foi efetuada em diferentes bases de dados, como o *B-On*, *PubMed*, *Web of Science*, *Elsevier*, entre outras. Para reunir a informação pretendida e selecionar a literatura mais pertinente para o tema em questão, foram utilizados vários termos em associação nas referidas bases de dados, como “*chronic obstructive pulmonary disease*”, “*pulmonary administration*”, “*formulation strategies*”, “*drug delivery systems*”, “*nanotechnology*”, “RNA” e “*challenges and opportunities*”, para mencionar alguns.

Todos os materiais utilizados para a escrita desta dissertação estão devidamente citados ao longo do texto e referenciados no capítulo “Referências bibliográficas”. Nos casos em que não está associada uma referência, são palavras da autora.

4. O sistema respiratório

Desde o nascimento até à morte de todos os seres humanos, o ritmo e a profundidade da respiração adaptam-se de forma inconsciente às atividades exercidas por cada indivíduo, seja a dormir, falar ou praticar exercício físico (11,12). O ser humano é incapaz de ficar sem oxigénio mesmo que por um curto período de tempo, ao contrário do que acontece com a água e os alimentos, e apesar de ser possível conter a respiração de forma voluntária, em apenas alguns segundos a necessidade de renovar o ar surge de forma premente (11,13). A respiração é tão característica da vida que, em conjunto com a pulsação, é um dos sinais mais utilizados na verificação de vida do indivíduo (11,12).

Respirar é essencial pelo facto de todas as células do organismo necessitarem de um fornecimento contínuo e abundante de oxigénio (O_2) para exercerem as suas funções, produzindo ao mesmo tempo dióxido de carbono (CO_2) como um produto final a ser excretado (13). O oxigénio é importante por ser utilizado nas reações metabólicas realizadas pelas células, que dão origem a um composto energético que, direta ou indiretamente, é essencial à maioria dos processos metabólicos: a adenosina trifosfato (ATP) (14,15). Deste conjunto de reações há a libertação de CO_2 , que em excesso se torna tóxico para as células devido à acidez que produz, pelo que a eliminação do mesmo de forma rápida e eficiente é indispensável para a manutenção de um pH adequado no interior e exterior da célula (14).

O sistema respiratório tem um papel de suma importância a este nível, uma vez que se apresenta como mediador das trocas gasosas, sendo responsável tanto pela entrada de oxigénio, como pela eliminação do dióxido de carbono do organismo. O ar atmosférico entra no organismo em condições diversificadas, que variam significativamente de acordo com as características do ambiente externo, como a humidade, a temperatura, a presença de poluentes, etc. (16). Antes de alcançar o pulmão e à medida que se movimenta ao longo das vias aéreas, o ar é aquecido ou arrefecido para ficar à temperatura corporal, saturado com vapor de água e purificado, para que contenha o menor número possível de substâncias irritantes (como pó e bactérias) em comparação com a sua origem (13,16).

Os sistemas circulatório e respiratório agem conjuntamente para fazer chegar O_2 aos tecidos e, ao mesmo tempo, transportar o CO_2 para o pulmão para que este possa ser eliminado (15). Assim, os órgãos respiratórios responsabilizam-se pelas trocas gasosas

que ocorrem entre o sangue e o ambiente externo, enquanto o sistema cardiovascular assegura o transporte desses gases através da corrente sanguínea, levando-os do pulmão até todos os tecidos no organismo e vice-versa (13,14). O comprometimento do normal funcionamento de qualquer dos sistemas compromete a capacidade de assegurar as referidas funções, o que culmina com morte celular por quebra da homeostasia (12–14).

O aparelho respiratório é constituído pelo nariz, as fossas nasais, a faringe, a laringe, a traqueia e o pulmão (figura 4.1). Frequentemente, o ar entra pela cavidade oral ao invés do nariz, mas apesar disto, a boca é considerada parte do sistema digestivo e não do respiratório (11,12).

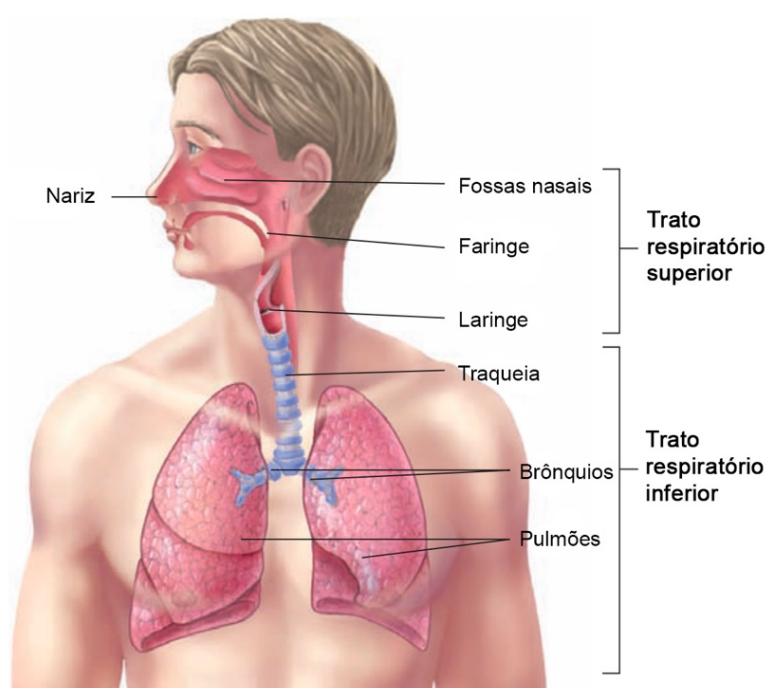


Figura 4.1 – As diversas zonas do aparelho respiratório. Adaptado de (12).

As partes do aparelho respiratório podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura ou função. Estruturalmente, o aparelho respiratório divide-se em trato respiratório superior, constituído pelo nariz, fossas nasais, faringe e laringe; e trato respiratório inferior, composto pelas restantes estruturas, como representado na figura 4.1 (12,15). No entanto, estes termos não são oficialmente anatómicos, pelo que existem várias definições distintas, como por exemplo as que consideram a laringe parte do trato respiratório inferior ao invés do superior (12). Quando classificado de acordo com a função, o sistema respiratório é dividido em 2 regiões: a zona condutora, do nariz até aos bronquíolos, que serve exclusivamente para o fluxo de ar (pelo facto destas vias apresentarem paredes muito espessas, o que impede que haja uma difusão adequada do

oxigênio); e a zona respiratória, que é composta pelas regiões envolvidas nas trocas gasosas dentro do pulmão, que incluem os bronquíolos respiratórios, os sacos alveolares e os alvéolos (12,14,15).

Apesar da importância do aparelho respiratório como um todo, o pulmão é o órgão efetivamente responsável pelas trocas gasosas, sendo por isso considerado o órgão primário do sistema respiratório (17). Por este motivo, a sua anatomia e fisiologia serão abordadas de forma um pouco mais aprofundada no subcapítulo seguinte.

4.1. Anatomia e fisiologia do pulmão

O pulmão é um órgão dividido em duas partes, que se encontram no interior da cavidade torácica, separadas uma da outra pelo coração e outras estruturas do mediastino (compartimento que divide a caixa torácica em duas cavidades anatomicamente distintas) (14,18). Têm uma forma cônica, com a base côncava apoiada sobre o diafragma e o seu ápice projetado aproximadamente 2,5 cm acima da clavícula (11,15). Apesar de ambas as partes serem anatomicamente semelhantes, em termos de proporção são assimétricas (19). A parte direita tem uma altura inferior à esquerda devido ao fígado, cuja forma apresenta uma maior elevação nesse mesmo lado. Porém, apesar de ser mais alta, a parte esquerda é mais estreita do que a direita por possuir uma depressão, denominada incisura cardíaca, onde o coração “encaixa”. Esta particularidade na sua forma é essencial pelo facto do coração inclinar mais para a esquerda e, por isso, ocupar mais espaço nesse lado do mediastino (12,15).

Ambas as partes estão divididas em lobos por fissuras proeminentes nas suas superfícies (visíveis na figura 4.1), sendo que a direita possui três lobos: o superior, o médio e o inferior, separados pelas fissuras horizontal e oblíqua respetivamente; e a esquerda possui dois: o superior e o inferior, demarcados por uma única fissura oblíqua (11,15,18). Cada lobo é ainda subdividido em segmentos broncopulmonares, havendo 10 na parte esquerda e 9 na parte direita. Os segmentos estão separados por tecido conjuntivo que, ao contrário do que acontece com as fissuras que dividem os lobos, não são visíveis na superfície do pulmão. Por sua vez, cada um destes segmentos subdivide-se ainda mais, dando origem aos lóbulos, que são pequenos compartimentos envoltos parcialmente em tecido conjuntivo no interior de cada segmento (12,14).

Em suma, o pulmão é constituído por brônquios e vias aéreas de menor calibre a eles associadas, alvéolos, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e fibras nervosas (16).

4.1.1. Árvore respiratória

Aproximadamente ao nível da quinta vértebra torácica, a traqueia divide-se em dois brônquios principais (primários), que entram nas suas respectivas partes do pulmão e subdividem-se em vias aéreas cada vez mais pequenas (13,16). É devido a esta ramificação progressiva das vias respiratórias, que forma uma rede complexa no interior do pulmão, que se dá o nome de árvore respiratória (ou árvore traqueobrônquica) a esta parte do aparelho respiratório. A árvore respiratória pertence à zona condutora do sistema, da qual fazem parte os bronquíolos terminais, que são as vias condutoras de menor calibre e que representam o término desta zona (13).

Dentro das partes do pulmão, os brônquios principais dividem-se em brônquios secundários, que se vão subdividindo sucessivamente em brônquios cada vez mais pequenos, até darem origem aos bronquíolos, que têm um diâmetro igual ou inferior a 1 mm e alimentam os lóbulos pulmonares. Os bronquíolos continuam a divisão, sendo que cada um pode dividir-se em 50 a 80 bronquíolos terminais. Resultante de todo este processo de ramificação, cada pulmão possui cerca de 65000 bronquíolos terminais (11,12,15). Na figura 4.2 é possível observar de forma simplificada a ramificação destas estruturas respiratórias.

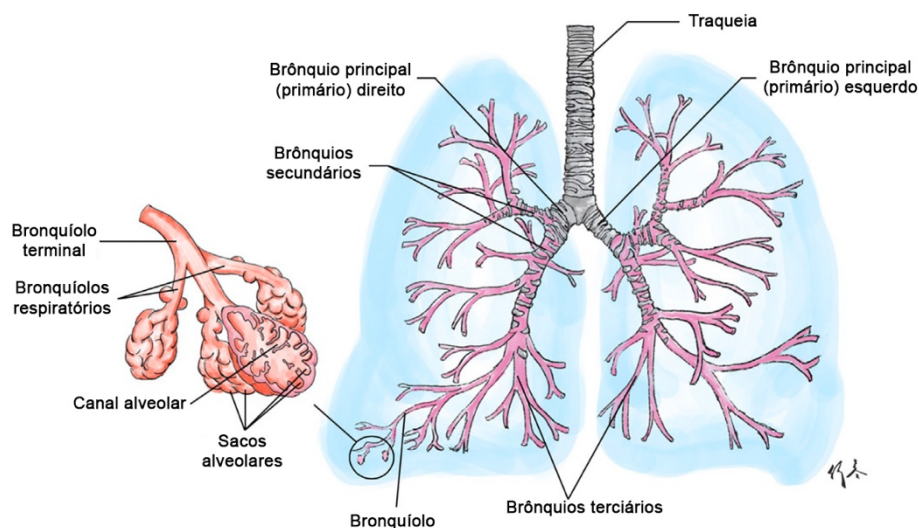


Figura 4.2 – A árvore respiratória: ramificação das vias aéreas. Adaptado de (19).

As vias respiratórias vão diminuindo de tamanho/diâmetro mas aumentando em número à medida que se progride ao longo do trato respiratório (12).

Conforme vão ficando mais pequenas, a estrutura das suas paredes vai também mudando. Tal como acontece na traqueia, os brônquios primários são suportados por anéis de cartilagem hialina em forma de C, ligados por músculo liso. Quando se alcança os brônquios lobares e segmentares, placas de cartilagem começam a substituir os anéis. À medida que os brônquios vão diminuindo de diâmetro, a cartilagem vai ficando cada vez mais escassa, enquanto o músculo liso se torna mais abundante, sendo que os bronquíolos terminais têm somente uma camada de músculo liso proeminente, sem qualquer cartilagem (11,15). Ao contrair ou relaxar, o músculo liso presente nas paredes dos brônquios e bronquíolos vai alterar o diâmetro destas passagens, sendo por isso responsável por regular a velocidade e o volume do fluxo de ar dentro do pulmão (16). A broncodilatação ocorre quando o músculo liso relaxa e há um aumento do diâmetro das vias respiratórias, o que reduz a resistência ao movimento do ar. Por outro lado, a broncoconstrição representa a contração destes mesmos músculos, o que leva à redução do diâmetro dos brônquios e bronquíolos e, conseqüentemente, a um aumento da resistência à passagem do ar (12).

A constituição do epitélio pulmonar também muda com a ramificação das vias respiratórias, verificando-se uma substituição gradual de epitélio ciliado por não-ciliado (16). Os brônquios estão revestidos com um epitélio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, que muda para um epitélio cilíndrico simples ciliado nos bronquíolos de maiores dimensões. Já os bronquíolos terminais têm um epitélio cúbico simples ciliado, mas não possuem glândulas mucosas nem células caliciformes, que são as células secretoras primárias do epitélio pulmonar, responsáveis pela secreção do muco (12,15,20).

As células ciliadas são o tipo de células predominantes nas vias aéreas e funcionam como uma espécie de “escada rolante” em conjunto com o muco, captando elementos exógenos e encaminhando-os para a laringe através do movimento coordenado dos seus cílios, de forma a que estes possam ser eliminados e, assim, prevenindo a acumulação destes resíduos nos bronquíolos terminais e alvéolos (11,15,21). A isto se chama o mecanismo de elevador mucociliar ou simplesmente eliminação mucociliar. Para além disto, este tipo de células também funcionam como sensores químicos e mecânicos das vias respiratórias (21).

4.1.2. Bronquíolos respiratórios e alvéolos

Considera-se que a zona respiratória tem início quando as trocas gasosas entre o ar inspirado e o sangue são possíveis. Isto ocorre nos locais onde começa a haver formação de alvéolos, mais precisamente nos bronquíolos respiratórios (12). Estes bronquíolos, que são ramos microscópicos da árvore respiratória, resultam da subdivisão dos bronquíolos terminais (14). As suas paredes são constituídas por tecido conjuntivo elástico e colagénio, com pouco músculo liso, verificando-se um aumento do número de alvéolos anexados às mesmas à medida que os bronquíolos respiratórios se vão subdividindo e penetrando mais no interior do pulmão, bem como uma alteração do seu revestimento epitelial de cúbico simples para pavimentoso simples (12,14,15).

Por sua vez, os bronquíolos respiratórios dividem-se ainda em canais alveolares, que são passagens alongadas com paredes finas (com um epitélio pavimentoso simples não ciliado) que também possuem alvéolos ligados às suas paredes (14,15). A certo ponto, os alvéolos vão ficando tão numerosos que estes canais acabam por se tornar pouco mais do que uma sucessão destas pequenas estruturas (11). No final dos canais alveolares existem dois ou três aglomerados de alvéolos que se assemelham a cachos de uvas, denominados sacos alveolares (11,14). Cada “uva” representa um alvéolo, como se pode verificar na figura 4.3a (14).

Os alvéolos são pequenas bolsas de ar com um diâmetro de 200 a 500 μm , que se apresentam como as unidades mais pequenas envolvidas nas trocas gasosas (15,22). Estima-se que ambas as partes do pulmão compreendam entre 300 a 500 milhões de alvéolos, o que proporciona uma vasta área (de aproximadamente 100 m^2) onde podem ocorrer as trocas gasosas (14,23).

As paredes dos alvéolos são compostas por dois tipos de células epiteliais: as células alveolares (pneumócitos) tipo I e as tipo II, representadas na figura 4.3b (11,24).

Os pneumócitos tipo I são células epiteliais pavimentosas simples e constituem mais de 90% da superfície alveolar. Como são células extremamente finas, minimizam a distância de difusão entre o ar no espaço alveolar e o sangue nos capilares pulmonares, o que as torna as principais intervenientes neste processo, pela forma rápida com que permitem que se deem as trocas gasosas (12,15,24).

A percentagem remanescente da superfície alveolar é formada por células secretoras com uma forma arredondada a cúbica, denominadas pneumócitos tipo II (12,24). Estas são a principal fonte de produção de surfactante pulmonar, uma mistura de fosfolípidos e proteínas que reveste os alvéolos e os bronquíolos e diminui a tensão superficial associada à ventilação pulmonar, o que previne o colapso alveolar durante a expiração (15,16,21). Adicionalmente, as células alveolares tipo II apresentam ainda outras funções, de entre as quais reparar o epitélio alveolar quando as células tipo I são danificadas e manter os alvéolos em homeostasia (15,21).

Ao nível da zona respiratória, o epitélio ciliado, as células caliciformes e o muco por elas produzido já não existem, uma vez que a sua presença iria impossibilitar as trocas gasosas e potenciar infeção (16). O ar que alcança os alvéolos está geralmente limpo, mas na eventualidade de conter algumas partículas, estas vão ser capturadas e fagocitadas pelos numerosos macrófagos alveolares existentes no lúmen dos alvéolos e no tecido conjuntivo entre eles (15,16). Apesar de existirem em grande quantidade, os macrófagos não se acumulam na zona respiratória, dado que a determinada altura entram nos vasos linfáticos que se encontram nas suas proximidades ou movem-se para os bronquíolos terminais, onde ficam retidos no muco que é posteriormente arrastado para a faringe (12).

O tecido que envolve os alvéolos contém fibras elásticas que, tal como o próprio nome indica, conferem elasticidade aos mesmos, permitindo que consigam expandir e retrair durante a inspiração e expiração respetivamente (11). Cada alvéolo é também envolto numa rede de capilares pulmonares, visíveis na figura 4.3a, provenientes da arteríola e vénula respetivas ao lóbulo em questão (14,15).

À barreira que separa o ar no interior dos alvéolos, do sangue dentro dos capilares pulmonares dá-se o nome de membrana respiratória (15). É através desta que se dão as trocas gasosas por difusão simples, passando o oxigénio do espaço alveolar para o sangue e o dióxido de carbono dos capilares para os alvéolos (13). Tal como ilustrado na figura 4.3c, a membrana respiratória é constituída por 3 camadas: o epitélio alveolar, o endotélio capilar (ambos constituídos por uma única camada de células) e a membrana basal partilhada por ambos (12,13,15).

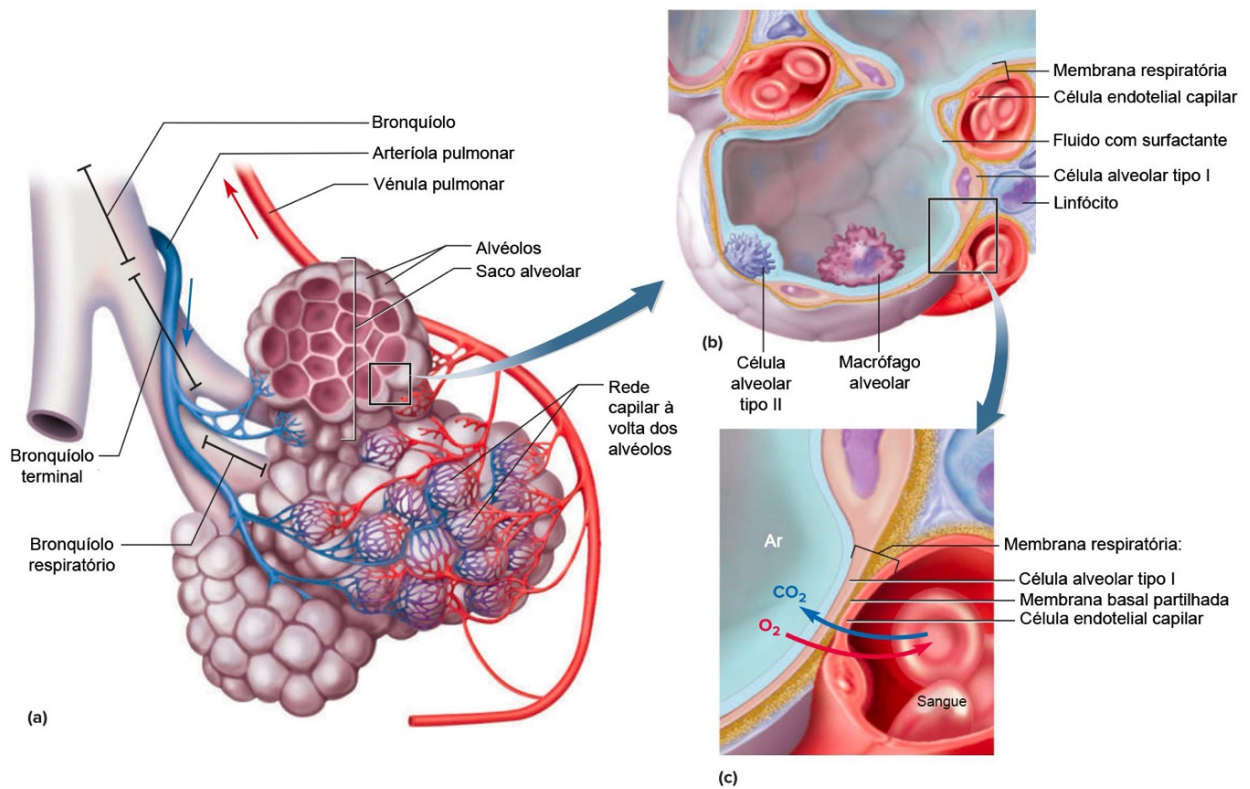


Figura 4.3 – (a) Zona respiratória e fluxo sanguíneo a ela associado; (b) Estrutura de um alvéolo; (c) Composição da membrana respiratória. Adaptado de (15).

De modo a facilitar todo o processo e permitir uma difusão rápida dos gases, a membrana respiratória é extremamente fina, com uma espessura de aproximadamente 0,5 μm , o que representa cerca de 1/16 do diâmetro de um glóbulo vermelho (14).

5. Doença pulmonar obstrutiva crónica

O relatório da iniciativa global para a doença pulmonar obstrutiva crónica (GOLD) define a DPOC como sendo “uma doença comum, prevenível e tratável que é caracterizada por sintomas respiratórios persistentes e limitação do fluxo de ar devida a anormalidades das vias aéreas/alveolares geralmente causadas por exposição significativa a partículas ou gases nocivos e influenciada por fatores do hospedeiro incluindo um desenvolvimento pulmonar anormal” (25).

A DPOC apresenta uma ampla heterogeneidade, tanto na sua apresentação clínica como nos seus mecanismos patogénicos e componentes pulmonares, que incluem o enfisema, a perda/obstrução das pequenas vias aéreas, entre outros (5,26). Pode-se considerar que a DPOC é uma doença poligénica com uma componente epigenética considerável, desencadeada pela interação de uma série de fatores de risco ambientais com o genoma de um indivíduo ao longo da sua vida. Estas interações vão ditar não só o desenvolvimento dos órgãos, mas também a sua manutenção, reparação e envelhecimento, o que origina uma série de potenciais trajetórias da função pulmonar (5).

Esta doença é irreversível e progride ao longo de décadas, permanecendo subclínica até à posterior manifestação de sintomas e exacerbações, o que leva a um diagnóstico tardio (26,27). Mesmo havendo a possibilidade de tratamento para prevenir e/ou aliviar sintomas, a DPOC continua a ser uma doença progressiva que leva a um declínio acentuado da função pulmonar ao longo do tempo e com o avançar da idade, principalmente após episódios de exacerbações recorrentes. Isto pode levar a estados de enfisema severos e até mesmo fatais, onde é necessário um transplante pulmonar para evitar a morte do doente. A implementação de um tratamento o mais cedo possível, antes do agravamento da doença, é, então, de extrema importância para evitar a progressão da mesma para estados fatais (27).

Em doentes com DPOC, é muito comum existirem várias comorbilidades adicionais, o que torna a gestão da doença ainda mais complexa, tanto para os profissionais de saúde como para o doente (28). De certa forma, esta doença acaba por afetar, ou até mesmo originar, algumas destas comorbilidades e vice-versa. Um exemplo disto é o facto dos doentes com DPOC terem um maior risco de sofrerem eventos

tromboembólicos comparativamente à população geral, pelo facto da inflamação (que existe na DPOC) estar associada a uma coagulação anormal (29).

