

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação de mestrado

**Avaliação do efeito de nanocápsulas contendo meloxicam na dermatite atópica
induzida por 2,4-dinitroclorobenzeno em camundongos**

Douglas Mroginski Weber

Pelotas, 2017

Douglas Mroginski Weber

**Avaliação do efeito de nanocápsulas contendo meloxicam na dermatite atópica
induzida por 2,4-dinitroclorobenzeno em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Ethel Antunes Wilhelm

Coorientadora: Cristiane Luchese

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

W373a Weber, Douglas Mroginski

Avaliação do efeito de nanocápsulas contendo meloxicam na dermatite atópica induzida por 2,4-dinitroclorobenzeno em camundongos. / Douglas Mroginski Weber ; Ethel Antunes Wilhelm, orientador ; Cristiane Luchese, coorientadora. — Pelotas, 2017.

80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Nanopartículas. 2. Meloxicam. 3. 2,4-dinitroclorobenzeno. 4. Anti-inflamatórios não-esteroidais. 5. Pele. I. Wilhelm, Ethel Antunes, orient. II. Luchese, Cristiane, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Douglas Mroginski Weber

Avaliação do efeito de nanocápsulas contendo meloxicam na Dermatite Atópica induzida por 2,4-Dinitroclorobenzeno em camundongos

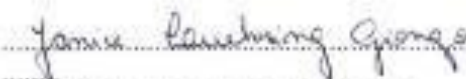
Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 17/03/2017

Banca examinadora:



Profª. Drª. Ethel Antunes Wilhelm (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.



Profª. Drª. Janice Luehring Giongo
Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.



Profª. Drª. Cristiani Folharini Bortolatto
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus irmãos, aos meus familiares, amigos e amigas, que acreditam e sempre acreditaram em mim e no meu trabalho ao laboratório de pesquisa em farmacologia Bioquímica e ao Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção e a Universidade Federal de Pelotas pela possibilidade de realizar o mestrado.

Aos professores e aos colegas do programa de Pós-graduação pela amizade e ensinamento compartilhados.

Aos meus pais, Daise e Mário, por todo amor, apoio e incentivo, não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês já fizeram e ainda fazem por mim. Nunca mediram esforços, muitas vezes abrindo mão de seus sonhos para que os meus fossem realizados. Amo muito vocês!

A minha família, minha irmã e irmão, que mesmo longe sempre estiveram comigo. Obrigado pelo carinho e por sempre acreditarem em mim! Obrigado por compreenderem a minha ausência ... Eu amo vocês!

Ao meu amor Márcia, pelo companheirismo, cumplicidade, amor, incentivo e compreensão, essenciais para a realização desse trabalho. Obrigada por sonhar junto comigo.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ethel A. Wilhelm, minha gratidão pelo tempo dedicado, sugestões e compreensão. Agradeço pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e por ter se colocado à disposição para a realização desse trabalho. Sou grato pelo apoio, paciência, confiança e principalmente por ser esse exemplo de determinação.

Agradeço também a minha coorientadora Cristiane Luchese, pelo apoio e aprendizado e por ter participado dessa trajetória.

Sou grato aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN) que contribuíram para meu crescimento e que sem a colaboração de todos não seria possível realizar este trabalho. Agradeço também pela amizade e por proporcionarem momentos memoráveis no laboratório, é muito bom trabalhar com vocês.

A minha amiga e colega Francine Rodrigues Ianiski, pela formulação das nanocápsulas, para a realização desse trabalho. Também ao Biotério Central por disponibilizar animais para a execução do trabalho. Muito obrigado.

A todos os amigos, que mesmo estando longe sempre torceram por mim. Obrigado pelo apoio, amizade, paciência, carinho e por tornarem meus dias mais divertidos.

Agradeço também a Deus, pela fé que me sustenta, pelas bênçãos que recebi e sempre receberei dos meus padrinhos Ogum e Jurema, pela cumplicidade e humildade dos Pretos-velhos nas horas de maior dificuldade por serem meu amparo e força nas horas de desânimo.

Agradeço por permitirem que este sonho pudesse se concretizar e pelas oportunidades que sempre colocaram em meu caminho. Obrigado pela presença constante em minha vida!