É expectável que o problema da DPOC venha a piorar ao longo dos anos devido ao envelhecimento da população e ao aumento do consumo de produtos tabágicos (30). A DPOC tem um impacto notável na qualidade de vida dos doentes, não só pelos efeitos significativos que tem a nível físico, mas também pelas repercussões a nível psicológico, levando a taxas de ansiedade e depressão mais elevadas nestes indivíduos do que em pessoas sem esta patologia. Adicionalmente, se não estiver devidamente controlada, a DPOC pode levar a hospitalizações recorrentes e a um aumento da mortalidade, o que resulta numa elevada sobrecarga económica para o estado, bem como numa baixa qualidade de vida do doente (31,32).

5.1. Epidemiologia

A DPOC tem sido um grande problema de saúde pública que continuará a provar-se desafiante para os clínicos no século XXI (33). Apesar de ser uma das doenças crónicas e incapacitantes mais comuns, apresentando morbidade e mortalidade crescentes, a DPOC recebe muito pouca atenção e financiamento comparativamente a outras grandes causas de morbidade e mortalidade a nível mundial (34,35).

A despeito dos pontos acima referidos, a DPOC é uma doença que pode ser prevenida, pelo que é importante comparar a prevalência e a mortalidade da mesma entre diferentes países e ao longo do tempo (36). No entanto, estudar a prevalência global da DPOC tem sido difícil devido à falta de dados representativos da população mundial, a erros de classificação da mesma e a uma ausência de consenso na definição dos casos (36,37). Na realidade, um dos aspetos mais importantes na interpretação correta de estudos da prevalência da DPOC é exatamente este, a definição de um caso (33). O facto de existirem duas definições diferentes tem-se apresentado como um problema na interpretação de estudos epidemiológicos, porque a escolha do parâmetro utilizado para detetar uma obstrução do fluxo aéreo pode alterar os resultados. Aqui, a decisão entre utilizar uma razão fixa entre o volume expiratório forçado no 1º segundo (VEF_1)/capacidade vital forçada (CVF) inferior a 0,7 (definição do relatório GOLD), ou o limite inferior da normalidade (definição defendida pela Sociedade Torácica Americana

e Sociedade Respiratória Europeia) para definir obstrução, bem como utilizar a espirometria com ou sem prova de broncodilatação, são fundamentais para a interpretação de qualquer resultado (33,36).

Numa revisão sistemática e meta-análise, cujo objetivo era estimar a prevalência da DPOC e o número de casos desta doença nos anos de 1990 e 2010 a nível global e regional, foi estimada uma prevalência global de 10,7% em 1990, o que equivalia a 227 milhões de casos, e de 11,7% em 2010, que por sua vez correspondia a 384 milhões de casos a nível mundial (38). Esta revisão teve o cuidado de apenas incluir estudos com diagnósticos baseados em espirometria pelo facto de estes terem demonstrado ser consistentes com o diagnóstico da DPOC, sendo este exame uma ferramenta indispensável não só na definição desta doença, como na determinação da sua prevalência em estudos realizados com este intuito (37,38).

No estudo da carga global da doença (GBD) de 2015, estimou-se que 174,5 milhões de pessoas tinham DPOC, o que representava um aumento da prevalência em 44,2% relativamente ao ano de 1990. Deste número de casos, 104,7 milhões eram homens e 69,7 milhões eram mulheres. Este número é bastante discrepante quando comparado aos valores anteriormente referidos, tanto de 1990 como de 2010. Para além disso, este estudo refere também que, comparativamente ao GBD de 2013 (que estimou um número de 328,4 milhões de casos), as estimativas de 2015 apresentaram valores muito inferiores, tendo alegado que uma alteração na metodologia estaria por trás desta disparidade entre valores (37). Esta também pode ter sido uma das diferenças chave entre este estudo e a revisão sistemática e meta-análise previamente apresentada, juntamente com outras limitações que certamente surgem entre diferentes estudos, como a estrutura da população e a composição da amostra selecionada, ou mesmo a forma como a espirometria é realizada (visto que variáveis como a escolha do espirómetro a ser utilizado ou a experiência do operador em si produzem diferentes resultados) (37,38).

Outra revisão sistemática e meta-análise aponta para uma prevalência global da DPOC de 12,16%, existindo uma prevalência de 15,70% nos homens e de 9,93% nas mulheres (39). Com os resultados obtidos nestes estudos, pode-se constatar que a DPOC é uma doença que efetivamente tem uma maior prevalência no sexo masculino do que no feminino (37–40). Para além do mais, continua a ser das doenças respiratórias com maior impacto na população mundial (40).

Relativamente à mortalidade provocada por esta doença, sabe-se que em 2019 a DPOC foi responsável por 3,23 milhões de mortes (6). Nos anos de 2015 e 2017 foram estimados valores semelhantes, acima dos 3 milhões de mortes globalmente (37,40).

Em 2015, a DPOC apresentava-se como a quarta principal causa de morte a nível mundial, mas em 2019 já havia subido para a terceira posição (figura 5.1), correspondendo a 6% do número total de mortes (38,41).

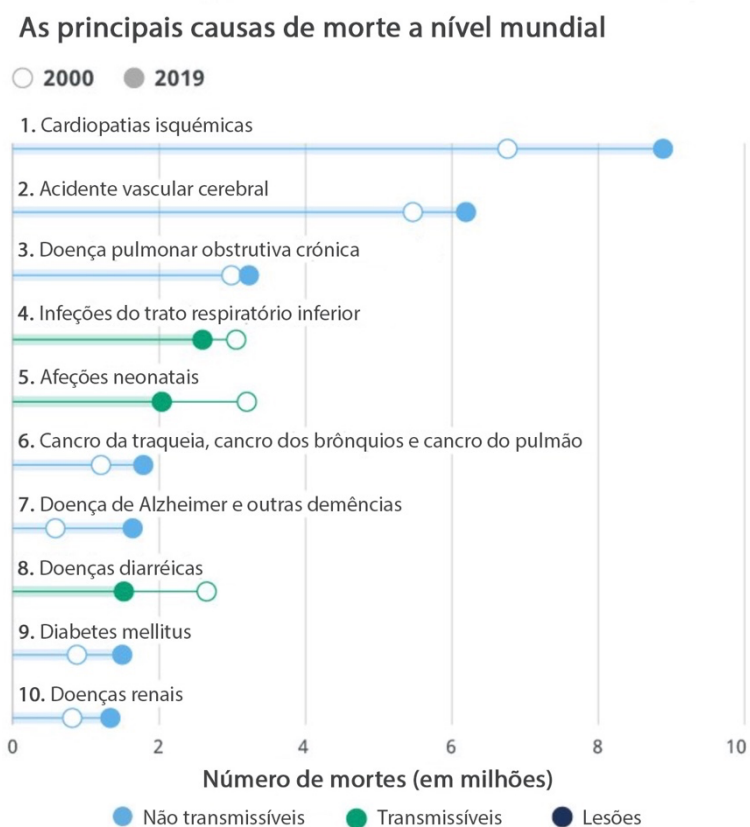


Figura 5.1 – As principais causas de morte a nível mundial em 2000 e 2019. Adaptado de (41).

Todas estas estimativas, tanto da mortalidade como da prevalência, provam que, apesar da DPOC ser uma doença que pode ser prevenida e tratada com alternativas de custo relativamente acessível, esta é uma doença que continua a ser negligenciada comparativamente a outras patologias não transmissíveis (40). Apesar da projeção da mortalidade e carga da DPOC ter previsto uma mudança de posição do 5º lugar que ocupava em 2002 para o 4º lugar em 2030 nas principais causas de morte a nível mundial, em 2019 esta doença já estava posicionada em 3º (42).

Em Portugal, um estudo realizado em 2013 na região de Lisboa apontou para uma prevalência de 14,2% em adultos com idade igual ou superior a 40 anos, o que indica que

a DPOC é uma doença bastante comum nesta região. Verificou-se uma maior prevalência nos homens do que nas mulheres, bem como um aumento deste indicador epidemiológico com a idade. Este estudo também constatou que 86,8% do grupo que apresentou um diagnóstico baseado em espirometria, não havia recebido um diagnóstico prévio por parte de um médico. Por outro lado, 61,2% dos indivíduos que receberam um diagnóstico feito pelo médico não apresentaram resultados espirométricos que estivessem em concordância com esse diagnóstico. Pôde-se observar, então, que o diagnóstico errado, ou a falta do mesmo (subdiagnóstico), são problemas que acabam por afetar em larga escala os estudos epidemiológicos e as estimativas efetuadas pelos mesmos (43).

No que diz respeito à taxa de mortalidade por DPOC em Portugal, estimou-se que seria de 27,6 mortes por cada 100 mil habitantes, um valor que é inferior à média europeia, de 36,3 mortes por cada 100 mil habitantes (44). Em 2018, a DPOC foi responsável por 2,5% do total da mortalidade a nível nacional, causando 2834 óbitos. Comparativamente a 2017, este valor correspondeu a um aumento de 7,9% na mortalidade (45).

5.2. Causas e fatores de risco

Atualmente, não existe uma terapêutica curativa para a DPOC, pelo que os tratamentos existentes visam predominantemente a melhoria dos sintomas. Por este motivo, a prevenção é considerada a estratégia de intervenção mais eficaz no controlo desta doença, sendo essencial a identificação dos fatores de risco que predispõem um indivíduo para o desenvolvimento da mesma (46).

Apesar de diversos estudos epidemiológicos comprovarem que o tabaco continua a ser o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento da DPOC, nem todos os fumadores desenvolvem esta doença ao longo da sua vida, mesmo entre os fumadores mais dependentes (4,25,46,47). Adicionalmente, uma percentagem relevante de doentes com DPOC nunca fumaram, o que aponta para a existência de um conjunto de outros fatores de risco associados a esta doença (4,33,46). Todavia, nos não-fumadores, a doença em si e os sintomas a ela associados são mais ligeiros do que nos fumadores (25).

Tanto os fatores externos como os fatores internos têm papéis primordiais no desenvolvimento da DPOC num indivíduo (47). A doença não resulta apenas de fatores ambientais, mas também de fatores genéticos e características demográficas (48). Os

fatores de risco externos interagem e são capazes de estimular fatores de risco presentes no indivíduo, incluindo genes suscetíveis associados à função pulmonar, o que aumenta a probabilidade de ocorrência desta doença (33,47,48).

5.2.1. Fatores genéticos

Cada vez existe mais evidência de que fatores genéticos condicionam a predisposição à DPOC, havendo estudos que comprovaram o seu papel considerável na suscetibilidade à doença (49,50). Estudos de associação genômica (GWAS) apuraram diversas variantes genéticas associadas ao risco de baixa função pulmonar e de DPOC, tendo sido identificados vários *loci* relacionados com a suscetibilidade e severidade desta doença (51–53). Apesar de, individualmente, cada uma destas variantes ter um efeito relativamente reduzido e apenas explicar uma pequena parte do risco associado à DPOC, se se calcular um único grau de risco genético (GRS) através da combinação de várias, é possível explicar uma maior proporção deste risco (51).

Um estudo realizado por Oelsner *et al.* testou a hipótese de que o grau de risco genético estaria associado a medidas quantitativas obtidas em tomografia computadorizada ao pulmão. Através dos resultados obtidos, observaram que um GRS associado a uma maior suscetibilidade à DPOC estava consideravelmente relacionado com uma menor densidade pulmonar, um reduzido número de vias aéreas de menor calibre, e a lúmens das vias aéreas mais pequenos, independentemente de se ser fumador ou não. Para além disto, verificaram uma correlação positiva entre aumento de GRS e menor VEF₁ e VEF₁/CVF (52). Isto corrobora os resultados de Busch *et al.* em 2017, num estudo onde determinaram que um GRS composto por 7 polimorfismos de um único nucleótido (SNPs), que conferiam um maior risco de DPOC, estava associado a uma redução da percentagem de VEF₁ prevista para cada alelo de risco adicional em 1,86% (54).

Tal como referido anteriormente, o tabaco é o principal fator de risco ambiental para esta doença, pelo que fatores de risco genéticos associados com o tabagismo e com a dependência da nicotina podem contribuir para a predisposição e gravidade da DPOC desenvolvida. Em GWAS focados no comportamento tabágico, foram identificadas associações significativas com a dependência de nicotina, como são exemplo os *loci* 15q25 e 8p11, onde se encontram genes de subunidades dos recetores nicotínicos de acetilcolina (53).

A mutação no gene SERPINA1, que resulta na deficiência da proteína alfa-1 antitripsina (AAT), é a associação genética à doença pulmonar obstrutiva crónica mais bem descrita, e está presente em aproximadamente 1-3% dos doentes com DPOC (4,49). A AAT é essencialmente sintetizada por hepatócitos e posteriormente lançada para a corrente sanguínea, com o intuito de alcançar o pulmão, onde irá exercer a sua principal função: atuar como inibidor da enzima elastase neutrofílica de modo a proteger o tecido pulmonar e, assim, controlar a resposta inflamatória no pulmão (55–57). Caso a elastase neutrofílica não seja inibida, esta pode degradar muitas das proteínas estruturais do pulmão. Diversos alelos do gene SERPINA1 já foram descritos e têm efeitos variáveis de acordo com a mutação em questão, sendo mesmo possível haver uma ausência da produção de AAT. A retenção de AAT no fígado leva a um “ganho de função” que causa problemas hepáticos, enquanto que a sua falta predispõe os indivíduos homocigotas para a variante a desenvolverem enfisema precoce, resultante da “falta de função” (56). A deficiência da AAT é hereditária e indivíduos portadores de duas cópias do alelo mutante apresentam concentrações plasmáticas desta proteína de aproximadamente 10% a 15% do normal (55,57).

5.2.2. Desenvolvimento e função pulmonar

Durante muito tempo, o conceito clássico da patogénese na DPOC era que, em pessoas suscetíveis, a exposição a matéria particulada (nomeadamente o fumo de tabaco) provocava uma resposta inflamatória anormal que danificava as vias aéreas (bronquite) e os alvéolos (enfisema) e levava a uma aceleração do declínio da função pulmonar relacionado com a idade, função esta avaliada através do VEF₁ (58–60). No entanto, os resultados de alguns estudos mostraram que, numa proporção considerável dos indivíduos com DPOC, o declínio do VEF₁ não era mais acentuado do que se verificava em adultos saudáveis (46). Assim sendo, estes resultados contestaram a ideia de que a DPOC seguia sempre uma trajetória de declínio rápido do VEF₁. Ao invés disso, incrementaram a hipótese de que o pico máximo da função pulmonar desenvolvida durante a juventude tinha um papel crucial no desenvolvimento de DPOC mais tarde, mesmo que a taxa de declínio do VEF₁ estivesse dentro dos valores considerados normais (59).

A trajetória normal da função pulmonar ao longo da vida de um indivíduo pode ser dividida em três fases. A primeira ocorre principalmente durante a puberdade, altura

em que a função pulmonar aumenta à medida que o pulmão cresce. A função pulmonar com que se nasce depende de vários fatores durante a gravidez, que podem limitar o desenvolvimento do pulmão no feto. Em pessoas saudáveis, esta fase de crescimento atinge o seu pico máximo aos 20-25 anos de idade (60).

Em segundo lugar, dá-se uma curta fase de plateau que dura alguns anos, seguida de uma fase de declínio estável devida ao envelhecimento fisiológico do pulmão. Vários fatores podem alterar estas fases, o que dá origem a uma série de trajetórias da função pulmonar diferentes ao longo da vida (figura 5.2) que podem ter impactos clínicos significativos (58,60).

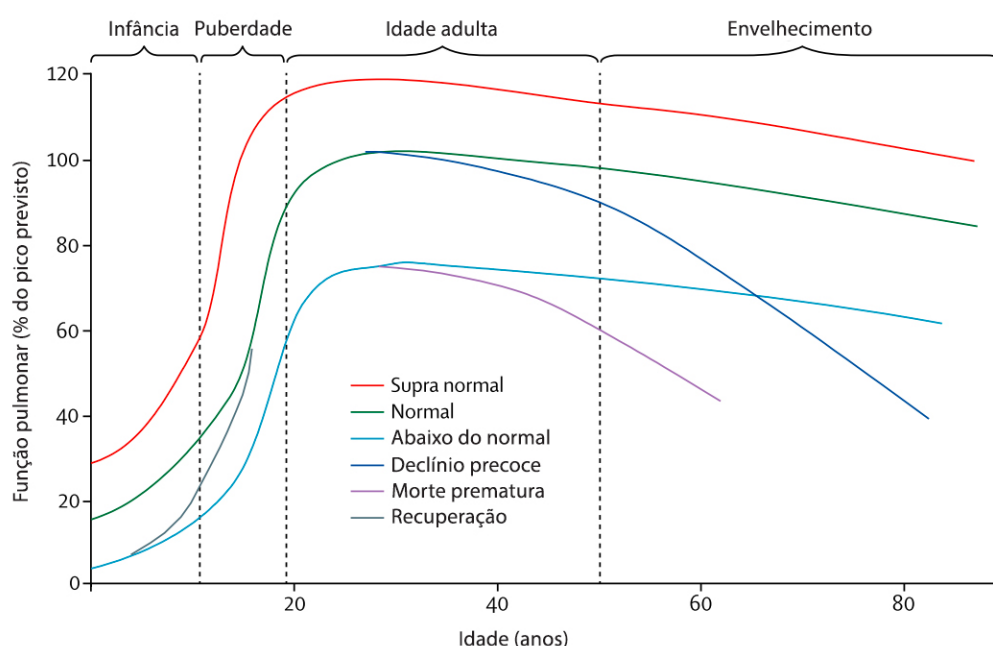


Figura 5.2 – Tipos de trajetórias da função pulmonar desde o nascimento até à morte. Adaptado de (60).

O desenvolvimento de DPOC na idade adulta pode resultar de dois mecanismos biológicos principais: um desenvolvimento anormal do pulmão e/ou uma taxa de declínio da função pulmonar aumentada. Como se pode observar na figura 5.2, em pessoas que apresentam uma função pulmonar abaixo do normal na sua infância, é possível que ocorra uma fase de recuperação durante a puberdade, o que permite que esses indivíduos consigam atingir valores de função pulmonar considerados normais (58).

Existem muitas mais trajetórias da função pulmonar do que aquelas representadas no gráfico, sendo mesmo possível que uma pessoa tenha períodos de declínio rápido do VEF₁, seguidos de períodos em que o declínio é normal ou quase normal, como explicado por Lange *et al* (59).

Em suma, um crescimento pulmonar incompleto e uma baixa função pulmonar, mesmo na infância, são um fator de risco para o desenvolvimento de DPOC, mesmo na ausência de um declínio rápido do VEF₁ durante a idade adulta e independentemente da exposição ao fumo de tabaco (61).

5.2.3. Idade e sexo

Mesmo na ausência de doença, o pulmão sofre algumas alterações funcionais com o avançar da idade, como a perda de retração elástica. Um exemplo disso é o declínio notável do VEF₁, que se verifica ser maior em homens do que em mulheres (19,62). Como este envelhecimento das vias aéreas se assemelha a algumas alterações estruturais que ocorrem na DPOC, o avançar da idade é considerado um fator de risco para esta doença, podendo-se verificar que existe uma relação proporcional entre a prevalência da DPOC e o aumento da faixa etária na tabela 5.1 (25,39).

Tabela 5.1 – Prevalência da DPOC segundo a faixa etária e o sexo. Adaptado de (39).

	Prevalência da DPOC (%)	Intervalo de confiança de 95% (%)
Faixa etária (anos)		
< 50	5,28	4,08–6,49
50–59	10,16	7,94–12,37
≥ 60	21,38	18,42–25,40
Sexo		
Masculino	15,70	13,80–17,59
Feminino	9,93	8,73–11,13

Tanto a prevalência como a mortalidade da DPOC são maiores no sexo masculino do que no feminino, como exposto na tabela 5.1, sendo estas diferenças atribuídas a divergências na exposição ambiental e nos estilos de vida, nomeadamente no que diz respeito ao fumo de tabaco, que é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento de DPOC (39,63). Porém, tem-se verificado um aumento na prevalência e incidência desta doença em mulheres com idade inferior a 60 anos, podendo-se atribuir parte deste impacto a um aumento do consumo de tabaco neste género (64).

Quando expostas a uma mesma quantidade de fumo de tabaco, observou-se que as mulheres têm um maior risco de desenvolver doença mais severa em idades mais precoces do que os homens (63,65). Adicionalmente, também se verificou que existiam mais queixas de dispneia e de maiores limitações físicas, bem como exacerbações mais frequentes, em doentes do sexo feminino (64).

Apesar destas observações, os mecanismos por trás da maior suscetibilidade das mulheres ao fumo de tabaco não são claros. Surgiram várias hipóteses para tentar explicar estas diferenças na expressão clínica da DPOC entre sexos, de entre as quais cabe mencionar: a) o facto das mulheres terem o pulmão e as vias aéreas mais pequenas do que os homens, o que faz com que haja uma maior concentração de fumo de tabaco por unidade de área de via aérea; b) a existência de uma predisposição genética para danos pulmonares provocados por fumo de tabaco associada ao cromossoma X; c) diferenças no metabolismo do fumo de tabaco mediadas por hormonas; e/ou d) distinções da função celular e dos mecanismos inflamatórios, assim como diferenças histológicas, estruturais e fisiológicas, influenciadas pelo sexo (63–65).

5.2.4. Fatores ambientais

A exposição a fatores de risco durante os primeiros anos de vida, que são cruciais para o crescimento do pulmão, pode levar ao desenvolvimento de DPOC em idades mais avançadas. Uma meta-análise revelou que infeções respiratórias graves, bronquite e asma durante a infância, bem como o consumo de tabaco por parte da mãe durante a gravidez, estão associados a um maior risco de DPOC na vida adulta (46). Complementarmente, outros fatores como a exposição a fumo (de tabaco, poluição, etc), a emissões da queima de biomassa e a infeções respiratórias na idade adulta, estão também relacionados com a ocorrência de DPOC (48).

Sendo o fumo de tabaco considerado o fator de risco ambiental mais importante para o desenvolvimento de DPOC, existe evidência de uma maior incidência da doença em fumadores e ex-fumadores do que em pessoas que nunca fumaram (36,48,66). O fumo de tabaco contém muitos componentes que podem influenciar diretamente a atividade celular pulmonar, causando inflamação, hipersecreção de muco, etc. (67,68). Tendo em conta que este órgão atua como primeira linha de defesa contra os possíveis danos

provocados por partículas inspiradas, o epitélio pulmonar acaba por ser o principal alvo das substâncias tóxicas presentes no fumo inalado (67).

Os efeitos que o fumo de tabaco tem nos fumadores dependem de vários fatores, como a idade e o sexo (já abordados anteriormente), o estatuto socioeconómico e as diferenças nos hábitos tabágicos de cada indivíduo, designadamente a forma como o cigarro é fumado, o número, volume e duração das tragadas, entre outros (68). Num estudo caso-controlo realizado por Safitri *et al.*, foi demonstrado que o desenvolvimento de hábitos tabágicos a uma idade inferior a 15 anos estava associado a um aumento significativo do risco de DPOC na idade adulta, visto que a exposição ao fumo de tabaco durante a infância e adolescência pode interferir com as etapas finais do desenvolvimento pulmonar e influenciar tanto o VEF₁ como a CVF (66,69). Complementarmente, apesar de fumadores ativos terem uma maior probabilidade de desenvolver DPOC, tal não significa que fumadores passivos estejam isentos de risco, estando bem estabelecida a relação entre a exposição a fumo passivo e a incidência desta doença (70).

Seguindo-se ao fumo de tabaco, vários estudos epidemiológicos demonstraram que os poluentes atmosféricos também são um fator de risco importante no desenvolvimento de DPOC (71,72). A poluição atmosférica é composta por uma mistura complexa de pequenas partículas, gotículas líquidas e gases emitidos por fontes naturais e/ou sintéticas (47,71). De entre os seus componentes, a matéria particulada que tem um diâmetro igual ou inferior a 2,5 µm (PM_{2.5}), é das mais estudadas e considerada como fator de risco no desenvolvimento de doenças respiratórias (72,73). Após inalada, a PM_{2.5} é capaz de alcançar e se depositar em zonas mais profundas do pulmão, o que pode causar inflamação (47,73). Para além disso, é capaz de absorver alergénios, microrganismos e outros agentes patogénicos do ar, o que as torna ainda mais prejudiciais. Apesar do efeito patogénico da poluição atmosférica na DPOC ainda não estar claro, existe bastante evidência que suporta o conceito de que a exposição a poluição, tanto a curto como a longo prazo, tem efeitos negativos na incidência desta doença (71).

A exposição ocupacional também contribui para a ocorrência e progressão da DPOC (74,75). Segundo um estudo realizado em Estocolmo, homens expostos a níveis elevados de partículas de asfalto, ferro e vapores libertados no processo de soldadura, bem como mulheres expostas a partículas orgânicas, apresentaram um maior risco para a DPOC (74). O pó derivado de determinadas atividades de produção humanas, como a

agricultura e a indústria têxtil, tem uma correlação consistente com esta patologia respiratória, independentemente da idade e do estatuto de fumador (75).

5.3. Fisiopatologia

Quando comparados com indivíduos saudáveis, os doentes com DPOC apresentam um maior número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T citotóxicos (2,76–78). Isto deve-se à resposta inflamatória anormal que ocorre nas pequenas vias aéreas destes indivíduos, desencadeada pela entrada de moléculas estranhas nas vias respiratórias, como os componentes do fumo de tabaco (76,79). Em resposta a estas partículas nocivas, as células inflamatórias libertam diversas citocinas e fatores quimiotáticos, que vão recrutar outras células do sistema imunitário para o pulmão, amplificando assim a resposta inflamatória. Para além da inflamação, a DPOC também é caracterizada por stress oxidativo, sendo o fumo de tabaco a principal fonte de radicais livres no pulmão. Este stress oxidativo desencadeia a libertação de proteases e inativação de várias antiproteases, entre outras reações (76,77).

Pode-se considerar que existem três mecanismos patológicos principais que ocorrem no pulmão de indivíduos com DPOC (figura 5.3), apesar das suas proporções relativas poderem variar de doente para doente (7).

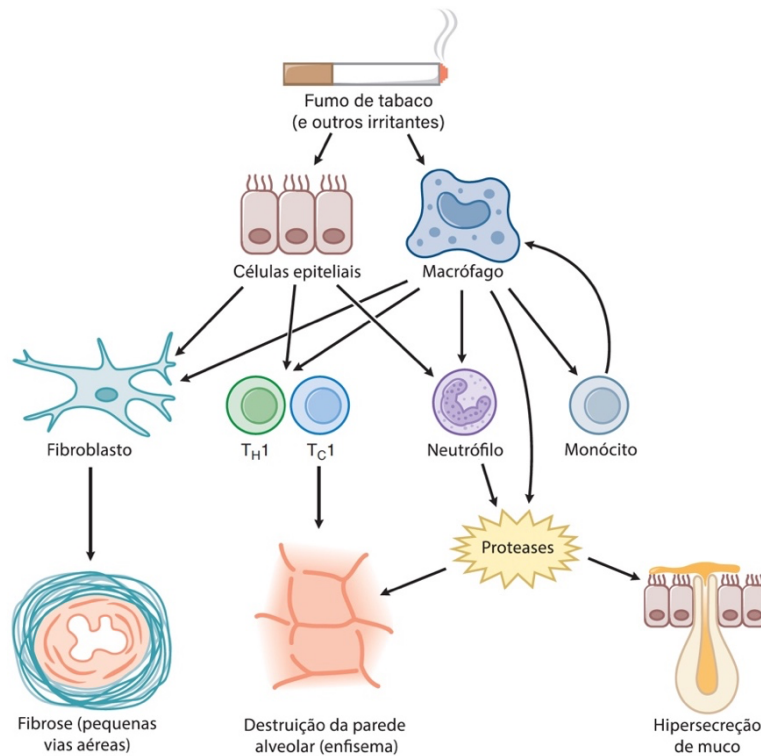


Figura 5.3 – Mecanismos celulares na DPOC. T_{H1}, linfócito T auxiliar; T_{C1}, linfócito T citotóxico. Adaptado de (78).

Na presença de partículas irritantes, as células epiteliais pulmonares libertam fatores de crescimento, que são responsáveis por recrutar fibroblastos e estimular o crescimento de tecido conjuntivo, promovendo a fibrose do tecido pulmonar (76,77). A libertação de proteases (elastases, por exemplo) pelos macrófagos, juntamente com o desequilíbrio entre essas proteases e os seus inibidores provocado pelo stress oxidativo, conduz à destruição das paredes alveolares (77,79). Além disso, o processo inflamatório, o desequilíbrio das proteases, o stress oxidativo e as vias de transdução de sinal levam à hipertrofia e hiperplasia das células caliciformes e, conseqüentemente, a uma maior secreção de muco (7,76,78,79). As propriedades bioquímicas do muco também se alteram, tornando-o mais viscoso e aumentando o risco de infecções no trato respiratório por colonizações bacterianas (76,77).

5.4. Sinais e sintomas

A DPOC é caracterizada por uma obstrução progressiva das vias aéreas e limitação contínua do fluxo de ar, o que acaba por se traduzir em sintomas desagradáveis que causam um impacto negativo na saúde e bem-estar dos doentes. Apesar de ser uma

doença respiratória por natureza, a DPOC não se limita exclusivamente a sintomas do foro respiratório, tendo uma plétora de outros sintomas associados que se manifestam não só a nível físico, mas também a nível psicológico (80,81). Alguns destes sintomas são:

- ◆ Dispneia. É crónica e progressiva, e é o sintoma mais comum na DPOC. Os termos que os doentes utilizam para a descrever variam bastante, mas geralmente encontram-se dentro de “uma sensação de esforço acrescido para respirar, peso no peito, ou respiração ofegante”;
- ◆ Tosse. Apesar da tosse crónica se apresentar frequentemente como um dos primeiros sintomas da DPOC, esta é comumente desvalorizada pelos doentes, que a associam ao fumo de tabaco e/ou a outras exposições ambientais. Esta tosse pode ser produtiva ou não;
- ◆ Expetoração. A expetoração é geralmente difícil de avaliar e associar à DPOC por vários fatores;
- ◆ Pieira e aperto no peito. Estes sintomas podem variar entre dias, ou até mesmo ao longo de um mesmo dia (25);
- ◆ Perda de peso, perda de músculo e anorexia. Como consequência do desequilíbrio entre a ingestão calórica e o consumo energético, aproximadamente metade dos doentes com DPOC estão em risco de malnutrição. A combinação deste balanço energético negativo com a atividade inflamatória pode levar a atrofia muscular (25,82).
- ◆ Fadiga;
- ◆ Ansiedade e/ou depressão. São sintomas muito comuns nesta patologia, estando principalmente associados a estados de saúde mais graves, a um maior risco de exacerbações e a internamentos hospitalares de emergência (25).

5.5. Exacerbações

As exacerbações na DPOC são definidas como sendo episódios agudos de agravamento dos sintomas respiratórios que resultam na necessidade de recorrer a terapêutica adicional (25,83). Os mecanismos biológicos subjacentes a estes eventos variam consideravelmente, e as ocorrências em si podem ser súbitas e resultar em idas às urgências e hospitalização dos doentes. As exacerbações são incidentes importantes no decurso da doença devido ao impacto que têm nos indivíduos e nos sistemas de saúde,

sendo responsáveis por grande parte da carga socioeconómica da DPOC (84,85). Com a progressão da doença, estes eventos têm tendência a ocorrer com maior frequência (85).

São vários os fatores que podem desencadear estes episódios agudos, de entre os quais importa mencionar as infeções por bactérias ou vírus e a poluição, entre outros. Anomalias no sistema imunitário e mecanismos de defesa do doente levam a exacerbações mais frequentes, estando estas associadas a um declínio pulmonar mais acelerado, a uma diminuição na qualidade de vida e a uma maior mortalidade entre os indivíduos afetados (83).

Pode-se definir uma exacerbação tendo por base sintomas, eventos ou uma combinação de ambos. As definições baseadas em sintomas regem-se pelo agravamento dos sintomas reportado pelo doente, como o aumento da dispneia, da tosse e do volume e purulência da expetoração. Já as definições baseadas em eventos abrangem doentes cujas condições se deterioraram o suficiente para requerer uma mudança de tratamento ou recurso às urgências/internamento (84).

Segundo o relatório GOLD, as exacerbações podem ser classificadas como 1) ligeiras, se o tratamento com broncodilatadores de curta duração de ação for suficiente; 2) moderadas, caso sejam necessários antibióticos e/ou corticosteroides orais juntamente com os broncodilatadores de curta duração de ação; ou 3) severas, quando o doente recorre às urgências ou necessita de hospitalização (25).

5.6. Diagnóstico e avaliação

Qualquer indivíduo acima dos 40 anos que apresente queixas de dispneia, tosse crónica ou expetoração, e/ou um historial de exposição a fatores de risco para esta doença, deve ser avaliado para determinar se tem DPOC, sendo obrigatória a realização de espirometria para se poder elaborar um diagnóstico. Uma razão de VEF_1/CVF após broncodilatação inferior a 0,7, juntamente com a presença dos sintomas anteriormente referidos e uma exposição considerável a estímulos nocivos, confirmam a existência de uma limitação persistente do fluxo aéreo (25).

A espirometria é um exame que avalia a função pulmonar através da quantidade de ar que o paciente inspira e expira, bem como a rapidez e facilidade com que esse ar é

expirado (86). Para o diagnóstico da DPOC, a espirometria realizada deve ser com prova de broncodilatação (87).

Essencialmente, a espirometria deve medir dois parâmetros: a capacidade vital forçada, que equivale ao volume total de ar que uma pessoa consegue expirar forçosamente após uma inspiração máxima; e o volume expiratório forçado no primeiro segundo que, tal como o nome indica, corresponde ao volume que uma pessoa é capaz de exalar no primeiro segundo dessa mesma manobra respiratória (25,88). Ambos estes parâmetros devem ser comparados a valores de referência, definidos com base na idade, altura, sexo e etnia (25,86). Também deve ser calculada a razão entre VEF_1/CVF , razão esta que é independente de valores de referência e, tal como referido anteriormente, deve ser inferior a 0,7 para se considerar que existe obstrução (25). Porém, quando comparado à utilização de valores do limite inferior da normalidade, o uso desta razão fixa de $VEF_1/CVF < 0,7$ apresenta algumas limitações, como o facto de poder levar a diagnósticos mais frequentes em idosos, visto que a elasticidade do pulmão decresce com a idade, enquanto em adultos com idades inferiores a 45 anos pode haver subdiagnóstico (25,38).

Para se diferenciar um resultado normal de um anómalo num determinado exame, é necessário identificar os valores que se incluem dentro e fora do intervalo de confiança de 95% estabelecido para esse mesmo exame, considerando-se valores anómalos todos os resultados que se encontrem fora desse intervalo. O limite inferior da normalidade é um valor estipulado com esta finalidade, representando os 5% mais baixos dos resultados obtidos numa população normal (89). Apesar das opiniões divergentes acerca de qual destes métodos é a melhor escolha para definir obstrução e diagnosticar a DPOC, o relatório GOLD continua a favorecer a utilização do $VEF_1/CVF < 0,7$ (juntamente com a presença ou ausência de sintomatologia e fatores de risco), devido à simplicidade e consistência que este método confere ao clínico (25).

Após ser feito o diagnóstico, é necessário realizar uma avaliação dos vários aspetos da doença para que se possa instituir o tratamento mais adequado. São estes:

- ◆ A severidade da restrição do fluxo aéreo;
- ◆ A natureza e intensidade dos sintomas do doente;
- ◆ O histórico de exacerbações moderadas e severas, bem como o risco futuro;

- ◆ A presença de comorbilidades (doenças cardiovasculares, síndromes metabólicas, osteoporose, depressão, etc.) (25).

Em doentes que apresentem um VEF_1/CVF após broncodilatação inferior a 0,7, a gravidade da obstrução respiratória pode ser classificada em 4 graus “GOLD”, apresentados na tabela 5.2 (25).

Tabela 5.2 – Classificação da severidade da obstrução respiratória na DPOC. Adaptado de (25).

GOLD 1	Ligeira	$VEF_1 \geq 80\%$ do valor previsto
GOLD 2	Moderada	$50\% \leq VEF_1 < 80\%$ do valor previsto
GOLD 3	Grave	$30\% \leq VEF_1 < 50\%$ do valor previsto
GOLD 4	Muito grave	$VEF_1 < 30\%$ do valor previsto

A sintomatologia dos doentes pode ser avaliada através de diferentes questionários. De entre os disponíveis para este propósito, existem dois que são mais amplamente utilizados: o *Modified British Medical Research Council Questionnaire*, que avalia exclusivamente a falta de ar; e o Teste de Avaliação da DPOC (*COPD Assessment Test – CAT™*), que é composto por um conjunto de questões com o intuito de averiguar o estado de saúde do doente com DPOC (25).

Embora o risco de exacerbações seja consideravelmente mais alto em doentes com GOLD 3 e GOLD 4, o VEF_1 não é suficiente para antever com precisão a frequência e severidade das exacerbações em doentes com DPOC. Diversos estudos demonstraram que estes episódios agudos de agravamento da doença variam bastante de doente para doente, pelo que a melhor forma de prever eventos futuros é através do histórico de exacerbações anteriores já tratadas (25). Considera-se que um doente tem um risco elevado de exacerbações futuras se teve duas ou mais exacerbações nos últimos 12 meses, ou se teve uma exacerbação que levou a internamento hospitalar nesse mesmo período de tempo (87).

6. Opções farmacológicas e algoritmos terapêuticos utilizados no tratamento da DPOC

Os sintomas associados à DPOC têm consequências marcantes nas atividades diárias, no estado de saúde e na qualidade de vida dos doentes (90). Por este motivo, um dos principais propósitos do tratamento farmacológico é a melhoria desta sintomatologia persistente e da tolerância ao exercício físico, bem como a redução da ocorrência de exacerbações, da progressão da doença e da mortalidade (3,91).

6.1. Fármacos para administração pulmonar

A intervenção farmacológica primária no tratamento da DPOC tem por base a terapêutica broncodilatadora de longa duração de ação, que engloba tanto os agonistas- β_2 de longa duração de ação (LABAs) como os anticolinérgicos, nomeadamente os antagonistas muscarínicos de longa duração de ação (LAMAs). Juntamente com estes fármacos, podem ainda ser utilizados os corticosteróides inaláveis (ICS) (3,90,92). Os broncodilatadores de longa duração de ação são utilizados como terapêutica de manutenção regular, mas em caso de crise, ou como terapêutica inicial em doentes com poucos sintomas, podem ser utilizados broncodilatadores de curta duração de ação, como os agonistas- β_2 de curta duração de ação (SABAs) (91,92).

Os LABAs e os LAMAs promovem o relaxamento do músculo liso brônquico e melhoram o fluxo de ar e, conseqüentemente, as trocas gasosas (93,94).

◆ Agonistas- β_2

Tal como o próprio nome indica, os agonistas- β_2 são responsáveis por estimular os recetores β_2 -adrenérgicos, o que leva ao aumento da via de sinalização da adenosina monofosfato cíclica (94). Para além de causarem broncodilatação, os agonistas- β_2 também promovem o transporte mucociliar e diminuem o recrutamento de neutrófilos e a libertação de mediadores dos mastócitos (93).

Alguns exemplos de SABAs incluem o salbutamol e a terbutalina. O formoterol, salmeterol e indacaterol são alguns dos LABAs utilizados na DPOC. Enquanto os SABAs

têm uma duração de ação de entre 4 a 6 horas, os LABAs atuam durante 12 horas ou mais (25). As moléculas de LABAs mais recentes, como o indacaterol e o olodaterol, têm uma duração de ação que ultrapassa as 24 horas, o que permite que sejam administrados apenas uma vez por dia (93).

Os efeitos adversos associados à utilização de agonistas- β_2 são previsíveis e dependentes da dose administrada. De entre os mais comuns podem-se destacar a taquicardia e as arritmias cardíacas em indivíduos predispostos, nomeadamente nos idosos (95).

◆ Anticolinérgicos

Os anticolinérgicos são uma classe de fármacos que inibem a ação da acetilcolina ao nível dos recetores muscarínicos (94). Embora sejam expressos pelo menos 3 subtipos de recetores muscarínicos no pulmão, os anticolinérgicos atuam principalmente nos recetores M3 (96). Comparativamente aos antagonistas muscarínicos de curta duração de ação (SAMAs), como o brometo de ipratrópio, os LAMAs têm uma maior seletividade para estes recetores e ficam ligados aos mesmos durante um maior período de tempo, o que prolonga o efeito broncodilatador (25,96).

De entre os LAMAs existentes, podem-se destacar o brometo de aclidínio, o brometo de glicopirrónio, o brometo de tiotrópio e o brometo de umeclidínio (25).

Geralmente, os anticolinérgicos inaláveis são bem tolerados e não apresentam muitos efeitos adversos a nível sistémico, pelo facto da sua absorção para a corrente sanguínea ser mínima. Assim, a reação adversa mais comum é a xerostomia (95).

◆ Corticosteróides

Os corticosteróides são agentes anti-inflamatórios que atuam através da ativação dos recetores de glucocorticóides no organismo (97). Apesar do tratamento com corticosteróides não atrasar o declínio do VEF₁ a longo prazo, a sua utilização diária pode resultar numa redução da frequência de exacerbações e melhoria geral do estado de saúde, principalmente em doentes que já estejam num estado mais avançado da doença (95). O uso de corticosteróides pode acarretar um maior risco de efeitos adversos, pelo que é importante identificar corretamente quais os doentes que efetivamente podem beneficiar da sua utilização (97).

Os biomarcadores permitem que se estude a presença e/ou atividade dos vários processos biológicos, de modo a identificar indivíduos com mecanismos fisiopatológicos distintos e, assim, adaptar a terapêutica farmacológica às suas necessidades específicas (91). A contagem de eosinófilos funciona como um biomarcador que permite prever a resposta dos doentes aos ICS, havendo evidência substancial que demonstra que em contagens de eosinófilos de pelo menos $0,1 \times 10^9$ células/L, o tratamento com uma associação LABA+ICS leva a uma redução do risco de exacerbações futuras comparativamente a uma terapêutica feita unicamente com LABA (91,98). Paralelamente a isto, observou-se que para essa mesma associação de fármacos, quanto maior fosse a contagem de eosinófilos, maior era o seu efeito na diminuição do risco de exacerbações em relação à utilização exclusiva do LABA (98).

A fluticasona, a beclometasona e a budesonida são alguns dos corticosteróides inaláveis disponíveis para o tratamento da DPOC (25).

Relativamente à administração de corticosteróides por via oral, a via inalatória apresenta uma absorção sistémica consideravelmente menor, o que minimiza a incidência dos efeitos adversos associados à terapêutica com corticosteróides a nível sistémico, como a miopatia induzida por esteróides e a perda de densidade óssea. As principais reações adversas provenientes da administração pulmonar desta classe farmacoterapêutica são a candidíase oral, a afonia, algumas contusões na pele e um maior risco de desenvolvimento de pneumonia (95).

6.2. Fármacos para administração sistémica

Ainda que os broncodilatadores e os corticosteróides inaláveis sejam as principais recomendações para o tratamento da DPOC, os fármacos orais continuam a ser prescritos regularmente na prática clínica. Adicionalmente, a adesão às terapêuticas orais é razoavelmente melhor, visto que os dispositivos inalatórios exigem que os doentes sejam educados quanto à sua utilização (99).

◆ Metilxantinas

As metilxantinas são inibidores não-seletivos da fosfodiesterase que promovem a broncodilatação e estimulam a função do músculo inspiratório (99,100). A teofilina é a

metilxantina mais utilizada, havendo evidência de uma melhoria no VEF₁ quando esta é administrada em conjunto com o salmeterol inalável (em comparação com o uso isolado desse LABA), bem como do seu efeito broncodilatador no tratamento de sintomas como a dispneia (25,99).

Todavia, mesmo existindo provas dos seus efeitos benéficos na DPOC, a utilização desta classe farmacoterapêutica continua a ser muito controversa devido aos seus efeitos não-broncodilatadores. Para além da *clearance* da teofilina diminuir com a idade, o seu metabolismo é alterado por diversas variáveis fisiológicas e outros fármacos (25). Por outro lado, num ensaio clínico randomizado, verificou-se que a adição de teofilina em baixa dose em adultos tratados com ICS e com elevado risco de exacerbações, não reduziu o número de exacerbações ao longo de um período de 1 ano quando comparado com um placebo (101). Outros estudos também demonstraram que o tratamento de exacerbações na DPOC com metilxantinas estava associado a efeitos adversos e interações medicamentosas frequentes (100).

A toxicidade das metilxantinas está diretamente relacionada com a dose, o que se apresenta como um obstáculo, visto que grande parte do benefício destes fármacos só ocorre quando é administrada uma dose perto da dose tóxica. As metilxantinas têm um amplo espectro de efeitos adversos, de entre os quais náuseas, enxaquecas, convulsões e arritmias, que podem até mesmo ser fatais (24).

◆ Macrólidos

Complementarmente aos seus efeitos antimicrobianos, os macrólidos também exercem uma ação anti-inflamatória (91). O tratamento de longo prazo com azitromicina, numa posologia de 250 mg/dia ou de 500 mg três vezes por semana, ou com eritromicina, numa dose de 250 mg administrada duas vezes por dia, leva a uma redução do risco de exacerbações em doentes propensos a estes episódios agudos (25,91). O efeito dos macrólidos provou ser ainda maior em doentes ex-fumadores (91).

A utilização destes fármacos está associada a um aumento da resistência a antibióticos, bem como a perda de audição e prolongamento do intervalo QTc, um dos parâmetros associado ao eletrocardiograma (25,91).

◆ Mucolíticos

Os mucolíticos, como a carbocisteína, N-acetilcisteína e erdoesteína podem ajudar a reduzir as exacerbações e melhorar um pouco o estado de saúde independentemente dos doentes estarem a fazer ICS ou não (25,102). A erdoesteína tem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e apesar de não ter efeitos significativos na função pulmonar, verificou-se que consegue reduzir o número absoluto de exacerbações ao longo de um ano, bem como a duração e frequência das mesmas (102). Em relação à carbocisteína e à N-acetilcisteína, o perfil de eficácia e segurança da erdoesteína é maior (103).

◆ Inibidores da fosfodiesterase-4

O principal mecanismo de ação dos inibidores da fosfodiesterase-4 (PDE4) consiste na quebra da adenosina monofosfato cíclica intracelular, o que reduz a inflamação (25). Em doentes com obstrução respiratória grave ou muito grave, bronquite crónica e um histórico de exacerbações, o roflumilaste reduz as exacerbações moderadas e graves tratadas com corticosteróides sistémicos. Ainda que não possua uma ação broncodilatadora direta, este fármaco demonstrou ser capaz de melhorar o VEF₁ (25,91,95).

O roflumilaste tem mais reações adversas do que os medicamentos inaláveis, mas menos do que as metilxantinas (25,95). No entanto, deve ser evitado em doentes hepáticos, e como é metabolizado pelo CYP3A4 e o CYP1A2 para dar origem ao metabolito ativo, é necessária precaução em doentes cuja medicação habitual inclua fortes inibidores ou indutores desses citocromos P450 (95).

Os efeitos adversos mais comuns dos inibidores da PDE4 incluem náuseas, diarreia, perda de peso e efeitos psicológicos, como a ansiedade e depressão (25,91,95). Por conseguinte, é recomendado que se faça uma monitorização do peso do doente ao longo do tratamento, que seja evitado o uso de roflumilaste em doentes com peso abaixo do normal, e que se tenha em atenção a sua utilização em indivíduos com depressão (25). Contudo, é de notar que as reações adversas ao roflumilaste parecem diminuir quando se inicia o tratamento a uma posologia de 250 µg/dia (durante as primeiras quatro semanas), antes de se dar início à toma da dose terapêutica, de 500 µg. Esta estratégia provou reduzir a descontinuação da terapêutica e melhorar o perfil de tolerância dos doentes em comparação com o início de tratamento a uma posologia de 500 µg/dia (104).

7. O pulmão como via de administração

A via de administração pulmonar é uma via que permite a administração de fármacos tanto a nível local como a nível sistémico, de uma forma rápida, eficaz e não-invasiva. Assim sendo, é muito explorada para o tratamento de doenças do foro pulmonar, mas também de outras doenças que carecem de terapêutica sistémica. De facto, graças à grande área de superfície e alta vascularização do pulmão, à ausência de efeito de primeira passagem e à menor quantidade de enzimas responsáveis pela metabolização de fármacos, a via pulmonar tem também muito potencial na administração de fármacos para esta última aplicação (23,105). Relativamente a outras vias, a administração pulmonar oferece várias vantagens, como um início de ação rápido, efeitos adversos reduzidos e uma maior biodisponibilidade (106).

Contudo, as vias respiratórias do ser humano são um sistema anatómico complexo que inclui várias estruturas distintas, como a traqueia, os brônquios, os bronquíolos e os alvéolos, o que torna difícil avaliar o transporte e deposição das partículas inaladas (17,107). O tamanho dos alvéolos é apenas um exemplo de como as características do trato respiratório afetam o comportamento dos aerossóis inalados, uma vez que as taxas de retenção dos aerossóis são maiores em alvéolos mais pequenos (22). Complementarmente, a partir do momento em que as partículas do fármaco são depositadas no pulmão, estão sujeitas aos vários mecanismos de defesa deste órgão, de entre os quais o transporte mucociliar e a fagocitose pelos macrófagos alveolares, que levam a um decréscimo da concentração de fármaco, podendo esta ficar abaixo da concentração mínima efetiva (106).

O fluxo e a deposição das partículas de um aerossol são substancialmente afetados pela estrutura do trato respiratório, e qualquer alteração fisiopatológica nas vias aéreas, como as mudanças induzidas por infeções do foro respiratório, pode alterar o padrão de deposição dos aerossóis inalados. O tamanho das partículas também é de especial importância, visto que apenas partículas com um determinado diâmetro aerodinâmico (normalmente de 1 a 5 μm) são capazes de alcançar o pulmão com eficácia (23).

Posto isto, para que se consiga prever o percurso/deposição das partículas inaladas e garantir que a administração por via pulmonar é um sucesso, é essencial ter em atenção todos os elementos do sistema respiratório e as suas particularidades, assim como as

propriedades físico-químicas do fármaco a ser administrado, a natureza e características da formulação em si, e o tipo de dispositivo usado para administração, bem como o propósito da terapêutica a instituir (23,107,108).

7.1. Deposição, dissolução e eliminação das partículas de um aerossol

A zona do pulmão em que as partículas são depositadas é crucial para determinar o destino das mesmas. Os alvéolos são a zona mais favorável para que haja uma absorção rápida, devido à sua elevada permeabilidade, ampla área de superfície e boa irrigação sanguínea, sendo este o alvo quando se deseja uma ação sistêmica. Já as células epiteliais da zona condutora apresentam-se como um obstáculo para a absorção sistêmica (106). No entanto, vários fatores condicionam a deposição das partículas de um aerossol em diferentes regiões do trato respiratório, como o diâmetro aerodinâmico das partículas, a frequência respiratória, o volume pulmonar, o volume respiratório e as condições de saúde do indivíduo (23).

Como representado na figura 7.1, existem três principais mecanismos de deposição das partículas de um aerossol: o impacto por inércia, a sedimentação por gravidade, e a difusão Browniana (23,106,109). O mecanismo de deposição que uma determinada partícula segue depende diretamente do seu diâmetro aerodinâmico, que também determina em que zona do trato respiratório a partícula vai ser depositada (106,109).

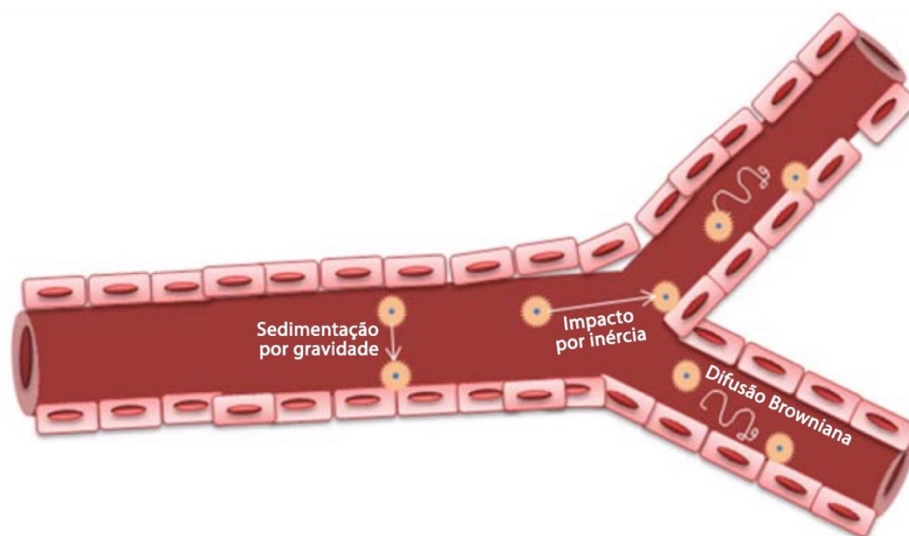


Figura 7.1 – Mecanismos de deposição das partículas de um aerossol. Adaptado de (23).

Partículas com um diâmetro aerodinâmico superior a 5 μm são geralmente depositadas na região traqueobrônquica através do impacto por inércia. Isto porque estas partículas ganham velocidade com a inalação e mantêm uma determinada trajetória, e quando o fluxo de ar muda de direção com a ramificação das vias aéreas, estas são incapazes de seguir esse movimento devido à sua inércia, pelo que acabam por colidir com as paredes das vias respiratórias (23,106,109).

A deposição através do mecanismo de sedimentação por gravidade ocorre nas vias respiratórias de menor calibre e na região alveolar, onde a velocidade do fluxo de ar é mais baixa, o que permite que as forças gravitacionais atuem sobre partículas com um diâmetro aerodinâmico de 1 a 5 μm (23,106,109). Apenas é possível haver sedimentação quando a força gravitacional que atua sobre as partículas é maior do que as forças de arrastamento impostas pelo fluxo aéreo (23).

O mecanismo de deposição por difusão Browniana dá-se em partículas com um diâmetro inferior a 1 μm , predominantemente em partículas com diâmetros inferiores a 0,5 μm , que se depositam maioritariamente na zona respiratória do pulmão. Uma particularidade deste mecanismo é que, quanto menores forem as partículas, maior é a sua deposição (23,109).

Após a deposição, se esta ocorrer na região alveolar, segue-se a dissolução das partículas no surfactante pulmonar para posterior interação celular e/ou absorção sistémica. Neste passo, a solubilidade do fármaco é importante. No entanto, o facto do volume de surfactante pulmonar ser limitado também é um fator condicionante, podendo levar a uma dissolução incompleta das partículas depositadas (110). No caso de uma deposição em zonas mais proximais, as partículas ficam retidas no muco e acabam por ser eliminadas através do mecanismo de limpeza mucociliar (109).

Quando se pretende que haja um efeito local, uma rápida eliminação ou absorção sistémica conduzem a um declínio da concentração de fármaco no pulmão. Os vários mecanismos de defesa pulmonar são um desafio no desenvolvimento de estratégias de administração de fármacos para esta modalidade, pois impedem que haja uma exposição e ação farmacológica prolongadas (106). Para além dos já referidos, outros mecanismos de defesa incluem a degradação enzimática e a eliminação mecânica (como a tosse, os espirros e a deglutição) de partículas que se depositaram no trato respiratório superior (23).

7.2. Tipos de dispositivos para administração pulmonar

7.2.1. Inaladores pressurizados com válvula doseadora

Os inaladores pressurizados com válvula doseadora (MDIs) consistem em recipientes pressurizados e multidose, onde a formulação está contida. Quando acionados, dispensam uma única dose de fármaco através de uma válvula doseadora ligada a um orifício de saída. Este tipo de dispositivo pode conter formulações em solução, suspensão ou co-suspensão, e para além da substância ativa em si, contém outros componentes essenciais à formulação, como um propulsor, agentes suspensores, co-solventes e surfactantes (111).

Apesar de existirem MDIs para todas as classes farmacológicas inaláveis disponíveis no tratamento de doenças obstrutivas, o doente pode-se deparar com algumas dificuldades na utilização deste tipo de dispositivo. A necessidade de haver uma coordenação entre a inspiração e a ativação do dispositivo, bem como a alta taxa de deposição na orofaringe associada aos MDIs, leva a que apenas uma pequena parte do aerossol consiga efetivamente alcançar as vias aéreas inferiores. Por este motivo, os MDIs são muitas vezes utilizados em conjunto com câmaras expansoras. Não obstante, cabe mencionar que a necessidade de coordenação inspiração/ativação foi contornada com a criação de MDIs ativados pela inalação, que contêm um sistema que é ativado pelo fluxo inspiratório do doente, libertando a dose quando o indivíduo inala. (109).

7.2.2. Inaladores de pó seco

Os inaladores de pó seco (DPIs) são dispositivos que contêm a substância ativa em forma de pó micronizado, juntamente com os outros excipientes da formulação (109,111). Existem DPIs de dose única, nos quais é necessário colocar uma cápsula (de gelatina ou hidroxipropilmetilcelulose) que contém a dose terapêutica a cada utilização, e DPIs multidose, que dispensam doses individuais que estão contidas no seu interior. Neste tipo de inaladores, a inalação do fármaco depende da força inspiratória do doente. Após ser acionado, o doente deve inspirar para que o fluxo de ar crie turbulência no interior do dispositivo, o que vai permitir retirar a dose do mesmo, para posterior entrada nas vias aéreas. Uma vez que as partículas micronizadas de fármaco têm tendência a

agregar (e conseqüentemente, têm uma baixa capacidade de aerossolização), é frequente as formulações de pó seco incluírem transportadores, que são excipientes introduzidos para melhorar a dispersão e aerossolização. Quando a formulação é arrastada para o exterior do dispositivo, as partículas de fármaco e de transportador separam-se devido à turbulência gerada, ficando o último depositado na orofaringe enquanto a substância ativa progride ao longo das vias respiratórias dado o seu diâmetro aerodinâmico adequado ao efeito (109).

Estes dispositivos têm sido alvo de muito interesse nos últimos anos porque não requerem um propulsor e os doentes não têm a necessidade de coordenar a inalação com a ativação do DPI, como acontece com os MDIs (112). No entanto, o fluxo inspiratório necessário para retirar a dose, desagregar as partículas de fármaco e permitir uma deposição pulmonar adequada costuma ser relativamente elevado, e varia de DPI para DPI (109,111). Tal exigência pode ser um problema no tratamento de indivíduos com doenças pulmonares obstrutivas, especialmente em estadios mais graves dessas doenças (109,112).

7.2.3. Inaladores de névoa suave

Nos inaladores de névoa suave (SMIs), a formulação está contida num cartucho que é inserido no dispositivo. Cada vez que este é acionado, são libertadas doses individuais do fármaco (109). Os SMIs não utilizam propulsores para libertar a formulação; em vez disso, utilizam um “sistema de mola” que empurra o fármaco através de uma membrana, emitindo um aerossol de pequenas partículas finas (111). O termo “névoa” é usado para descrever o mecanismo por trás da produção do aerossol, bem como as qualidades da nuvem de aerossol gerada (112).

A emissão do aerossol é mais estável neste tipo de dispositivo, o que contribui para uma utilização mais fácil e conveniente para os doentes. Por outro lado, como a dose é libertada num período de tempo relativamente alargado, não é necessária uma coordenação tão rigorosa entre o momento em que se aciona o dispositivo e se inicia a inalação, o que aumenta a probabilidade de uma maior deposição pulmonar (111).

Comparativamente aos MDIs atuais, os SMIs conferem uma libertação do aerossol mais lenta, o que reduz substancialmente a deposição na orofaringe e aumenta a quantidade de fármaco que de facto chega ao pulmão (109,111,112).

7.2.4. Nebulizadores

Um nebulizador é um equipamento que consegue transformar soluções ou suspensões em aerossóis, libertando um fluxo constante de fármaco na forma de uma fina névoa. Este processo pode ocorrer de formas diferentes, dependendo do tipo de nebulizador. Ao contrário dos MDIs e DPIs, a utilização de um bocal ou de uma máscara é indispensável neste tipo de dispositivo, apesar do uso de um bucal ser mais aconselhável (109). A máscara é uma alternativa que se utiliza apenas em doentes cuja utilização do bocal é difícil (109,112). Após a ativação do nebulizador, o doente deve ficar a inalar o aerossol durante 10 a 15 minutos, até que todo o fármaco acabe. Este tempo de administração mais alongado permite que sejam administradas maiores doses comparativamente aos outros dispositivos (109).

Existem três tipos principais de nebulizadores: os nebulizadores a jato, os nebulizadores ultrassónicos e os nebulizadores com membrana oscilatória. Um dos grandes benefícios dos nebulizadores é o facto de não ser necessária a sincronização entre a ativação do dispositivo e a inalação, o que os torna muito úteis em pediatria, em doentes mais idosos ou em pessoas que não consigam utilizar de forma correta e eficaz os MDIs (mesmo com câmara expansora) e os DPIs (devido ao elevado fluxo inspiratório que estes dispositivos requerem) (109,112). Adicionalmente, não é necessária uma técnica inalatória específica para este tipo de dispositivo, sendo suficiente que o doente respire normalmente para que a administração seja bem sucedida (112). Contudo, algumas das desvantagens destes equipamentos incluem o extenso tempo de administração, o maior custo e a acrescida complexidade (109,112).

8. Estratégias de formulação para o tratamento da DPOC

Mesmo com as opções terapêuticas que existem atualmente, a DPOC continua a ser uma doença de gestão particularmente difícil (7). Não é possível tratar esta doença tendo apenas em conta a farmacoterapia, visto que existem outros problemas para além da escolha do fármaco mais adequado para o tratamento, como as barreiras biológicas que têm de ser ultrapassadas e a baixa biodisponibilidade da substância ativa (79,113).

Posto isto, é importante otimizar as formulações para inalação de modo a alcançar uma administração pulmonar suficiente que permita assegurar uma boa resposta terapêutica. Para uma melhor eficácia, a administração do fármaco deve ser segura, reproduzível e prática. Tais propósitos podem ser alcançados tendo em atenção vários aspetos, de entre os quais a formulação (8).

Devido às limitações associadas aos tratamentos convencionais de várias doenças crónicas, durante as últimas décadas tem havido um grande interesse no estudo de novos sistemas que permitam uma administração seletiva dos fármacos (10). Algumas estratégias para o desenvolvimento de novos sistemas de veiculação de fármacos têm demonstrado resultados promissores, podendo minimizar os efeitos adversos das substâncias ativas ao melhorar a sua farmacocinética e direcionar o seu efeito para células-alvo (113).

Nos subcapítulos seguintes, serão abordadas algumas das estratégias de formulação atualmente existentes que poderão ajudar a alcançar melhores resultados terapêuticos na DPOC, juntamente com alguns estudos que revelaram resultados de interesse para cada estratégia. Genericamente foi estabelecido um intervalo máximo de 5 anos para a seleção dos estudos abordados, de modo a providenciar informação o mais atual possível, verificando-se, no entanto, uma exceção.

8.1. Estratégias de formulação com base na nanotecnologia

A nanotecnologia corresponde, por definição, a uma área que se foca no desenvolvimento e utilização de materiais com dimensões entre 1–100 nm (114,115). A capacidade de manipular estruturas a uma escala atómica permite a criação de

nanomateriais que seguem as leis da mecânica quântica, ao contrário de outros objetos e sistemas produzidos a larga escala, que se regem pelas leis clássicas da física e química (114). Estruturas, partículas e materiais à escala nanométrica têm propriedades únicas, o que abre portas ao desenvolvimento de sistemas inovadores para o diagnóstico e tratamento de doenças. Estes nanomateriais podem ser desenvolvidos com diferentes propriedades físico-químicas e biológicas, tanto na sua superfície como no seu interior, e graças ao seu tamanho reduzido, que se assemelha ao de várias estruturas biológicas (como os organelos e vesículas, que têm uma dimensão igual ou inferior a 100 nm), há a possibilidade de interromperem interações moleculares e, conseqüentemente, alterarem o curso de uma doença ou condição (115). Apesar desta limitação dos tamanhos na definição mais estrita, na área de veiculação de fármacos é frequente assumir-se uma definição mais ampla e abrangente dos sistemas nanométricos, principalmente no que se refere ao seu tamanho, que se assume assim poder ir até aos 1000 nm (116). Assim, para efeitos desta dissertação serão considerados como tal sistemas que estejam na escala submicrométrica.

A utilização de nanopartículas para administração pulmonar no tratamento da DPOC é uma perspectiva interessante, que poderia melhorar a eficácia das terapêuticas atuais graças à sua capacidade de veicular os fármacos até regiões mais profundas do pulmão, e ultrapassar as barreiras biológicas (79,117). No entanto, também pode ser desafiante, visto que a administração em si, o mecanismo pelo qual as partículas se depositam, e a interação do fármaco com as células dependem em larga medida do tamanho das partículas inaladas (117).

Existem várias nanoestruturas que variam no tamanho, forma e material utilizado, e que podem ser categorizadas em diferentes grupos de acordo com as suas propriedades. Dada a sua relevância na área focada nesta dissertação, serão detalhadas as nanopartículas poliméricas, os lipossomas e as nanopartículas inorgânicas (118,119).

8.1.1. Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são partículas sólidas e coloidais que são desenvolvidas a partir de qualquer polímero sintético, como os poliésteres, que incluem a poli-caprolactona, o ácido polilático (PLA) e o ácido polilático-co-glicólico (PLGA), ou natural, como a albumina e a gelatina (119,120). As nanopartículas poliméricas são

tipicamente divididas em nanocápsulas e nanoesferas, tal como representado na figura 8.1. As primeiras são um sistema do tipo reservatório, em que o fármaco está encapsulado no interior de uma camada externa constituída pelo polímero; enquanto as segundas correspondem a um sistema do tipo matriz, onde a substância ativa se encontra dentro da própria matriz polimérica ou adsorvida à sua superfície (119,121).

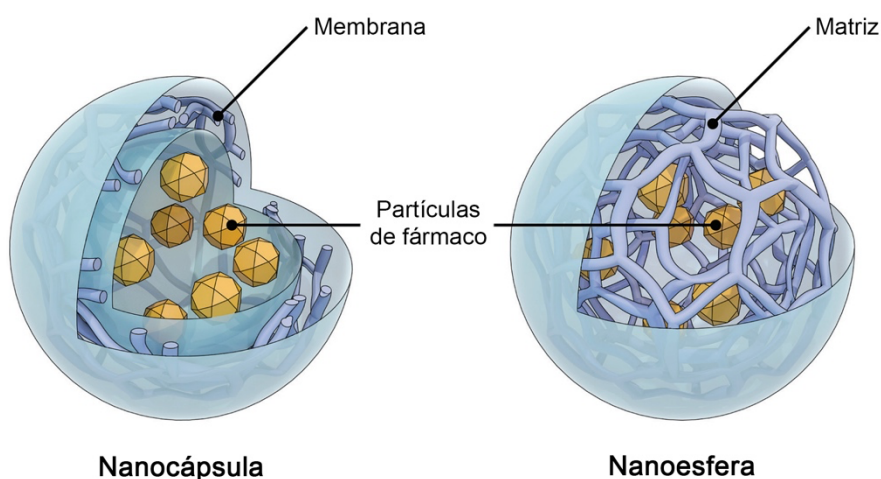


Figura 8.1 – Representação esquemática de uma nanocápsula e de uma nanoesfera. Adaptado de (122).

Um estudo realizado por Buhecha *et al.* procurou utilizar nanocápsulas para co-encapsular dois fármacos com aplicação na DPOC, a teofilina e a budesonida, com carácter hidrofílico e hidrofóbico, respetivamente. Para tal, utilizaram PLA como polímero de encapsulação, com o objetivo de produzir nanopartículas que proporcionassem a libertação prolongada de ambos os fármacos, possibilitando um alargamento do intervalo de administração e, potencialmente, um aumento da adesão à terapêutica por parte dos doentes. As nanopartículas foram otimizadas para maximizar a eficácia de carga dos fármacos, mantendo também um tamanho e carga superficial adequados. Além das nanopartículas com co-encapsulação dos fármacos, foram também produzidas nanopartículas com os fármacos individuais, para utilização como controlo. Devido à sua elevada solubilidade em meio aquoso e fraca interação com o polímero (que é lipofílico), a encapsulação de substâncias hidrofílicas é mais difícil do que a encapsulação de compostos lipofílicos, o que resultou em maior eficácia de carga para a budesonida. O ensaio de libertação *in vitro*, realizado numa mistura de fluido pulmonar simulado (SLF) com metanol, revelou uma libertação reduzida de ambos os fármacos a partir das nanopartículas preparadas após 24 h, tendo sido de 10–15% para a teofilina e 3–7% para

a budesonida (figura 8.2). Verificou-se igualmente que não havia um efeito marcado da encapsulação em conjunto ou individual. No mesmo tempo de ensaio a dissolução dos fármacos livres correspondeu a 50-60%, o que mostra que as nanopartículas asseguram uma libertação prolongada da teofilina e da budesonida, o que contorna a necessidade de utilizar vários dispositivos numa situação clínica. Juntando-se a isto um intervalo de administração mais extenso e uma redução da ocorrência de efeitos adversos associados à libertação prolongada, poderia ser possível melhorar a adesão do doente à terapêutica (123).

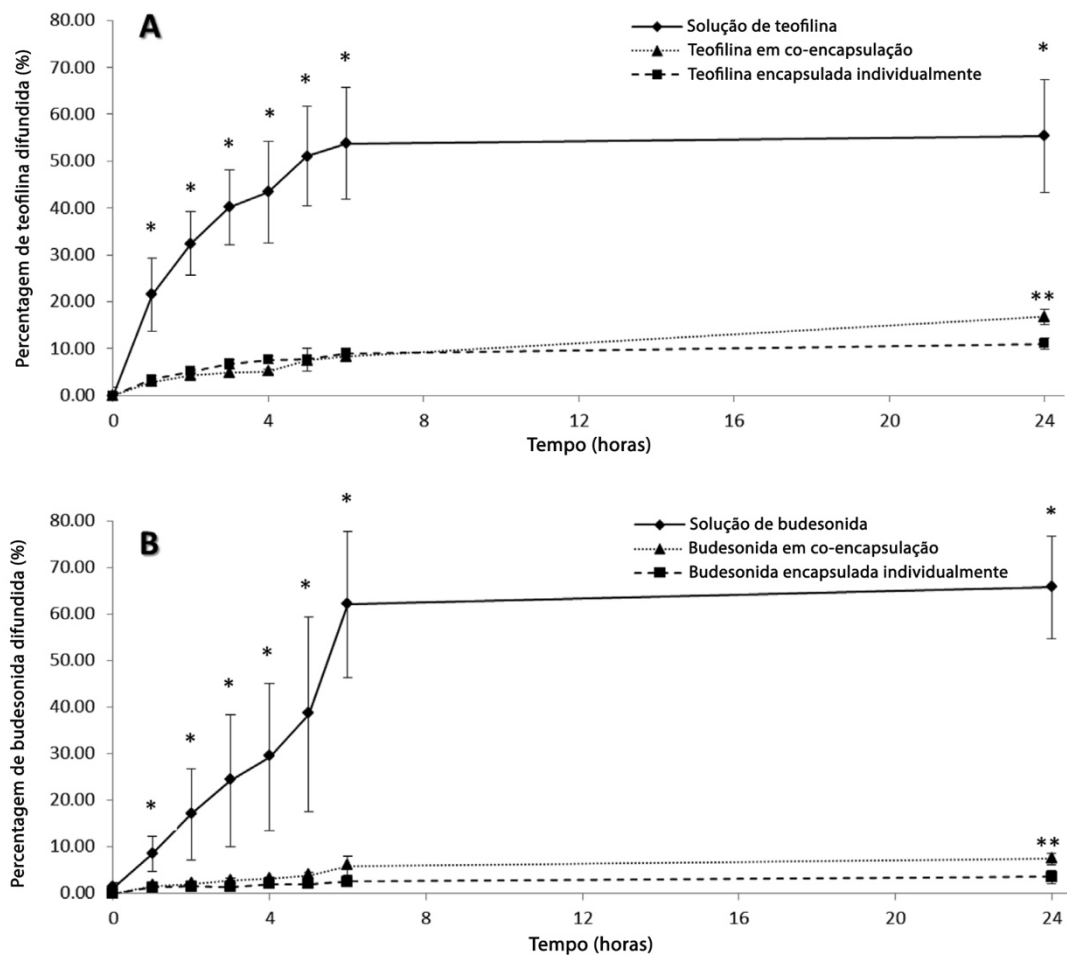


Figura 8.2 – Libertação de teofilina (A) e de budesonida (B) em meio pulmonar simulado/metanol, a partir das nanopartículas formuladas com fármacos em associação e de forma individual, em comparação com o perfil de dissolução dos fármacos (concentração equivalente). Adaptado de (123).

A exposição de células 16HBE14o- (epitélio bronquial humano) às nanopartículas mostrou viabilidade celular semelhante àquela obtida após incubação com os fármacos na forma livre, apresentando percentagens aproximadamente iguais ou superiores a 70% para concentrações de nanopartículas de 2,5 mg/mL, tanto para as nanopartículas

contendo teofilina e budesonida de forma isolada, como para as que continham os fármacos em co-encapsulação. Já nos estudos de permeabilidade, verificou-se que os fármacos contidos em nanopartículas atravessavam as células mais lentamente do que quando na forma livre, o que coincide com a observação anterior de uma liberação prolongada. A avaliação aerodinâmica de uma suspensão das nanopartículas após nebulização mostrou elevada retenção no dispositivo, tendo-se observado que boa parte das gotículas geradas tinham tamanho inferior a $6,8 \mu\text{m}$, o que permitiu uma maior retenção em estádios do dispositivo que simulam as zonas mais profundas do pulmão (figura 8.3). Adicionalmente, a fração de partículas finas (FPF) calculada para a teofilina e para a budesonida foi maior nas nanopartículas que apresentam co-encapsulação em comparação com as que encapsulam os fármacos individualmente. Sendo assim, o estudo de deposição indica que os fármacos podem ser administrados nos locais adequados e que a formulação é apropriada para inalação, pelo que estas nanopartículas podem-se apresentar como uma nova estratégia de formulação para administração pulmonar (123).

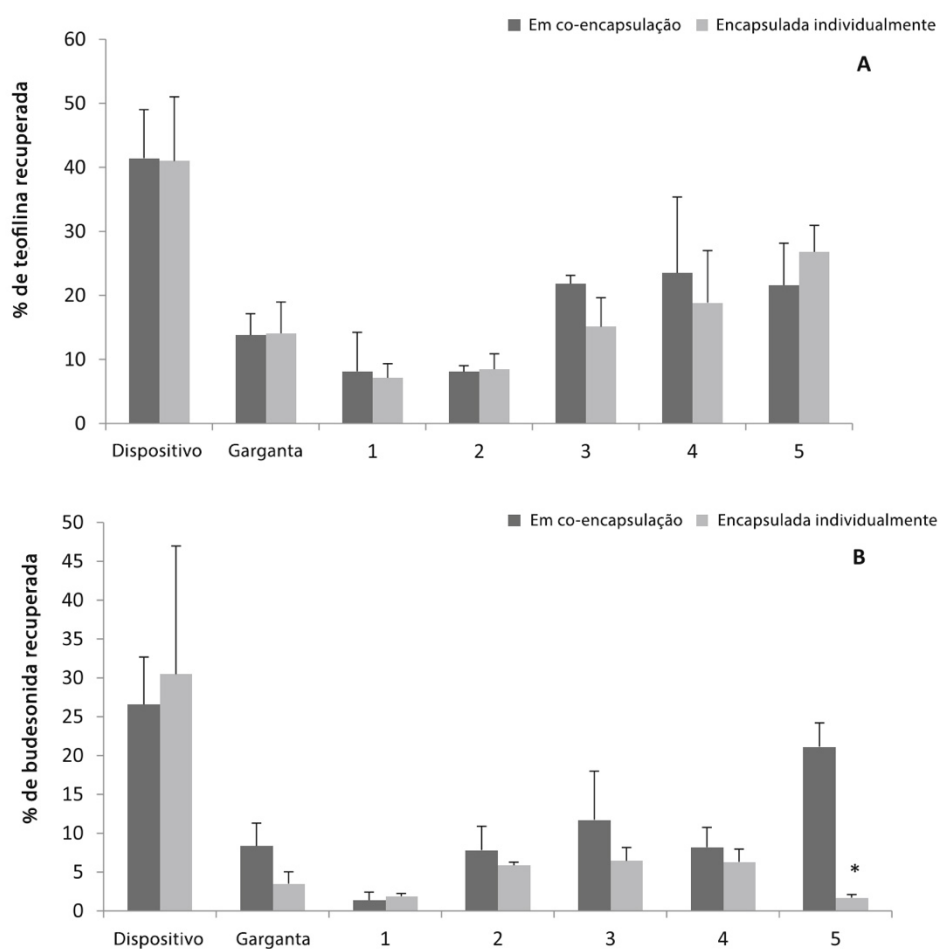


Figura 8.3 – Comparação dos perfis de deposição da teofilina (A) e da budesonida (B) das nanopartículas formuladas com os fármacos em associação e de forma individual nos diferentes estádios do impactador utilizado, quando administradas sob a forma de suspensão nebulizada. Adaptado de (123).

Num outro estudo foi otimizada uma formulação de nanopartículas poliméricas que continham miR-146a adsorvido à sua superfície, sendo este responsável por regular negativamente a inflamação ao inibir a expressão do gene da cinase 1 associada ao recetor da interleucina 1 (IRAK1), que foi o principal gene alvo deste estudo. Para a preparação das nanopartículas, foi utilizado o polímero biodegradável poli(glicerol adipato-co- ω -pentadecalactona), tendo-se adicionado dioleoiltrimetilamónia propano (DOTAP), um lípido catiónico, para melhor incorporar o miR-146a. Verificou-se que, quanto maior fosse a concentração de DOTAP, menor era o tamanho de partícula e mais positivo era o potencial zeta. Foram obtidas nanopartículas com miRNA com cerca de 250 nm e potencial zeta positivo (entre +6 e +11 mV), o qual sofreu alguma redução após associação do miRNA, ao contrário do que se verificou no tamanho. Esta redução no potencial zeta das partículas demonstrou que o miR-146a foi efetivamente adsorvido. Os ensaios de libertação realizados em solução tampão fosfato-salino (PBS) indicaram uma libertação bifásica, numa primeira fase com libertação rápida (\approx 51%) até às 4h, a que se seguiu uma libertação contínua até às 24 h, tendo-se alcançado cerca de 77% de miRNA libertado. Os ensaios de citotoxicidade realizados em células A549 (epitélio alveolar humano) revelaram maior redução da viabilidade celular quando as nanopartículas continham mais DOTAP. Por outro lado, a uma concentração de 1,25 mg/mL das referidas nanopartículas, verificou-se um decréscimo de 35% da viabilidade celular, tendo esta atingido os 65%. Porém, é de notar que uma concentração tão elevada não é esperável no pulmão, dada a sua grande área. Nas mesmas células avaliou-se a internalização celular após marcação das nanopartículas e do núcleo das células com etiquetas fluorescentes. Como apresentado na figura 8.4, após 1 h de incubação, verificou-se a existência de nanopartículas à volta do núcleo e do citoplasma das células, em células isoladas e em populações de células, demonstrando que as nanopartículas tinham sido internalizadas pelas células (124).

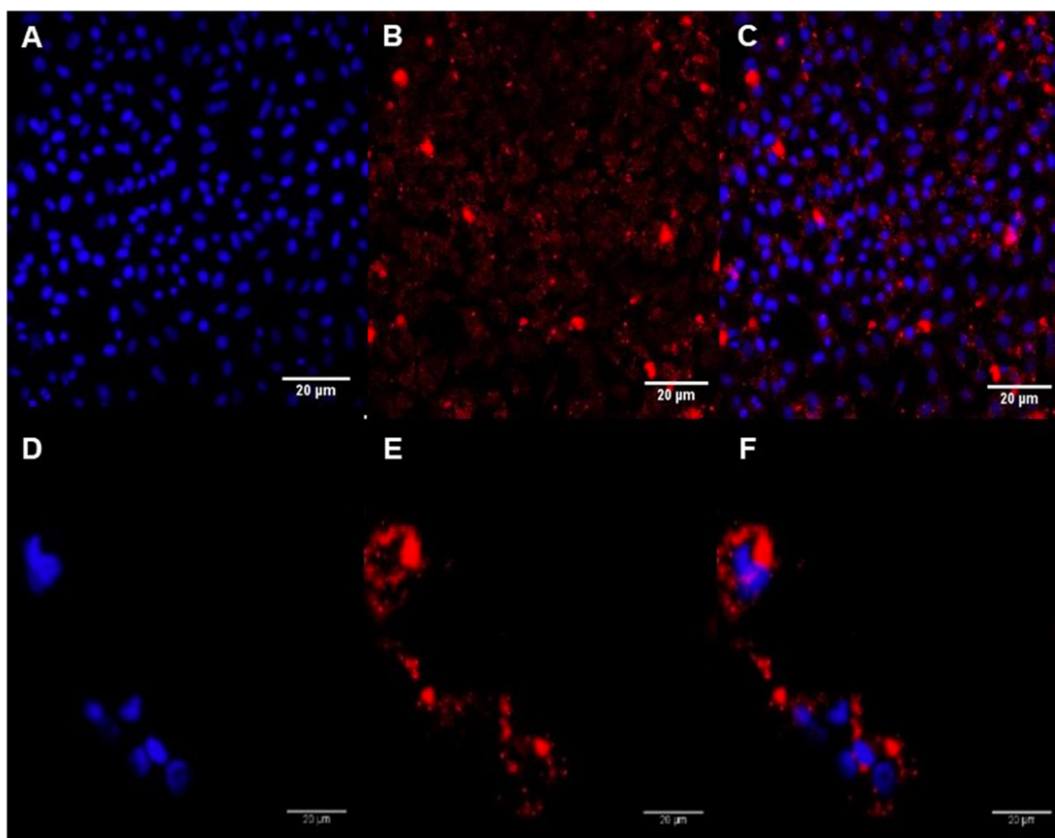


Figura 8.4 – Imagens de fluorescência (A–C) e confocais (D–F) das nanopartículas marcadas com vermelho Nile presentes nas células A549 após 1 hora de incubação. (A e D) núcleos marcados com o corante DAPI; (B e E) nanopartículas marcadas com o vermelho Nile; (C e F) combinação das imagens A+B e D+E respectivamente. Adaptado de (124).

Dada a interferência do miR-146a na expressão do gene IRAK1, analisou-se a atividade funcional das nanopartículas com miRNA na expressão desse gene, tendo-se verificado que havia, de facto, níveis reduzidos tanto do gene como da proteína IRAK1, o que indica que as nanopartículas foram capazes de veicular o miR-146a para o local de ação. Estes resultados mostram que as nanopartículas catiónicas preparadas para a administração do miR-146a parecem ser uma abordagem terapêutica promissora no tratamento e gestão da DPOC, através da sua ação em genes-alvo associados à inflamação que se verifica nesta doença. Porém, no futuro será necessária uma avaliação do efeito destas nanopartículas em células alveolares provenientes de doentes com DPOC, para que se possa verdadeiramente apurar a totalidade do seu potencial clínico (124).

Tal como ambos os artigos acima abordados demonstraram, as nanopartículas poliméricas podem ser de grande interesse no desenvolvimento de formulações para administração pulmonar para o tratamento de doenças respiratórias crónicas, incluindo a DPOC. Os sistemas poliméricos apresentam várias vantagens, tais como a alta

estabilidade durante a nebulização e o armazenamento e, dependendo dos polímeros utilizados, uma eficácia de carga e biocompatibilidade elevadas, uma toxicidade mínima e capacidade de aumentar a solubilidade dos fármacos (118,119,125,126). Adicionalmente, se forem selecionados polímeros biodegradáveis cujos produtos de degradação não sejam tóxicos, a função celular normal será potencialmente não afetada (123).

Todavia, a utilização de nanopartículas poliméricas pode também apresentar alguns desafios, como a dificuldade de retenção das partículas no pulmão devido ao seu tamanho reduzido, o que dificulta a sua deposição e permite, em alguns casos, uma fácil penetração na circulação sistêmica (125). A transição de culturas celulares para a administração em seres humanos também é outro desafio, dado que o ambiente dos sistemas biológicos é muito mais complexo do que o das culturas de células utilizadas em ensaios *in vitro*, e existe uma ausência de dados *in vivo* que permitam provar o potencial deste tipo de nanopartículas (127). Para além disto, será necessário estudar o desempenho destas nanoestruturas noutros tipos de aerossolização, visto que grande parte dos dados atualmente existentes apenas abordam e mencionam a nebulização.

8.1.2. Lipossomas

Os lipossomas são vesículas de forma esférica, constituídas por fosfolípidos anfifílicos, os quais formam uma bicamada lipídica que encerra um núcleo aquoso (113,118–120). Estas estruturas podem ser produzidas de forma espontânea através da dispersão de fosfolípidos em meio aquoso, o que resulta na formação da sua bicamada característica e está dependente da concentração de fosfolípido. No entanto, este método instantâneo costuma originar lipossomas de dimensões consideráveis, pelo que são necessárias outras técnicas para os produzir à escala nanométrica (118). Dependendo das técnicas de produção e dos seus parâmetros específicos, os lipossomas podem ter uma ou mais bicamadas. Graças a esta estrutura, são capazes de incorporar fármacos hidrofílicos, que ficam contidos no núcleo aquoso existente no interior da vesícula ou entre as várias camadas lipídicas, e fármacos hidrofóbicos, que ficam na região onde as caudas hidrofóbicas dos fosfolípidos se encontram, nas próprias camadas de fosfolípidos (113,118,119,125). Em doenças para as quais é comum a utilização de terapêuticas de combinação, como é o caso da DPOC, esta característica pode ser bastante oportuna

(113). Adicionalmente, estes sistemas vesiculares apresentam muitas outras propriedades de interesse, como a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, e através da adição de diferentes agentes à membrana lipídica, ou da alteração das propriedades químicas da superfície, é possível ajustar facilmente certas características como o tamanho e a funcionalidade dos mesmos (120). Tal como representado na figura 8.5, os lipossomas podem ser classificados estruturalmente de acordo com o número de bicamadas lipídicas que apresentam, sendo “unilamelares” se apresentarem apenas uma bicamada, ou “multilamelares” se apresentarem várias. Por outro lado, os primeiros podem ainda ser classificados conforme o seu tamanho em pequenas vesículas unilamelares (SUV), grandes vesículas unilamelares (LUV) ou vesículas unilamelares gigantes (GUV) (128).

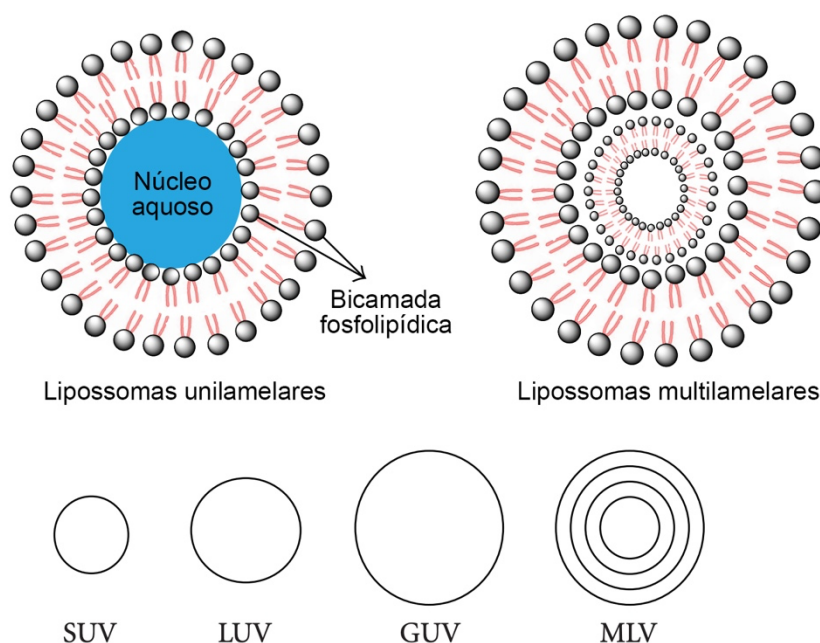


Figura 8.5 – Representação esquemática da estrutura e dos diferentes tipos de lipossomas. Adaptado de (128).

Em 2018, um grupo de investigadores realizou um estudo para determinar se lipossomas (< 100 nm) teriam capacidade para atravessar a densa expetoração existente no trato respiratório, avaliando o seu potencial no tratamento por inalação de doenças respiratórias, nomeadamente em doentes com DPOC. Isto porque, apesar de haver uma hipersecreção de muco altamente viscoso na DPOC (e noutras doenças respiratórias), sabe-se também que o transporte mucociliar está bastante limitado, o que pode permitir que partículas com uma superfície hidrofóbica e tamanho adequados consigam penetrar neste muco (129).

Foram preparados 3 tipos de SUVs para administração pulmonar de dipropionato de beclometasona (BDP): os lipossomas-PLAIN, que não continham qualquer tipo de modificador polimérico de superfície; os lipossomas-PF, que continham Pluronic® F127 (PF127); e os lipossomas-PEG, que continham fosfatidiletanolamina funcionalizada com polietilenoglicol (PEG2000PE). Tanto o PEG2000E como o PF127 são modificadores poliméricos de superfície. Na figura 8.6 é possível observar uma representação esquemática dos três tipos de lipossomas produzidos (129).

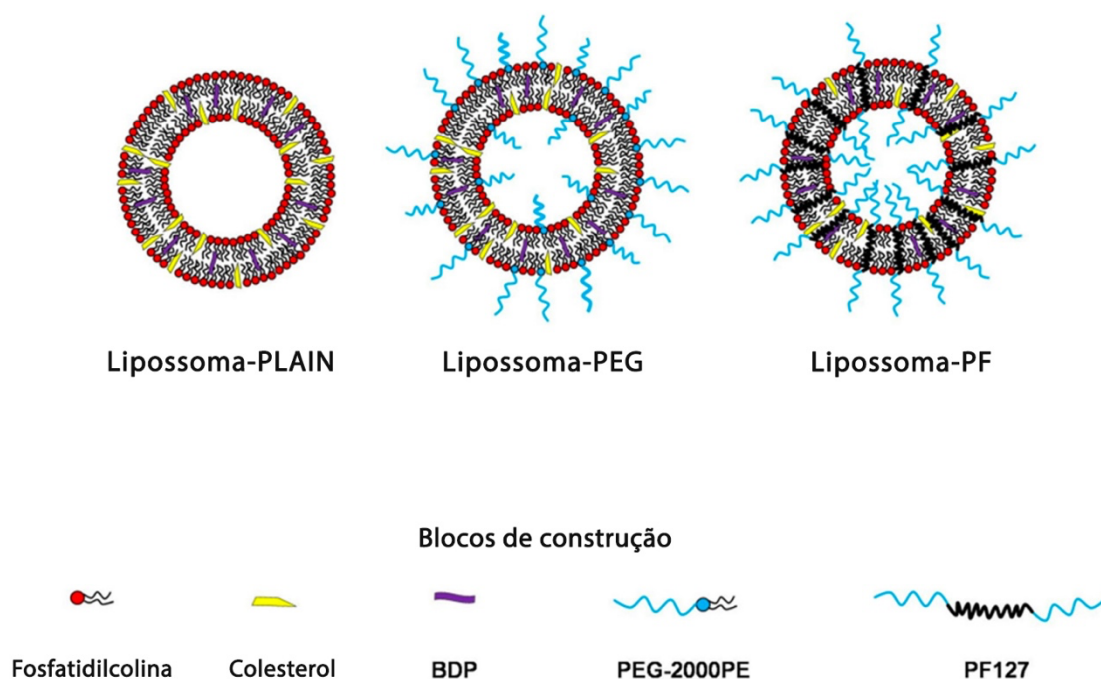


Figura 8.6 – Representação esquemática dos três tipos de lipossomas testados para avaliação das propriedades de penetração no muco. Adaptado de (129).

O tamanho de partícula tem uma importância acrescida neste estudo, visto que o nanotransportador tem de ser pequeno o suficiente para conseguir atravessar os poros do muco. Tendo isto em conta, foram utilizados diferentes métodos na preparação dos lipossomas para averiguar qual deles permitiria alcançar as características pretendidas, tendo-se chegado à conclusão de que uma concentração máxima de lípidos de 10 mg/mL oferecia as melhores condições, produzindo lipossomas com tamanhos entre os 40–65 nm. A eficácia de encapsulação foi determinada de modo a obter um máximo de BDP encapsulado (129).

Na figura 8.7 encontram-se os resultados do estudo de libertação de BDP *in vitro*, realizado numa mistura de SLF com etanol. Todos os lipossomas libertaram quantidades insignificantes de fármaco ao longo de 48 h, mas o perfil desta libertação foi prolongado.

No entanto, como a quantidade de etanol adicionado ao meio foi mínima, tais resultados eram expectáveis. Isto porque o BDP é um fármaco hidrofóbico (tendo-se adicionado etanol ao meio para auxiliar na sua dissolução), pelo que a sua libertação estava dependente da quantidade de solvente orgânico utilizada. Por outro lado, é de considerar que as condições de libertação do fármaco seriam marcadamente diferentes *in vivo*, podendo diferir daquelas previstas nos estudos *in vitro*. Por este motivo, e de um ponto de vista terapêutico, não se devem tirar conclusões tendo em conta as baixas percentagens de BDP libertadas, que apenas sugerem uma cinética de libertação prolongada (129).

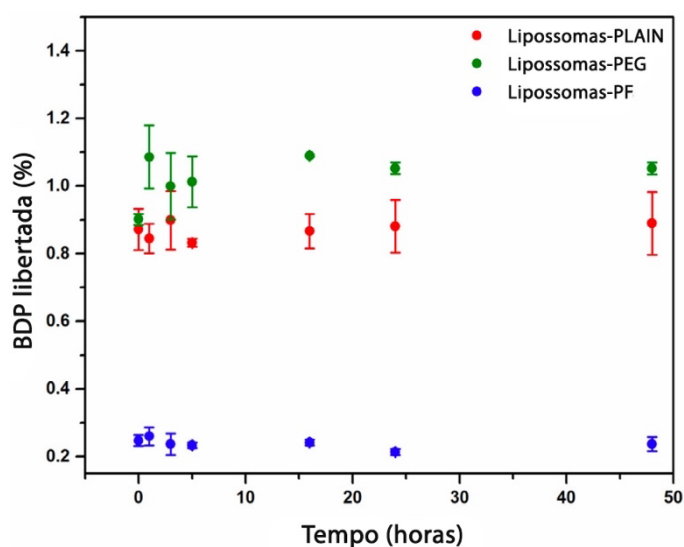


Figura 8.7 – Libertação de BDP *in vitro* numa mistura de SLF e etanol pelos três tipos de lipossomas. Adaptado de (129).

Nos ensaios de citotoxicidade em células H441 (epitélio pulmonar humano), todos os lipossomas apresentaram uma ótima biocompatibilidade, com valores de viabilidade superiores a 85% em concentrações de 0,2 mg/mL a 20 mg/mL. Os ensaios *in vivo*, realizados em ratinhos, confirmaram estes resultados. Para a realização dos estudos de penetração dos lipossomas no muco, foram utilizadas amostras de expetoração de doentes com DPOC, o que é relevante do ponto de vista clínico. Como se pode verificar na figura 8.8, durante as primeiras 6 horas do estudo de permeação não se obtiveram resultados relevantes. A extensão do tempo de observação até às 21 h, indicou uma percentagem de penetração semelhante entre lipossomas-PEG e lipossomas-PLAIN. No entanto, às 27 h verificou-se um aumento da penetração dos lipossomas-PEG (18.8%) face aos lipossomas-PLAIN e -PF (5,3% e 1,2%, respetivamente). Tanto a baixa percentagem de libertação de fármaco, como a reduzida difusão através do muco verificadas nos

lipossomas-PF, podem dever-se ao aumento de viscosidade que o PF-127 sofre a temperaturas perto dos 37 °C (129).

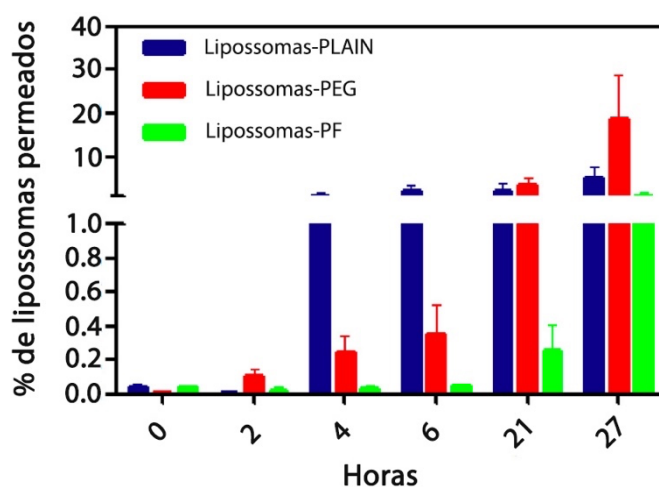


Figura 8.8 – Percentagem de lipossomas permeados no muco. Adaptado de (129).

As células H441 foram também utilizadas para avaliar quantitativamente a absorção celular dos vários lipossomas. A concentrações de BDP de 20 mg/mL, verificou-se que havia uma absorção celular de 22,1% dos lipossomas-PEG, de 11,9% dos lipossomas-PF, e de 43,6% dos lipossomas-PLAIN, o que mostra que, de um modo geral, os lipossomas modificados (isto é, os lipossomas-PEG e -PF) foram menos absorvidos pelas células do que os lipossomas-PLAIN (129).

Tendo em conta todos os dados acima apresentados pôde-se concluir que, de todos os tipos de lipossomas estudados, os lipossomas-PEG parecem ser aqueles que possuem as características mais interessantes, de entre as quais uma maior penetração no muco, uma absorção celular satisfatória e ausência de toxicidade. Juntando-se a isto o facto de outros estudos terem demonstrado que lipossomas com PEG estendem o tempo de residência no pulmão e, conseqüentemente, aumentam a concentração de fármaco no local de ação, parece que os lipossomas-PEG podem ter um bom potencial terapêutico para o tratamento de doenças respiratórias crônicas. A necessidade de melhorar a metodologia de preparação destas pequenas vesículas deverá ser revista no futuro, sendo também de interesse avaliar a deposição deste tipo de lipossomas para administração pulmonar (129).

Apesar das múltiplas vantagens que os lipossomas apresentam (já referidas anteriormente), existem algumas limitações que devem ser tidas em conta, como a baixa eficácia de encapsulação, a estabilidade de armazenamento reduzida, a libertação rápida de fármacos, e a instabilidade durante a nebulização (120,125). Por outro lado, é possível verificar que grande parte dos estudos existentes acerca da utilização de lipossomas a nível pulmonar têm-se focado principalmente no tratamento de infeções respiratórias (129). Posto isto, seria importante a realização de mais estudos focados na utilização destas nanoestruturas em doenças respiratórias crónicas, como a DPOC, para melhor compreender e explorar as oportunidades que este tipo de sistema pode oferecer.

8.1.3. Nanopartículas inorgânicas

As nanopartículas inorgânicas compreendem metais nobres, como o ouro e a prata, e materiais inorgânicos, como o fosfato de cálcio e o óxido de ferro. Devido às suas características catiónicas, algumas nanopartículas inorgânicas são utilizadas para a administração de RNA e DNA, visto que conseguem facilmente ligar-se a estas macromoléculas aniónicas (113,117,130). Na DPOC, as nanopartículas inorgânicas também foram investigadas como possíveis nanotransportadores (113).

Wang *et al.* desenvolveram uma nova classe de nanopartículas porosas de selénio e sílica, denominadas nanopartículas Se@SiO₂, com um diâmetro médio de aproximadamente 55 nm e potencial zeta de -19 mV, que possuem propriedades antioxidantes, uma citotoxicidade reduzida e boa biocompatibilidade. Graças à sua capacidade de reduzir o stress oxidativo em vários modelos de doenças, foi colocada a hipótese de estas nanopartículas conseguirem atenuar os danos provocados pelo stress oxidativo em doenças pulmonares inflamatórias, ao modularem a disfunção mitocondrial (131).

Um dos aspetos avaliados neste estudo foi o efeito que 10 µg/mL de nanopartículas Se@SiO₂ tinham nos danos oxidativos induzidos por lipopolissacáridos (LPS), tendo-se verificado que células que continham as nanopartículas produziam menos espécies reativas de oxigénio (ROS) em resposta a 10 ng/mL de LPS do que células sem um tratamento prévio com Se@SiO₂. Também se observou que estas nanopartículas se acumulavam perto das mitocôndrias e conseguiam melhorar a dinâmica das mesmas, protegendo, assim, as células epiteliais alveolares dos danos agudos provocados por LPS.

No entanto, não foram observadas grandes quantidades de nanopartículas no interior destes organelos, o que gera uma necessidade de otimizar estas nanoestruturas para que consigam ter as mitocôndrias como alvo de forma mais eficaz (131).

O desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes é um dos fatores que leva ao desenvolvimento de DPOC, verificando-se um distúrbio da função mitocondrial no epitélio respiratório provocado pelo fumo de tabaco. No entanto, as nanopartículas porosas de $\text{Se}@\text{SiO}_2$ também mostraram ser capazes de reduzir a produção excessiva de ROS induzida pelo fumo de tabaco a nível mitocondrial. Assim, estas nanopartículas podem vir a ser promissoras na prevenção e tratamento da DPOC (131).

Num estudo menos recente, mas com resultados de interesse, Geiser *et al.* compararam a distribuição e localização de nanopartículas de ouro (AuNP) no tecido pulmonar após inalação, bem como a captação dessas nanopartículas por macrófagos de superfície, em ratinhos *wild-type* (Wt), que eram saudáveis, e ratinhos transgênicos (Tg), que tinham DPOC. Nestes últimos, foi introduzido o gene *Scnn1b* para desencadear reações características da DPOC nas vias respiratórias e, assim, induzir a doença. Para alcançar o objetivo definido, os animais inalaram um aerossol contendo AuNP (com um diâmetro de 21 nm) durante 2 h, sendo posteriormente realizada uma lavagem broncoalveolar (BAL) para recolher os macrófagos de superfície que, juntamente com as partes inteiras do pulmão, foram preparados para análise por microscopia eletrónica de transmissão. Foram recolhidos dados imediatamente após a inalação (0 h) e 24 h depois (132).

Após a análise da distribuição e localização das nanopartículas inorgânicas produzidas, observou-se que havia AuNP em toda a superfície interna do pulmão: no surfactante pulmonar, nos macrófagos de superfície, na superfície alveolar, e também no interior das células alveolares tipo I e II. As AuNP que estavam no interior de células encontravam-se maioritariamente em vesículas, sendo rara a sua presença no citoplasma celular. Os resultados obtidos acerca da distribuição pulmonar, representados na figura 8.9, mostraram semelhanças, mas também diferenças entre os grupos de ratinhos e os dois tempos estudados. De um modo geral, a percentagem de AuNP associada aos pneumócitos tipo I e II (ou seja, as nanopartículas ligadas à membrana externa ou contidas no interior destas células) foi substancialmente maior nos ratinhos *Scnn1b*-Tg do que nos Wt. Por outro lado, a percentagem de AuNP nos macrófagos dos ratinhos Wt foi

consideravelmente maior do que nos Scnn1b-Tg, o que parece indicar uma captação mais rápida e eficiente destas nanopartículas pelos macrófagos dos ratinhos saudáveis do que pelos dos ratinhos com DPOC. Às 24 h, verificou-se que a percentagem de AuNP ligada ao epitélio alveolar era menor em ambos os grupos do que aquela a tempo zero, o que consequentemente se traduziu numa maior percentagem de AuNP nos macrófagos também a esse tempo (132).

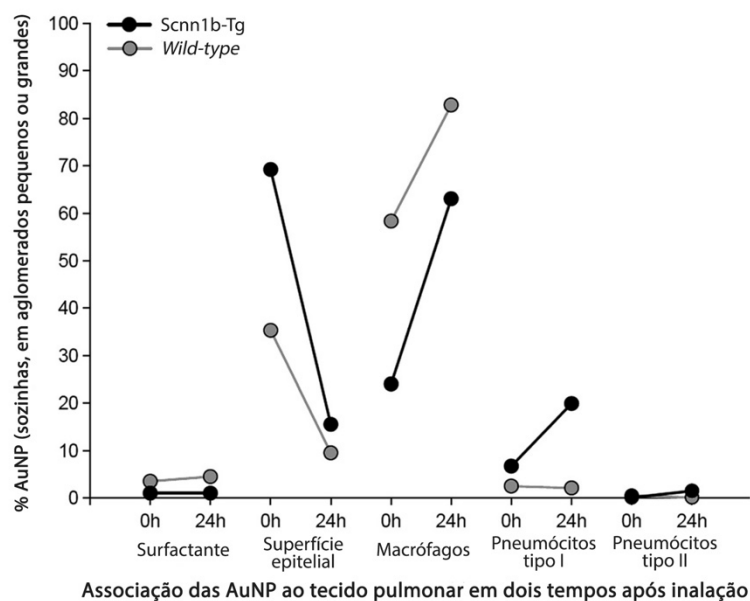


Figura 8.9 – Distribuição relativa das AuNP (sozinhas, em aglomerados pequenos ou em aglomerados grandes) no tecido pulmonar. Adaptado de (132).

No interior dos macrófagos obtidos no BAL, encontraram-se AuNP sozinhas ou em aglomerados de vários tamanhos, contidas no interior de vesículas. Para uma análise mais detalhada da captação por parte dos macrófagos, as vesículas que continham AuNP foram divididas em diferentes categorias de acordo com o seu tamanho: as pequenas vesículas, com um diâmetro < 150 nm, que albergavam AuNP sozinhas ou em pequenos aglomerados; as vesículas de tamanho médio, com um diâmetro de 150–1000 nm; e as vesículas grandes, cujo tamanho era > 1000 nm, sendo que estas duas últimas continham aglomerados de AuNP com diâmetros superiores a 100 nm. Esta variedade de estruturas vesiculares sugere que a captação das partículas ocorreu através de diferentes mecanismos de endocitose. A figura 8.10 mostra algumas imagens de AuNP no interior das diferentes categorias de vesículas estipuladas (132).

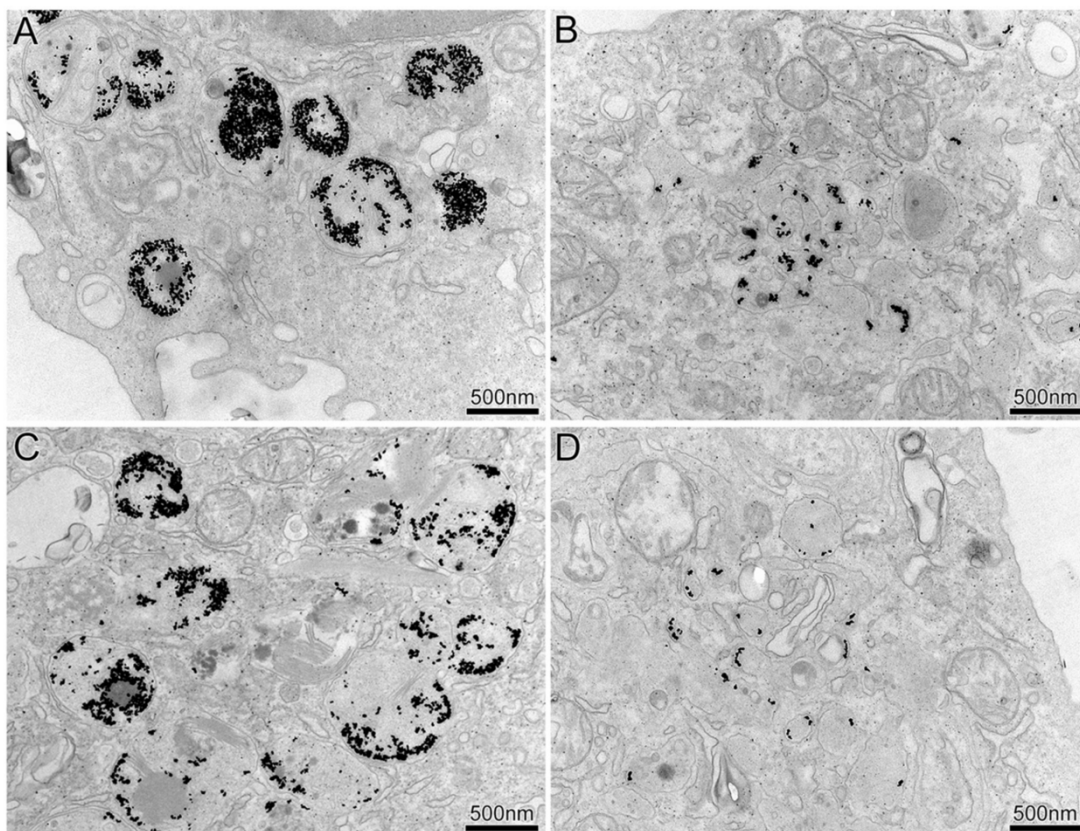


Figura 8.10 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão representativas das AuNP nos macrófagos BAL. (A e B) ratinhos Scnn1b-Tg; (C e D) ratinhos Wt; (A e C) Grandes aglomerados de AuNP (> 100 nm) predominantemente localizados em vesículas de tamanho médio (150–1000 nm) e em vesículas grandes (> 1000 nm); (B e D) AuNP sozinhas ou em pequenos aglomerados (< 100 nm) contidas em pequenas vesículas (< 150 nm); de notar a proximidade das AuNP às membranas dos organelos. Adaptado de (132).

Face aos resultados obtidos, que demonstraram uma menor captação das AuNP pelos macrófagos dos ratinhos Scnn1b-Tg, sabe-se que existe um tempo de residência prolongado destas nanopartículas inorgânicas na superfície pulmonar em ratinhos com DPOC, o que leva a que haja uma maior absorção das AuNP pelas células epiteliais. Tais observações poderão proporcionar novas oportunidades terapêuticas no tratamento da DPOC, mas para tal, serão necessários mais estudos para averiguar de que forma estas nanopartículas interagem com o pulmão (132).

As nanopartículas inorgânicas apresentam várias vantagens que podem ser exploradas em diversas áreas, como a alta biocompatibilidade e estabilidade, as suas propriedades magnéticas e a resistência que apresentam contra a degradação microbiana (119,133). Mas apesar de todos os benefícios, estes nanossistemas apresentam algumas limitações, de entre as quais os efeitos tóxicos que podem ter nas células, que são um

motivo de preocupação apesar de ainda não serem inteiramente compreendidos (130,134). Esta citotoxicidade, juntamente com a baixa excreção dos nanotransportadores inorgânicos, acabam por limitar a aplicação clínica dos mesmos. A possível absorção sistêmica de nanopartículas metálicas carregadas positivamente também pode ser um problema, uma vez que estas conseguem ligar-se facilmente às proteínas séricas com carga negativa e formar agregados (133). Por conseguinte, para que se possa considerar uma eventual administração pulmonar deste tipo de nanoestruturas, ter-se-á de ter em conta estes desafios e encontrar formas de os superar.

8.2. Terapêuticas com base em RNAs

As terapêuticas de RNA parecem ser alternativas promissoras para o tratamento da DPOC, já que oferecem vantagens adicionais face às terapêuticas convencionais. O envolvimento de vários mediadores inflamatórios, que são muitas vezes regulados por genes, é uma das principais características patológicas de doenças respiratórias crônicas (135). Neste sentido, a utilização de moléculas de DNA ou RNA de cadeia simples que tenham como alvo determinados genes pro-inflamatórios, pode levar à regulação da sua expressão e, assim, limitar a progressão da doença e melhorar os resultados terapêuticos (135,136). Geralmente, as terapêuticas de RNA são altamente específicas e constituem alternativas mais seguras e reversíveis do que terapêuticas baseadas em DNA (9).

Contudo, os ácidos nucleicos são macromoléculas hidrofílicas que estão carregadas negativamente, pelo que RNA e/ou DNA desprotegidos (isto é, sem qualquer vetor de entrega) não se conseguem ligar à superfície celular e entrar na célula através de difusão passiva. Adicionalmente, a utilização deste tipo de macromoléculas para administração tem vários desafios adicionais, como a rápida degradação por nucleases (no caso dos RNAs, as RNases) e o estímulo que provocam no sistema imunitário, que também necessitam de ser solucionados (135,137).

A inalação de aerossóis é a maneira mais eficiente de administrar RNA no pulmão, permitindo maximizar a concentração no local de ação enquanto se minimiza a exposição sistêmica. No entanto, a administração de qualquer tipo de RNA às respetivas células-alvo de forma eficaz, segura e reprodutível, é um grande obstáculo. Para tentar superar estas barreiras, têm sido desenvolvidos vários vetores de veiculação de RNA para administração pulmonar, cujas principais funções incluem a proteção das moléculas de

RNA da degradação prematura e a promoção da sua absorção pelas células-alvo. Para além de vetores virais, como o adenovírus, alguns exemplos de vetores não-virais correspondem a sistemas de veiculação poliméricos, lipídicos, híbridos, inorgânicos e ainda aos exossomas (137).

Os principais tipos de RNAs investigados para as doenças respiratórias obstrutivas são os pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e, mais recentemente, os micro-RNAs (miRNAs) (135). Algumas estratégias de formulação com base em RNAs já foram estudadas para várias doenças respiratórias, como a asma e a fibrose quística (137). No entanto, estudos focados em formulações com RNA para o tratamento da DPOC ainda são escassos. Por este motivo, nos dois subcapítulos seguintes serão apenas discutidos alguns dos tipos de RNAs que existem atualmente e que parecem ser relevantes no tratamento da DPOC, sem serem abordadas estratégias de formulação em si.

Adicionalmente, é de destacar que a investigação de estratégias de formulação para a administração pulmonar de RNAs poderá estar muito interligada com a nanotecnologia. Tal pode-se verificar no estudo realizado por Mohamed *et al.*, discutido no subcapítulo 8.1.1. “Estratégias de formulação com base na nanotecnologia – Nanopartículas poliméricas”, bem como nos estudos realizados para outras doenças (124,137).

8.2.1. Micro-RNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificante, com um tamanho entre 18 a 22 nucleótidos, que inibem a tradução de proteínas ao interagirem com mRNAs (138–140). No genoma humano, existem mais de 1000 tipos de miRNAs únicos, que se acredita modularem mais de 60% da expressão de genes (139).

Estes pequenos RNAs atuam ao nível de diversos processos biológicos e, como reguladores de doenças, podem ser observadas alterações na sua abundância tanto no tecido pulmonar como nas células inflamatórias. Por isto, são considerados potenciais biomarcadores para o diagnóstico de doenças, e alvos terapêuticos para o tratamento de doenças respiratórias (138,139). Na DPOC, existe cada vez mais evidência de que a desregulação de miRNAs está envolvida na sua patogénese e desenvolvimento (141).

Um dos miRNAs que mostraram potencial terapêutico na DPOC é o miR-181c, que de entre as suas várias funções, tem um papel importante na resposta inflamatória. Descobriu-se que, em comparação com indivíduos que nunca fumaram, este miRNA está sub-regulado em doentes com DPOC. Um estudo realizado por Du *et al.* mostrou que uma maior expressão de miR-181c atenuava os danos no pulmão causados na DPOC e reduzia a resposta inflamatória, a infiltração de neutrófilos e a produção de ROS. Já a inibição deste miRNA causava o efeito contrário no desenvolvimento de DPOC (141).

Outro miRNA de interesse é o miR-145-5p. Foi demonstrado que, quando existe uma maior expressão deste miRNA em doentes com DPOC, há a capacidade de suprimir a libertação de citocinas pro-inflamatórias comparativamente a controlos não-fumadores. Dang *et al.* acreditam que esta função protetora se deve parcialmente à capacidade do miR-145-5p de regular negativamente o gene *Kruppel-like 5* (KLF5), que é importante na ativação de uma das vias de sinalização do fator nuclear-kappaB (NF- κ B). A ativação prolongada desta via induz uma síntese excessiva de mediadores pro-inflamatórios, que causam danos nas vias respiratórias. Estas observações demonstram que o miR-145-5p pode ser uma potencial estratégia terapêutica no tratamento de DPOC induzida por fumo de tabaco (142).

Outro estudo reportou que o miR-3202 tinha um papel fundamental na regulação negativa de *FAS apoptotic inhibitory molecule 2* (FAIM2), tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta molécula é responsável por inibir a apoptose de linfócitos T mediada pelo FAS, que se acredita ser importante na patogénese da DPOC. O fumo de tabaco leva à sub-regulação do miR-3202, o que resulta numa maior expressão de FAIM2 e consequente inibição do complexo do FAS com o seu ligando (complexo este que estimula a apoptose das células T), que leva à agregação dos linfócitos T. O miR-3202 exógeno pode regular negativamente o FAIM2 e, assim, ativar a sinalização do FAS com o seu ligando, protegendo as células pulmonares da agregação referida (143).

8.2.2. Pequenos RNAs de interferência

Os siRNAs são moléculas de RNA de cadeia dupla com cerca de 21 a 23 pares de bases que são capazes de “silenciar” genes específicos através da sua sequência complementar (9,136). Os siRNAs podem ser facilmente sintetizados e têm sido aplicados para fins terapêuticos em doenças respiratórias crónicas (9,144).

A DPOC é caracterizada pela perda de fibras elásticas nas paredes dos alvéolos e das pequenas vias aéreas. Assim como este decréscimo de elastina está relacionado com uma maior severidade da doença, uma maior quantidade de versicano, que é um proteoglicano de sulfato de condroitina secretado por fibroblastos pulmonares e outras células, também se traduz numa gravidade acrescida. Um estudo realizado por Wu *et al.* mostrou que o tratamento com um siRNA de versicano reduzia a expressão e produção do seu mRNA nos fibroblastos pulmonares de doentes com e sem DPOC, e não afetava a produção de elastina solúvel nesses mesmos doentes. No entanto, apenas nas linhagens de células de doentes com DPOC se verificou que este siRNA levou a um aumento dos níveis de elastina insolúvel. Estes resultados sugerem que a utilização deste siRNA para reduzir a quantidade de versicano produzida, pode ser uma nova estratégia para estimular a reparação do pulmão e, assim, tratar a DPOC (145).

Um grupo de investigadores observou que os níveis de *receptor-interacting protein 2* (Rip2) estavam consideravelmente elevados nos pulmões de ratinhos que tinham sido expostos a fumo de tabaco. Esta proteína mostrou ter um papel crucial na ativação da via do NF- κ B induzida pelo recetor das células T, na proliferação e diferenciação dos linfócitos T e na produção de citocinas. Adicionalmente, a exposição a fumo de tabaco induz um influxo de macrófagos e neutrófilos, que produzem ROS e uma grande variedade de citocinas, fatores quimiotáticos e enzimas proteolíticas, levando ao dano e inflamação do tecido pulmonar. Neste contexto, estes investigadores reportaram que a administração de siRNA de Rip2 foi capaz de atenuar a infiltração de neutrófilos e linfócitos nas vias aéreas, e que ao silenciar o gene do Rip2, houve uma redução evidente da inflamação das vias respiratórias induzida pelo fumo de tabaco e dos danos oxidativos. Para explicar o sucedido, foi colocada a hipótese de isto ser devido à interrupção da via de sinalização do NF- κ B. Assim, demonstrou-se que o Rip2 pode ser um potencial alvo terapêutico na DPOC, e a administração pulmonar deste siRNA pode ser uma abordagem terapêutica a ter em conta nesta doença (144).

Outro estudo mostrou que o *receptor for the pathway patched homolog 1* (PTCH1) estava aumentado no epitélio pulmonar de doentes com DPOC, comparativamente a indivíduos sem a doença. O PTCH1 é um recetor que faz parte da via de sinalização *Hedgehog*, cuja ativação induz a transcrição de genes proliferativos e do PTCH1, que por sua vez consegue inativar esta via através de um mecanismo de *feedback* negativo. Acredita-se que a maior expressão de PTCH1 contribui para a hipersecreção de muco,

apesar de não se saber bem qual o mecanismo por trás deste envolvimento. Este estudo demonstrou que uma expressão reduzida de PTCH1, obtida através da utilização de um siRNA que tinha como alvo esse gene, diminuiu a expressão de muco nos modelos *in vitro* e *in vivo*. Deste modo, o PTCH1 poderá ser um alvo terapêutico para reduzir a hipersecreção de muco em doentes com DPOC, recorrendo à utilização e administração de um siRNA de PTCH1 (146).

8.3. Outras estratégias de formulação de interesse

◆ Micropartículas mucoadesivas

Para além das nanopartículas, existem também micropartículas, definidas como sendo materiais sólidos com um tamanho entre 1–1000 μm (8,10). Dependendo da aplicação em específico, as micropartículas podem ser igualmente de elevado interesse na administração pulmonar de fármacos, principalmente porque o seu tamanho mais facilmente acompanha os requisitos aerodinâmicos desta via de administração (147). Dependendo do seu tamanho, estas micropartículas podem-se depositar por sedimentação gravitacional ou impacto por inércia. Micropartículas com um diâmetro aerodinâmico entre 1 e 5 μm são consideradas ótimas para se conseguir alcançar uma boa deposição pulmonar (113).

Em 2017, Amore *et al.* reportaram a utilização de micropartículas lipídicas sólidas (SLMs) revestidas com um polímero mucoadesivo (alginato, alg-SLMs; ou quitosano, chit-SLMs) para a administração pulmonar de fármacos no âmbito da DPOC. A substância ativa utilizada foi o propionato de fluticasona (FP), tendo-se verificado melhores resultados para alg-SLMs (148).

As alg-SLMs apresentaram tamanhos de aproximadamente 3,5 - 4 μm e potencial zeta de cerca de -20 mV. Os polímeros mucoadesivos foram utilizados com o intuito de promover uma maior adesão das SLMs à camada mucosa do epitélio respiratório, de modo a melhorar a retenção, a farmacocinética e a eficácia dos fármacos administrados no pulmão. Nos testes de mucoadesão *in vitro*, verificou-se que 80% das alg-SLMs permaneceram aderentes à membrana mucosa após lavagem com uma solução salina. A eficácia de carga das alg-SLMs foi de 11,58% (7,47% para chit-SLMs), sendo a libertação de fármaco, realizada em tampão PBS com dodecil sulfato de sódio (SDS), semelhante

para os dois sistemas, como representado na figura 8.11. O polímero utilizado no revestimento das micropartículas não influenciou a libertação da substância ativa, sendo que ambos os sistemas inicialmente exibiram um perfil de libertação rápida, com aproximadamente 40% de fármaco libertado até às 6 h, a que se seguiu uma libertação contínua ao longo das horas seguintes até um máximo de cerca de 50% alcançado às 24 h. No gráfico da figura 8.11 também é possível observar que a dissolução do fármaco livre aumentou ao longo do tempo, atingindo o pico às 6 h e permanecendo constante até às 48 h (148).

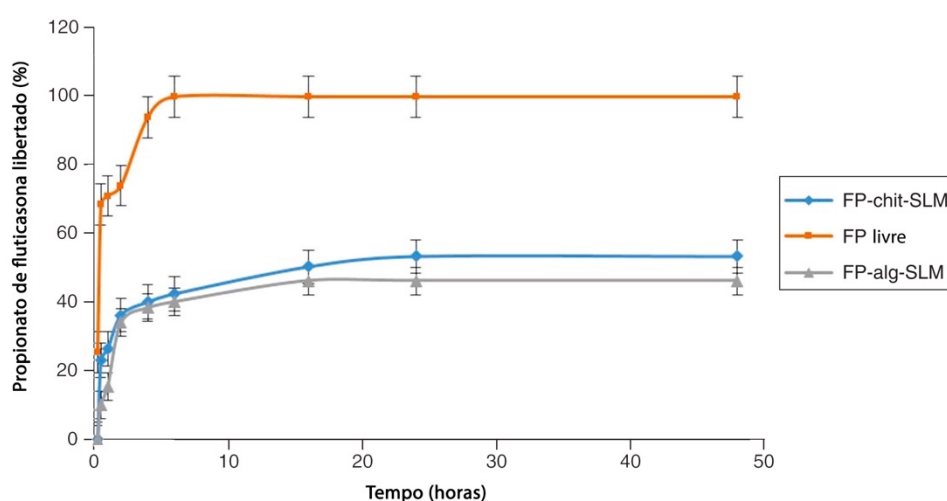


Figura 8.11 – Dissolução do propionato de fluticasona e perfis de libertação deste fármaco em tampão PBS com SDS a partir das chit-SLM e das alg-SLM (FP-chit-SLM e FP-alg-SLM, respetivamente) ao longo de 48 h. Adaptado de (148).

As micropartículas foram testadas relativamente a parâmetros de toxicidade em células 16HBE14o- (epitélio bronquial humano), tendo sido bem toleradas em concentrações até 10^{-6} M de fármaco encapsulado (148).

O potencial para administração pulmonar por nebulização foi testado e a deposição *in vitro* das micropartículas determinada. Apenas 18% e 44% da massa total das chit-SLMs e alg-SLMs (com FP), respetivamente, foi efetivamente aerossolizada, o que pode dever-se ao facto das SLMs se terem agregado em partículas de maiores dimensões durante a nebulização, reduzindo, assim, a eficácia de aerossolização. No entanto, a formulação de alg-SLMs apresentou uma FPF elevada, de 90%, que parece ser indicativa de uma deposição eficaz do fármaco nos estadios representativos das regiões mais profundas do pulmão, suportando assim uma possível aplicação no tratamento da DPOC (148).

◆ Formulação de roflumilaste para administração pulmonar

O roflumilaste é um fármaco utilizado na DPOC que é administrado por via oral, mas cujo impacto clínico se encontra limitado devido aos efeitos adversos associados ao seu mecanismo de ação, nomeadamente a nível gastrointestinal e também relacionados com perda de peso. Assim, a via de administração pulmonar poderia constituir uma boa alternativa para melhorar o índice terapêutico e minimizar os efeitos associados à administração deste fármaco. Foi com este intuito que Suzuki *et al.* tentaram desenvolver uma nova formulação de pós secos de roflumilaste, utilizando hidroxipropil- β -ciclodextrina como excipiente/transportador, e a técnica de secagem por atomização como método de produção. Foram testados diferentes solventes e condições de processamento. A utilização de etanol levou à produção de partículas enrugadas, morfologia tipicamente associada a melhoria do desempenho da aerossolização e redução da adesão entre sólidos. A utilização simultânea de metanol e acetato de butilo, numa proporção de 80:20, conduziu à obtenção de partículas porosas e de forma irregular. A porosidade contribui positivamente para as propriedades de aerossolização dos pós, visto que as forças atrativas entre partículas são menores e as características de fluxo são melhores. Apesar de, em termos de morfologia, ambos os solventes terem produzido partículas com potencial para uma melhor eficácia de administração no pulmão, considera-se que o etanol é uma alternativa mais segura do que o metanol/acetato de butilo, pelo facto de ser considerado menos tóxico e com um menor risco para a saúde humana. Adicionalmente, as formulações com etanol mostraram características promissoras para uma estabilidade a longo termo. A avaliação da deposição *in vitro* indicou ausência de efeito do solvente, tendo-se observado genericamente FPF acima dos 50%. Este resultado é favorável em comparação com as formulações convencionais que têm a lactose como transportador, que apresentam valores de aproximadamente 30%. Os perfis de deposição *in vitro* demonstram o potencial destas formulações para se distribuírem ao longo das vias respiratórias inferiores, onde se podem encontrar as enzimas PDE4 no músculo liso, que são o alvo terapêutico do roflumilaste (149).

A preparação de formulações de roflumilaste para administração pulmonar poderá ser uma nova estratégia para melhorar os resultados terapêuticos e reduzir a incidência de efeitos adversos deste fármaco. Estudos de permeabilidade *in vitro* mostraram que estas formulações poderão, de facto, vir a ser aplicadas para administração pulmonar, mas serão

necessários estudos *in vivo* em modelos animais para se avaliar e melhorar o desempenho das mesmas (149).

◆ Tecnologia de co-suspensão nos MDIs

Apesar dos MDIs serem amplamente usados como dispositivos para a administração de fármacos a nível pulmonar, existem ainda vários desafios na sua utilização que podem afetar a preparação de fármacos a serem administrados por este tipo de inalador. Para tentar colmatar estas dificuldades, surgiu uma nova tecnologia inovadora que, para além de permitir a administração de vários fármacos através de um único MDI, também ajuda a superar alguns dos seus obstáculos: a tecnologia de co-suspensão (150). Neste tipo de formulação, são utilizadas partículas porosas de fosfolípidos de baixa densidade num propulsor de hidrofluoroalcano (HFA) para suspender os cristais micronizados de fármaco de forma uniforme, como ilustrado na figura 8.12 (150–152).

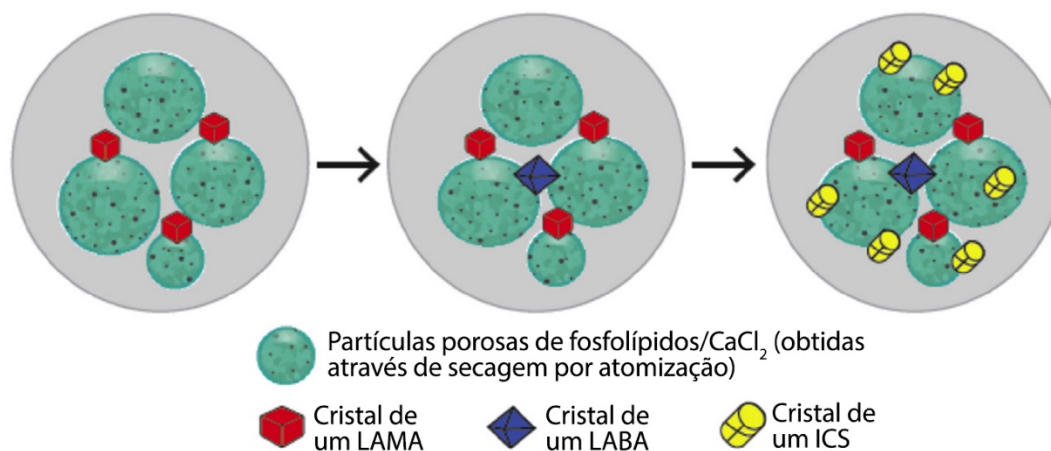


Figura 8.12 – Representação esquemática de micropartículas de fosfolípidos a interagirem com os cristais micronizados de fármacos, enquanto suspensas numa gotícula de propulsor. Adaptado de (150).

Doty *et al.* tentaram demonstrar que as formulações em suspensão para MDIs podiam ser melhoradas para superar a variabilidade na dose administrada, principalmente nos casos em que a variabilidade resulta de erros de manuseamento por parte dos doentes. Para tal, realizaram várias experiências utilizando um inalador pressurizado com válvula doseadora de glicopirrolato com fumarato de formoterol (MDI GFF), que é um MDI no qual foi utilizada a tecnologia de co-suspensão para obter uma combinação de dose fixa de glicopirrolato (GP) e fumarato de formoterol (FF) (151). Foi verificado que a

combinação dos dois fármacos numa dose fixa não alterava o desempenho do aerossol, o mesmo se observando quanto à utilização de fluxos inspiratórios diferentes. De facto, um dos erros mais comuns neste tipo de dispositivo é realizar a inalação a um fluxo inspiratório incorreto, sendo que os MDIs requerem uma inalação lenta e profunda. Foi ainda avaliado o impacto de outro erro bastante comum, que consiste na agitação desadequada do MDI antes da inalação. Testaram-se três manobras de agitação diferentes: 1) a agitação padrão, que consiste em 15 agitações ao longo de 5 segundos; 2) uma agitação suave, que consistiu em 5 agitações durante 5 segundos; 3) uma inversão única, para simular o ato de pegar no dispositivo em repouso, sem qualquer agitação. Os resultados (figura 8.13) indicam que, ao contrário dos MDIs que continham unicamente os cristais de fármaco, quando as manobras de agitação suave e inversão única foram aplicadas ao MDI GFF, este dispositivo continuou a ser capaz de administrar uma dose consistente, dentro de 25% da dose alvo produzida pela agitação padrão, à exceção de um único resultado (151).

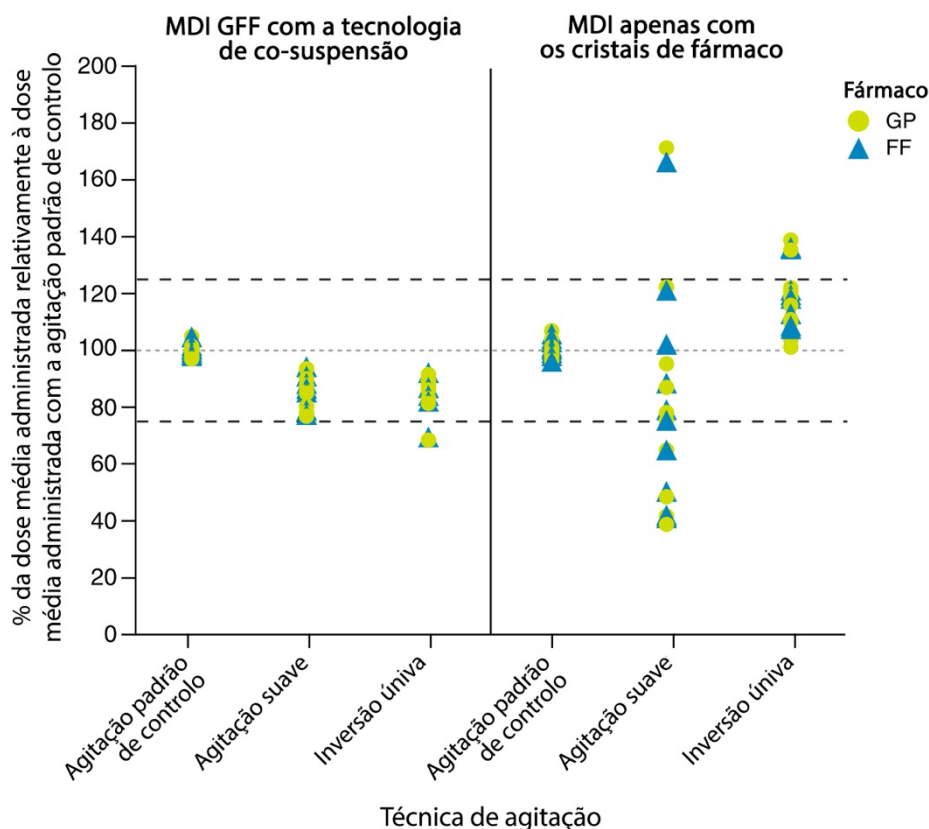


Figura 8.13 – Percentagens das doses administradas consoante as diferentes técnicas de agitação aplicadas ao MDI GFF com a tecnologia de co-suspensão e aos MDIs que continham apenas os cristais de fármaco. Adaptado de (151).

Num cenário ideal, a dose de fármaco seria administrada o mais rápido possível após a agitação do MDI. No entanto, isto nem sempre acontece, podendo ocorrer atrasos entre a agitação e a ativação do dispositivo, que podem levar a que a dose efetivamente administrada seja superior ou inferior àquela pretendida. Tendo isto em conta, os investigadores também avaliaram este cenário, de modo a caracterizar as doses administradas pelos diferentes MDIs de acordo com tempos de atraso entre a agitação e a ativação do dispositivo diferentes. Assim, verificou-se que mesmo com um atraso de 60 segundos, a dose administrada pelo MDI GFF permaneceu dentro dos 10% da dose de controlo (que é a dose administrada aos 0 segundos), tanto para o GP como para o FF. Já os MDIs que continham estes fármacos isoladamente mostraram uma maior variabilidade e divergência das doses de controlo. A figura 8.14 ilustra os resultados observados (151).

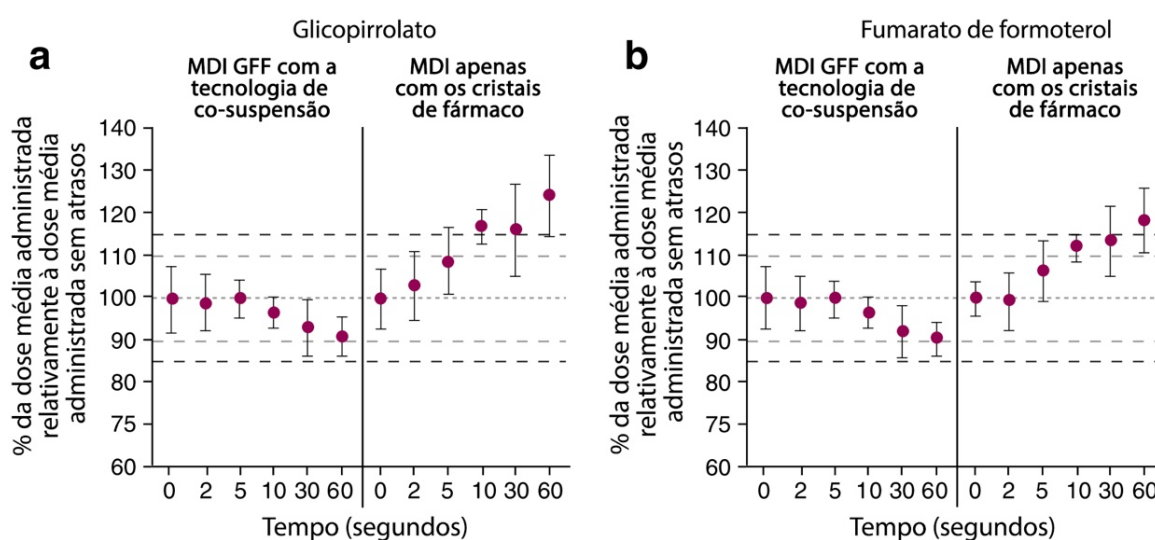


Figura 8.14 – Percentagens das doses administradas de glicopirrolato e fumarato de formoterol de acordo com os diferentes tempos de atraso e os MDIs utilizados. Adaptado de (151).

Todos os resultados acima descritos demonstram que a tecnologia de co-suspensão permite produzir formulações em suspensão estáveis, uniformes e facilmente dispersas, possibilitando também a combinação de dois ou mais fármacos num só MDI. Mesmo quando o MDI GFF foi submetido a diferentes condições de agitação e tempos de atraso, mostrou ser capaz de administrar doses consistentes, sem ser suscetível a grandes variabilidades (151).

Vários outros estudos corroboraram estas observações, incluindo ensaios clínicos de fase III (PINNACLE-1 e PINNACLE-2; 24 semanas de ensaio). Nestes, os

investigadores estudaram a eficácia e segurança do MDI GFF comparativamente a MDIs com os fármacos isolados e placebo, em doentes com DPOC moderada a severa, tendo sido demonstrado que o MDI GFF com a nova tecnologia de co-suspensão conferia um maior benefício aos doentes em estudo do que os outros dispositivos utilizados para comparação (152). Estes resultados foram ainda fundamentados a longo termo no ensaio PINNACLE-3, que estendeu o tempo de estudo até às 52 semanas (153).

Além das várias vantagens já referidas, a tecnologia de co-suspensão não necessita de excipientes adicionais, como os co-solventes, dado que as partículas porosas automaticamente formam suspensões fisicamente estáveis e facilmente dispersas em propulsores HFA. Adicionalmente, quando se combinam fármacos numa mesma formulação, esta tecnologia permite reduzir o potencial de interações fármaco-fármaco enquanto mantém a uniformidade da suspensão, a estabilidade físico-química e uma administração de dose consistente (150–152). Na realidade, o MDI GFF já foi aprovado para comercialização nos Estados Unidos da América em 2016 (150,154). As investigações mais recentes mostram que poderá ser possível combinar um LAMA, um LABA e um ICS num só MDI, o que, comparativamente à utilização de dois ou três inaladores separadamente, poderá ser bastante benéfico e consideravelmente mais prático para os doentes com DPOC (150).

9. Conclusão

A DPOC pode ser incapacitante, principalmente em indivíduos em que o tratamento não surte o efeito desejado. Apesar de existirem várias terapêuticas disponíveis, os valores de prevalência e mortalidade mostram que esta doença continua a ter uma carga elevada a nível mundial, e que as opções terapêuticas e formulações atualmente existentes nem sempre são capazes de controlar a doença adequadamente.

O estudo de novas alternativas terapêuticas e estratégias de formulação torna-se de extrema importância neste contexto, uma vez que estas poderão surtir melhores resultados terapêuticos e, conseqüentemente, providenciar um aumento da qualidade de vida nestes doentes. Assim, o investimento na investigação de diferentes estratégias de formulação com base na nanotecnologia, nas terapêuticas de RNA, nas co-suspensões, entre outras, é crucial, não só pelas inúmeras oportunidades que estas novas ferramentas podem oferecer, mas também para encontrar formas de ultrapassar os desafios que cada estratégia inevitavelmente apresenta.

Todos os estudos analisados mostraram resultados promissores, que apontam para uma boa administração pulmonar e potencial otimização dos resultados terapêuticos. As nanopartículas aparentam ser propícias para o transporte e deposição de fármacos a nível pulmonar, apresentando vantagens como a alta estabilidade e a libertação prolongada da substância ativa, que permite intervalos de administração mais longos e, possivelmente, uma maior adesão à terapêutica. Já as terapêuticas de RNA precisam de ser mais investigadas, especialmente no que diz respeito às formulações a utilizar para garantir que estas macromoléculas sejam eficazmente administradas para o tratamento da DPOC, já que aparentam ser capazes de modificar o percurso da doença.

De um modo geral, são necessários muitos mais estudos focados nestes novos sistemas, para que se consiga estudar melhor as propriedades das formulações desenvolvidas e testar o seu desempenho para administração pulmonar. Só assim poderão aplicar estas novas estratégias em formulações futuras, que possam ser administradas a seres humanos e, eventualmente, alcançar os resultados terapêuticos desejados.

10. Referências bibliográficas

1. Liu J, Ran Z, Wang F, Xin C, Xiong B, Song Z. Role of pulmonary microorganisms in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Crit Rev Microbiol*. 2021;47(1):1–12.
2. Lin S, Ma Z, Huang Y, Sun Y, Yi H. Chronic obstructive pulmonary disease is characterized by reduced levels and defective suppressive function of regulatory B cells in peripheral blood. *Mol Immunol*. 2022;141:87–93.
3. Ramakrishnan S, Bafadhel M, Russell R. Chronic obstructive pulmonary disease: management of chronic disease. *Medicine (Baltimore)*. 2020;48(5):333–6.
4. Han MLK, Martinez FJ. Host, gender, and early-life factors as risks for chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2020;41(3):329–37.
5. Agustí A, Vogelmeier C, Faner R. COPD 2020: changes and challenges. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2020;319(5):L879–83.
6. World Health Organization. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [Internet]. 2021 [citado 16 de Dezembro de 2021]. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))
7. Barnes PJ. Small airway fibrosis in COPD. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019;116:1–5.
8. Onoue S, Misaka S, Kawabata Y, Yamada S. New treatments for chronic obstructive pulmonary disease and viable formulation/device options for inhalation therapy. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009;6(8):793–811.
9. Mei D, Tan WSD, Tay Y, Mukhopadhyay A, Wong WSF. Therapeutic RNA strategies for chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2020;41(7):475–86.
10. Thakur AK, Chellappan DK, Dua K, Mehta M, Satija S, Singh I. Patented therapeutic drug delivery strategies for targeting pulmonary diseases. *Expert Opin Ther Pat*. 2020;30(5):375–87.
11. Seeley R, Stephens T, Tate P. Respiratory system. Em: Connely J, Loewenberg K, editores. *Anatomy & Physiology*. 8th ed. McGraw-Hill Companies Inc.; 2008. p. 825–72.
12. VanPutte C, Regan J, Russo A. Respiratory system. Em: Seeley's *Anatomy & Physiology*. 11th ed. McGraw-Hill Education; 2017. p. 822–68.
13. Marieb E. The respiratory system. Em: Beauparlant S, Suchomel B, Cutt S, Early M, Williams A, editores. *Essentials of Human Anatomy & Physiology*. 11th ed. Pearson Education, Inc.; 2015. p. 436–62.
14. Tortora G, Derrickson B. The respiratory system. Em: Guarascio M, Rama L, Myers L, editores. *Principles of Anatomy & Physiology*. 15th ed. John Wiley & Sons, Inc; 2017. p. 850–97.
15. Saladin K, Gan C, Cushman H. The respiratory system. Em: *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function*. 9th ed. McGraw-Hill Education; 2021. p. 825–65.

16. Waugh A, Grant A. The respiratory system. Em: Ross & Wilson: Anatomy and Physiology in Health and Illness. 13th ed. Elsevier Ltd.; 2018. p. 261–96.
17. Dong J, Li J, Tian L, Tu J. Transport and deposition of ultrafine particles in the upper tracheobronchial tree: a comparative study between approximate and realistic respiratory tract models. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2021;24(10):1125–35.
18. Aung HH, Sivakumar A, Gholami SK, Venkateswaran SP, Gorain B, Shadab. An overview of the anatomy and physiology of the lung. Em: *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer.* Elsevier Inc.; 2019. p. 1–20.
19. Mack SM, Wu C-W, Zhang C, Richard Harding, Pinkerton KE. Lung anatomy and aging. Em: *Encyclopedia of Respiratory Medicine.* 2nd ed. Elsevier Inc.; 2022. p. 64–72.
20. Yaqub N, Wayne G, Birchall M, Song W. Recent advances in human respiratory epithelium models for drug discovery. *Biotechnol Adv.* 2022;54:1–23.
21. Sainz de Aja J, Dost AFM, Kim CF. Alveolar progenitor cells and the origin of lung cancer. *J Intern Med.* 2021;289(5):629–35.
22. Xi J, Talaat M, Si XA, Han P, Dong H, Zheng S. Alveolar size effects on nanoparticle deposition in rhythmically expanding-contracting terminal alveolar models. *Comput Biol Med.* 2020;121:1–17.
23. Verma R, Ibrahim M, Garcia-Contreras L. Lung anatomy and physiology and their implications for pulmonary drug delivery. Em: Nokhodchi A, Martin GP, editores. *Pulmonary Drug Delivery: Advances and Challenges.* 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 1–18.
24. Nho R. Pathological effects of nano-sized particles on the respiratory system. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2020;29:1–16.
25. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2021.
26. Young AL, Bragman FJS, Rangelov B, Han MK, Galbán CJ, Lynch DA, et al. Disease progression modeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;201(3):294–302.
27. Jung T, Vij N. Early diagnosis and real-time monitoring of regional lung function changes to prevent chronic obstructive pulmonary disease progression to severe emphysema. *J Clin Med.* 2021;10(24):1–18.
28. Ierodiakonou D, Theodorou E, Sifaki-Pistolla D, Bouloukaki I, Antonopoulou M, Poulorinakis I, et al. Clinical characteristics and outcomes of polypharmacy in chronic obstructive pulmonary disease patients: a cross-sectional study from Crete, Greece. *Clin Respir J.* 2021;15(12):1310–9.
29. Sato R, Hasegawa D, Nishida K, Takahashi K, Schleicher M, Chaisson N. Prevalence of pulmonary embolism in patients with acute exacerbations of COPD: a systematic review and meta-analysis. *Am J Emerg Med.* 2021;50:606–17.
30. Al-Moamary MS, Köktürk N, Idrees MM, Şen E, Juvelekian G, Saleh WA, et al. Unmet need in the management of chronic obstructive pulmonary disease in the Middle East and Africa region: an expert panel consensus. *Respir Med.*

- 2021;189:1–12.
31. Lan X, Lu X, Yi B, Chen X, Jin S. Factors associated with self-management behaviors of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Japan J Nurs Sci*. 2022;19(1):1–10.
 32. Yao H-M, Xiao R-S, Cao P-L, Wang X-L, Zuo W, Zhang W. Risk factors for depression in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *World J Psychiatry*. 2020;10(4):59–70.
 33. López-Campos JL, Tan W, Soriano JB. Global burden of COPD. *Respirology*. 2016;21(1):14–23.
 34. Ehteshami-Afshar S, FitzGerald JM, Doyle-Waters MM, Sadatsafavi M. The global economic burden of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20(1):11–23.
 35. Quaderi SA, Hurst JR. The unmet global burden of COPD. *Glob Heal Epidemiol Genomics*. 2018;3:1–3.
 36. Ruvuna L, Sood A. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2020;41(3):315–27.
 37. Soriano JB, Abajobir AA, Abate KH, Abera SF, Agrawal A, Ahmed MB, et al. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet Respir Med*. 2017;5(9):691–706.
 38. Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papan A, Theodoratou E, et al. Global and regional estimates of COPD prevalence: systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015;5(2):1–17.
 39. Varmaghani M, Dehghani M, Heidari E, Sharifi F, Moghaddam SS, Farzadfar F. Global prevalence of chronic obstructive pulmonary disease: systematic review and meta-analysis. *East Mediterr Heal J*. 2019;25(1):47–57.
 40. Soriano JB, Kendrick PJ, Paulson KR, Gupta V, Abrams EM, Adedoyin RA, et al. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet Respir Med*. 2020;8(6):585–96.
 41. World Health Organization. The top 10 causes of death [Internet]. 2020 [citado 17 de Dezembro de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
 42. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3(11):2011–30.
 43. Bárbara C, Rodrigues F, Dias H, Cardoso J, Almeida J, Matos MJ, et al. Chronic obstructive pulmonary disease prevalence in Lisbon, Portugal: the burden of obstructive lung disease study. *Rev Port Pneumol*. 2013;19(3):96–105.
 44. Serviço Nacional de Saúde. Dia mundial da DPOC [Internet]. 2021 [citado 17 de Dezembro de 2021]. Disponível em: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2021/11/17/dia-mundial-da-dpoc-2/>
 45. Fundação Portuguesa do Pulmão. Relatório do Observatório Nacional das Doenças Respiratórias. 2020.

46. Duan P, Wang Y, Lin R, Zeng Y, Chen C, Yang L, et al. Impact of early life exposures on COPD in adulthood: a systematic review and meta-analysis. *Respirology*. 2021;26(12):1131–51.
47. Chen Z, Fu Q, Mao G, Wu L, Xu P, Xu D, et al. Increasing mortality caused by chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in relation with exposure to ambient fine particulate matters: an analysis in Southeastern China. *Environ Sci Pollut Res*. 2021;28(38):53605–13.
48. Chen H, Liu X, Gao X, Lv Y, Zhou L, Shi J, et al. Epidemiological evidence relating risk factors to chronic obstructive pulmonary disease in China: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021;16(12):1–15.
49. Mammen JR, Lee JE. Understanding the genetics of chronic obstructive pulmonary disease, α 1-antitrypsin deficiency, and implications for clinical practice. *J Am Assoc Nurse Pract*. 2021;33(8):576–9.
50. Sakornsakolpat P, Prokopenko D, Lamontagne M, Reeve NF, Guyatt AL, Jackson VE, et al. Genetic landscape of chronic obstructive pulmonary disease identifies heterogeneous cell-type and phenotype associations. *Nat Genet*. 2019;51(3):494–505.
51. Moll M, Sakornsakolpat P, Shrine N, Hobbs BD, DeMeo DL, John C, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and related phenotypes: polygenic risk scores in population-based and case-control cohorts. *Lancet Respir Med*. 2020;8(7):696–708.
52. Oelsner EC, Ortega VE, Smith BM, Nguyen JN, Manichaikul AW, Hoffman EA, et al. A genetic risk score associated with chronic obstructive pulmonary disease susceptibility and lung structure on computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(6):721–31.
53. Ragland MF, Benway CJ, Lutz SM, Bowler RP, Hecker J, Hokanson JE, et al. Genetic advances in chronic obstructive pulmonary disease insights from COPDGene. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(6):677–90.
54. Busch R, Hobbs BD, Zhou J, Castaldi PJ, McGeachie MJ, Hardin ME, et al. Genetic association and risk scores in a chronic obstructive pulmonary disease meta-analysis of 16,707 subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;57(1):35–46.
55. Strange C. Alpha-1 antitrypsin deficiency associated COPD. *Clin Chest Med*. 2020;41(3):339–45.
56. Strnad P, McElvaney N, Lomas D. Alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med*. 2020;382(15):1443–55.
57. Lackey L, Coria A, Ghosh AJ, Grayeski P, Hatfield L, Shankar V, et al. Alternative poly-adenylation modulates α 1-antitrypsin expression in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Genet*. 2021;17(11):1–24.
58. Agustí A, Hogg JC. Update on the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2019;381(13):1248–56.
59. Lange P, Celli B, Agustí A, Boje Jensen G, Divo M, Faner R, et al. Lung-function trajectories leading to chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2015;373(2):111–22.
60. Agustí A, Faner R. Lung function trajectories in health and disease. *Lancet Respir*

- Med. 2019;7(4):358–64.
61. Bui DS, Burgess JA, Lowe AJ, Perret JL, Lodge CJ, Bui M, et al. Childhood lung function predicts adult chronic obstructive pulmonary disease and asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(1):39–46.
 62. Skloot GS. The effects of aging on lung structure and function. *Clin Geriatr Med.* 2017;33(4):447–57.
 63. Amaral AFS, Strachan DP, Burney PGJ, Jarvis DL. Female smokers are at greater risk of airflow obstruction than male smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(9):1226–35.
 64. Han MK. Chronic obstructive pulmonary disease in women: a biologically focused review with a systematic search strategy. *Int J COPD.* 2020;15:711–21.
 65. Polverino M, Capuozzo A, Cicchitto G, Ferrigno F, Mauro I, Santoriello C, et al. Smoking pattern in men and women: a possible contributor to sex differences in smoke-related lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;202(7):1048–51.
 66. Safitri W, Martini S, Artanti KD, Li CY. Smoking from a younger age is the dominant factor in the incidence of chronic obstructive pulmonary disease: case-control study. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(11):1–8.
 67. Reddy AT, Lakshmi SP, Banno A, Jadhav SK, Kadamberi IP, Kim SC, et al. Cigarette smoke downregulates Nur77 to exacerbate inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *PLoS One.* 2020;15(2):1–14.
 68. Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, Feleszko W. Tobacco smoke induces and alters immune responses in the lung triggering inflammation, allergy, asthma and other lung diseases: a mechanistic review. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(5):1–35.
 69. Allinson JP, Hardy R, Donaldson GC, Shaheen SO, Kuh D, Wedzicha JA. Combined impact of smoking and early-life exposures on adult lung function trajectories. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(8):1021–30.
 70. Fu Z, Jiang H, Xu Z, Li H, Wu N, Yin P. Objective secondhand smoke exposure in chronic obstructive pulmonary disease patients without active smoking: the U.S. national health and nutrition examination survey (NHANES) 2007–2012. *Ann Transl Med.* 2020;8(7):1–12.
 71. Duan RR, Hao K, Yang T. Air pollution and chronic obstructive pulmonary disease. *Chronic Dis Transl Med.* 2020;6(4):260–9.
 72. Tian F, Qi J, Wang L, Yin P, Qian Z (Min), Ruan Z, et al. Differentiating the effects of ambient fine and coarse particles on mortality from cardiopulmonary diseases: a nationwide multicity study. *Environ Int.* 2020;145:1–9.
 73. Zhou T, Hu Y, Wang Y, Sun C, Zhong Y, Liao J, et al. Fine particulate matter (PM_{2.5}) aggravates apoptosis of cigarette-inflamed bronchial epithelium in vivo and vitro. *Environ Pollut.* 2019;248:1–9.
 74. Grahn K, Gustavsson P, Andersson T, Lindén A, Hemmingsson T, Selander J, et al. Occupational exposure to particles and increased risk of developing chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a population-based cohort study in Stockholm, Sweden. *Environ Res.* 2021;200:1–9.

75. Peng C, Yan Y, Li Z, Jiang Y, Cai Y. Chronic obstructive pulmonary disease caused by inhalation of dust: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(34):1–7.
76. Leap J, Arshad O, Cheema T, Balaan M. Pathophysiology of COPD. *Crit Care Nurs Q*. 2021;44(1):2–8.
77. Rodrigues S de O, Cunha CMC, Soares GMV, Silva PL, Silva AR, Gonçalves-De-albuquerque CF. Mechanisms, pathophysiology and currently proposed treatments of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmaceuticals*. 2021;14(10):1–32.
78. Barnes PJ. Pulmonary pharmacology. Em: Brunton L, Chabner B, Knollmann B, editores. *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed. McGraw-Hill Companies Inc.; 2011. p. 1031–66.
79. Alfahad AJ, Alzaydi MM, Aldossary AM, Alshehri AA, Almughem FA, Zaidan NM, et al. Current views in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis and management. *Saudi Pharm J*. 2021;29(12):1361–73.
80. Jenkins BA, Athilingam P, Jenkins RA. Symptom clusters in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Appl Nurs Res*. 2019;45:23–9.
81. Melhem O, Savage E, Al Hmairat N, Lehane E, Fattah HA. Symptom burden and functional performance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Appl Nurs Res*. 2021;62:1–9.
82. Karanikas I, Karayiannis D, Karachaliou A, Papanikolaou A, Chourdakis M, Kakavas S. Body composition parameters and functional status test in predicting future acute exacerbation risk among hospitalized patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Nutr*. 2021;40(11):5605–14.
83. Ritchie AI, Wedzicha JA. Definition, causes, pathogenesis, and consequences of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Clin Chest Med*. 2020;41(3):421–38.
84. MacLeod M, Papi A, Contoli M, Beghé B, Celli BR, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease exacerbation fundamentals: diagnosis, treatment, prevention and disease impact. *Respirology*. 2021;26(6):532–51.
85. Gunasekaran K, Ahmad M, Rehman S, Thilagar B, Gopalratnam K, Ramalingam S, et al. Impact of a positive viral polymerase chain reaction on outcomes of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exacerbations. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(21):1–9.
86. American Lung Association. Spirometry [Internet]. 2020 [citado 14 de Março de 2022]. Disponível em: <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-procedures-and-tests/spirometry>
87. Direção-Geral da Saúde. Diagnóstico e tratamento da doença pulmonar obstrutiva crónica no adulto. Norma 005/2019 2019 p. 1–18.
88. Spirometry procedure: how to prepare, side effects, and risks [Internet]. 2021 [citado 14 de Março de 2022]. Disponível em: <https://www.healthline.com/health/spirometry?c=337632128609>
89. Smith LJ. The lower limit of normal versus a fixed ratio to assess airflow limitation: will the debate ever end? *Eur Respir J*. 2018;51(3):1–3.
90. Vogelmeier CF, Román-Rodríguez M, Singh D, Han MLK, Rodríguez-Roisin R,

- Ferguson GT. Goals of COPD treatment: focus on symptoms and exacerbations. *Respir Med*. 2020;166:1–7.
91. Singh D. Pharmacological treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2021;26(7):643–51.
 92. Cabrera C, Quélen C, Ouwens M, Hedman K, Rigney U, Quint JK. Evaluating a Cox marginal structural model to assess the comparative effectiveness of inhaled corticosteroids versus no inhaled corticosteroid treatment in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Epidemiol*. 2022;67:19–28.
 93. Mathioudakis AG, Vestbo J, Singh D. Long-acting bronchodilators for chronic obstructive pulmonary disease: which one(s), how, and when? *Clin Chest Med*. 2020;41(3):463–74.
 94. Singh D. New combination bronchodilators for chronic obstructive pulmonary disease: current evidence and future perspectives. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;79(5):695–708.
 95. Hudd T, Zaiken K. Chronic obstructive pulmonary disease. Em: Hauber M, Vosburgh A, editores. *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*. 11th ed. Wolters Kluwer; 2018.
 96. Melani AS. Long-acting muscarinic antagonists. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2015;8(4):479–501.
 97. Kaplan AG. Inhaled corticosteroid treatment in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): boon or bane? *J Am Board Fam Med*. 2020;33(2):289–302.
 98. Bafadhel M, Peterson S, De Blas MA, Calverley PM, Rennard SI, Richter K, et al. Predictors of exacerbation risk and response to budesonide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a post-hoc analysis of three randomised trials. *Lancet Respir Med*. 2018;6(2):117–26.
 99. Lee JK, Rhee CK, Kim K, Ra SW, Lee JH, Jung KS, et al. Prescription status and clinical outcomes of methylxanthines and leukotriene receptor antagonists in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Int J COPD*. 2019;14:2639–47.
 100. Zhan Z, Ma Y, Huang K, Liang C, Mao X, Zhang Y, et al. Methylxanthine treatment in patients hospitalized for acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in China: a real-world study using propensity score matching analysis. *Front Pharmacol*. 2022;13:1–11.
 101. Devereux G, Cotton S, Fielding S, McMeekin N, Barnes PJ, Briggs A, et al. Effect of theophylline as adjunct to inhaled corticosteroids on exacerbations in patients with COPD: a randomized clinical trial. *JAMA J Am Med Assoc*. 2018;320(15):1548–59.
 102. Dal Negro RW, Wedzicha JA, Iversen M, Fontana G, Page C, Cicero AF, et al. Effect of erdosteine on the rate and duration of COPD exacerbations: the RESTORE study. *Eur Respir J*. 2017;50(4):1–10.
 103. Rogliani P, Matera MG, Page C, Puxeddu E, Cazzola M, Calzetta L. Efficacy and safety profile of mucolytic/antioxidant agents in chronic obstructive pulmonary disease: a comparative analysis across erdosteine, carbocysteine, and N-acetylcysteine. *Respir Res*. 2019;20(1):1–11.

104. Watz H, Bagul N, Rabe KF, Rennard S, Alagappan VKT, Román J, et al. Use of a 4-week up-titration regimen of roflumilast in patients with severe COPD. *Int J COPD*. 2018;13:813–22.
105. Jin X, Song L, Ma C-C, Zhang Y-C, Yu S. Pulmonary route of administration is instrumental in developing therapeutic interventions against respiratory diseases. *Saudi Pharm J*. 2020;28(12):1655–65.
106. Guo Y, Bera H, Shi C, Zhang L, Cun D, Yang M. Pharmaceutical strategies to extend pulmonary exposure of inhaled medicines. *Acta Pharm Sin B*. 2021;11(8):2565–84.
107. Ahookhosh K, Saidi M, Aminfar H, Mohammadpourfard M, Hamishehkar H, Yaqoubi S. Dry powder inhaler aerosol deposition in a model of tracheobronchial airways: validating CFD predictions with in vitro data. *Int J Pharm*. 2020;587:1–15.
108. Phalen RF, Hoover MD, Oldham MJ, Schmid O, Golshahi L. Anatomical considerations for inhaled aerosol deposition modeling: methods, applications, challenges and opportunities. *J Aerosol Sci*. 2021;156:1–17.
109. Pathak Y, Islam N. *Handbook of lung targeted drug delivery systems: recent trends and clinical evidences*. 1st ed. Taylor & Francis; 2022.
110. Patton JS, Brain JD, Davies LA, Fiegel J, Gumbleton M, Kim KJ, et al. The particle has landed-characterizing the fate of inhaled pharmaceuticals. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2010;23:S71–87.
111. Pleasants RA, Hess DR. *Aerosol delivery devices for obstructive lung diseases*. *Respir Care*. 2018;63(6):708–33.
112. Cazzola M, Cavalli F, Usmani OS, Rogliani P. Advances in pulmonary drug delivery devices for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Drug Deliv*. 2020;17(5):635–46.
113. Xu Y, Liu H, Song L. Novel drug delivery systems targeting oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a review. *J Nanobiotechnology*. 2020;18:1–25.
114. Sim S, Wong NK. Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (review). *Biomed Reports*. 2021;14(5):1–9.
115. Sindhvani S, Chan WCW. Nanotechnology for modern medicine: next step towards clinical translation. *J Intern Med*. 2021;290(3):486–98.
116. Food and Drug Administration. *Considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology: guidance for industry*. 2014.
117. Wadhwa R, Aggarwal T, Thapliyal N, Chellappan DK, Gupta G, Gulati M, et al. Nanoparticle-based drug delivery for chronic obstructive pulmonary disorder and asthma: progress and challenges. *Em: Nanotechnology in Modern Animal Biotechnology: Concepts and Applications*. Elsevier Inc.; 2019. p. 59–73.
118. Ibarra-Sánchez LÁ, Gámez-Méndez A, Martínez-Ruiz M, Nájera-Martínez EF, Morales-Flores BA, Melchor-Martínez EM, et al. Nanostructures for drug delivery in respiratory diseases therapeutics: revision of current trends and its comparative analysis. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2022;70:1–21.
119. Pramanik S, Mohanto S, Manne R, Rajendran RR, Deepak A, Edapully SJ, et al.

- Nanoparticle-based drug delivery system: the magic bullet for the treatment of chronic pulmonary diseases. *Mol Pharm.* 2021;18(10):3671–718.
120. Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, Wang L, Li C, Fu T, et al. Nanotechnology in therapeutics : a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine.* 2012;7(8):1253–71.
 121. Saxena J, Bisen M, Misra A, Srivastava VK, Kaushik S, Siddiqui AJ, et al. Targeting COPD with PLGA-based nanoparticles: current status and prospects. *Biomed Res Int.* 2022;2022:1–13.
 122. Suffredini G, East JE, Levy LM. New applications of nanotechnology for neuroimaging. *Am J Neuroradiol.* 2014;35(7):1246–53.
 123. Buhecha MD, Lansley AB, Somavarapu S, Pannala AS. Development and characterization of PLA nanoparticles for pulmonary drug delivery: co-encapsulation of theophylline and budesonide, a hydrophilic and lipophilic drug. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019;53:1–13.
 124. Mohamed A, Kunda NK, Ross K, Hutcheon GA, Saleem IY. Polymeric nanoparticles for the delivery of miRNA to treat chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur J Pharm Biopharm.* 2019;136:1–8.
 125. Anderson CF, Grimmett ME, Domalewski CJ, Cui H. Inhalable nanotherapeutics to improve treatment efficacy for common lung diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2020;12(1):1–29.
 126. Hussain MS, Sharma P, Dhanjal DS, Khurana N, Vyas M, Sharma N, et al. Nanotechnology based advanced therapeutic strategies for targeting interleukins in chronic respiratory diseases. *Chem Biol Interact.* 2021;348:1–12.
 127. Neumann K, Lilienkamp A, Bradley M. Responsive polymeric nanoparticles for controlled drug delivery. *Polym Int.* 2017;66(12):1756–64.
 128. Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv.* 2011;2011:1–14.
 129. De Leo V, Ruscigno S, Trapani A, Di Gioia S, Milano F, Mandracchia D, et al. Preparation of drug-loaded small unilamellar liposomes and evaluation of their potential for the treatment of chronic respiratory diseases. *Int J Pharm.* 2018;545(1–2):378–88.
 130. Passi M, Shahid S, Chockalingam S, Sundar IK, Packirisamy G. Conventional and nanotechnology based approaches to combat chronic obstructive pulmonary disease: implications for chronic airway diseases. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:3803–26.
 131. Wang M, Wang K, Deng G, Liu X, Wu X, Hu H, et al. Mitochondria-modulating porous Se@SiO₂ nanoparticles provide resistance to oxidative injury in airway epithelial cells: implications for acute lung injury. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:2287–302.
 132. Geiser M, Quaile O, Wenk A, Wigge C, Eigeldinger-Berthou S, Hirn S, et al. Cellular uptake and localization of inhaled gold nanoparticles in lungs of mice with chronic obstructive pulmonary disease. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10(19):1–10.
 133. Luo MX, Hua S, Shang QY. Application of nanotechnology in drug delivery systems for respiratory diseases (review). *Mol Med Rep.* 2021;23(5):1–17.

134. da Silva AL, Cruz FF, Rocco PRM, Morales MM. New perspectives in nanotherapeutics for chronic respiratory diseases. *Biophys Rev.* 2017;9(5):793–803.
135. Xu Y, Thakur A, Zhang Y, Foged C. Inhaled RNA therapeutics for obstructive airway diseases: recent advances and future prospects. *Pharmaceutics.* 2021;13(2):1–35.
136. Dua K, Wadhwa R, Singhvi G, Rapalli V, Shukla SD, Shastri MD, et al. The potential of siRNA based drug delivery in respiratory disorders: recent advances and progress. *Drug Dev Res.* 2019;80(6):714–30.
137. Chow MYT, Qiu Y, Lam JKW. Inhaled RNA therapy: from promise to reality. *Trends Pharmacol Sci.* 2020;41(10):715–29.
138. Mehta M, Chellappan DK, Wich PR, Hansbro NG, Hansbro PM, Dua K. MiRNA nanotherapeutics: potential and challenges in respiratory disorders. *Future Med Chem.* 2020;12(11):987–90.
139. Maltby S, Plank M, Tay HL, Collison A, Foster PS. Targeting microRNA function in respiratory diseases: mini-review. *Front Physiol.* 2016;7:1–10.
140. Cañas JA, Rodrigo-Muñoz JM, Sastre B, Gil-Martinez M, Redondo N, del Pozo V. MicroRNAs as potential regulators of immune response networks in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Front Immunol.* 2021;11:1–19.
141. Du Y, Ding Y, Chen X, Mei Z, Ding H, Wu Y, et al. MicroRNA-181c inhibits cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease by regulating Ccn1 expression. *Respir Res.* 2017;18(1):1–8.
142. Dang X, Yang L, Guo J, Hu H, Li F, Liu Y, et al. MiR-145-5p is associated with smoke-related chronic obstructive pulmonary disease via targeting KLF5. *Chem Biol Interact.* 2019;300:82–90.
143. Shen W, Liu J, Fan M, Wang S, Zhang Y, Wen L, et al. MiR-3202 protects smokers from chronic obstructive pulmonary disease through inhibiting FAIM2: an in vivo and in vitro study. *Exp Cell Res.* 2018;362(2):370–7.
144. Dong J, Liao W, Tan LH, Yong A, Peh WY, Wong WSF. Gene silencing of receptor-interacting protein 2 protects against cigarette smoke-induced acute lung injury. *Pharmacol Res.* 2019;139:560–8.
145. Wu L, Zhang J, Qu JM, Bai CX, Merrilees MJ. Deposition of insoluble elastin by pulmonary fibroblasts from patients with COPD is increased by treatment with versican siRNA. *Int J COPD.* 2017;12:267–73.
146. Tam A, Hughes M, McNagny KM, Obeidat M, Hackett TL, Leung JM, et al. Hedgehog signaling in the airway epithelium of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep.* 2019;9:1–13.
147. Pulivendala G, Bale S, Godugu C. Inhalation of sustained release microparticles for the targeted treatment of respiratory diseases. *Drug Deliv Transl Res.* 2020;10(2):339–53.
148. Amore E, Ferraro M, Manca ML, Gjomarkaj M, Giammona G, Pace E, et al. Mucoadhesive solid lipid microparticles for controlled release of a corticosteroid in the chronic obstructive pulmonary disease treatment. *Nanomedicine.* 2017;12(19):2287–302.

149. Suzuki ÉY, Amaro MI, de Almeida GS, Cabral LM, Healy AM, de Sousa VP. Development of a new formulation of roflumilast for pulmonary drug delivery to treat inflammatory lung conditions. *Int J Pharm.* 2018;550(1–2):89–99.
150. Ferguson GT, Hickey AJ, Dwivedi S. Co-suspension delivery technology in pressurized metered-dose inhalers for multi-drug dosing in the treatment of respiratory diseases. *Respir Med.* 2018;134:16–23.
151. Doty A, Schroeder J, Vang K, Sommerville M, Taylor M, Flynn B, et al. Drug delivery from an innovative LAMA/LABA co-suspension delivery technology fixed-dose combination MDI: evidence of consistency, robustness, and reliability. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(2):837–44.
152. Martinez FJ, Rabe KF, Ferguson GT, Fabbri LM, Rennard S, Feldman GJ, et al. Efficacy and safety of glycopyrrolate/formoterol metered dose inhaler formulated using co-suspension delivery technology in patients with COPD. *Chest.* 2017;151(2):340–57.
153. Hanania NA, Tashkin DP, Kerwin EM, Donohue JF, Denenberg M, O'Donnell DE, et al. Long-term safety and efficacy of glycopyrrolate/formoterol metered dose inhaler using novel co-suspensionTM delivery technology in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2017;126:105–15.
154. Chen R, Zhong N, Wang HY, Zhao L, Mei X, Qin Z, et al. Efficacy and safety of glycopyrrolate/formoterol fumarate metered dose inhaler (GFF MDI) formulated using co-suspension delivery technology in Chinese patients with COPD. *Int J COPD.* 2020;15:43–56.