*As pessoas sempre culpam as circunstâncias por aquilo
que acontece com elas.*

Não acredito em circunstâncias.

*As pessoas que progridem na vida são aquelas que
Acordam pela manhã e procuram as circunstâncias que
Desejam, e se não a encontram, as criam.*

Jorge Bernard Shaw

RESUMO

WEBER, Douglas Mroginski. **Avaliação do efeito de nanocápsulas contendo meloxicam na dermatite atópica induzida por 2,4-dinitroclorobenzeno em camundongos.** 2017. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A dermatite atópica (DA) é uma doença de pele inflamatória crônica e complexa que afeta crianças e adultos ao redor do mundo. A terapia recomendada da DA tem sido o uso tópico de corticoides, inibidores da calcineurina, ou ambos, para melhorar os sintomas e reduzir a inflamação. Embora os agentes tópicos disponíveis sejam geralmente bem tolerados, as suas aplicações podem causar efeitos secundários. Assim, existe a necessidade de novas opções de tratamento tópico eficazes e sem tais preocupações de segurança. Um novo tratamento alternativo para a DA é o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais. De fato, o meloxicam é um fármaco anti-inflamatório não-esteroidal altamente potente, mas possui uma fraca permeação na pele. Neste contexto, as nanopartículas poliméricas têm sido utilizadas como uma abordagem interessante e moderna para melhorar a eficácia do fármaco, permitindo uma distribuição sustentável na pele. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito de nanocápsulas contendo meloxicam (NC-M) no tratamento tópico dos sintomas, da resposta inflamatória e do estresse oxidativo em um modelo de DA em camundongos machos BALB/c. O 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) (0,5 % em acetona/óleo de oliva (3:1), 200 µl) foi aplicado na pele dorsal do camundongos nos dias experimentais 1-3 para sensibilização. Os camundongos foram expostos ao DNCB (1%, 100 µl) na pele dorsal (nos dias 14, 17, 20, 23, 26 e 29) e na orelha direita (nos dias 14-29). O tratamento com as nanocápsulas brancas (NC-B), o meloxicam livre (M-L) ou as NC-M foram aplicados no dorso dos camundongos dos dias 14 ao 29. No dia 30, os escores da severidade da lesão de pele e o comportamento de se coçar foram determinados. Após, os animais foram sacrificados e as orelhas e a pele dorsal foram removidos para a determinação dos parâmetros inflamatórios (edema e atividade da mieloperoxidase (MPO) e de parâmetros oxidativos, níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de tióis não-proteicos (NPSH). Os resultados confirmaram que o DNCB aumentou a severidade das lesões de pele, o comportamento de se coçar, o edema de orelha, a atividade da MPO na orelha e os níveis de TBARS na pele dorsal em camundongos. Um importante achado do presente estudo foi que a aplicação tópica das NC-M foi capaz de reverter a severidade dos escores de pele, o comportamento de se coçar e a resposta inflamatória induzida por DNCB em camundongos, mas não teve efeito nos níveis de TBARS da pele dorsal. Os tratamentos com NC-B ou M-L não tiveram efeito terapêutico neste modelo. Os níveis de NPSH da pele dorsal não foram alterados em nenhum dos grupos experimentais. Em conclusão, os dados reportados claramente demonstraram que o meloxicam carregado por nanocápsulas poliméricas atenuaram a resposta inflamatória e subseqüentemente melhoraram os sintomas em um modelo de DA em camundongos, enquanto o tratamento com o M-L não teve efeito.

Palavras-chave: Nanopartículas, Meloxicam, 2,4-Dinitrobenzeno, Anti-inflamatórios não-esteroidais, Pele.

ABSTRACT

WEBER, Douglas Mroginski. **Evaluation of the effect of nanocapsules containing meloxicam in atopic dermatitis induced 2,4-dinitrochlorobenzene in mice.** 2017. Dissertation (master's degree in biochemistry and bioprospecting) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Atopic dermatitis (AD) is a complex chronic inflammatory skin disease that affects children and adults worldwide. Recommended therapy of AD has been the use of topical corticosteroids, topical calcineurin inhibitors, or both, for improving the symptoms and reducing the inflammation. Although available topical agents are generally well tolerated, their applications may cause side effects. Thus, there is a need for new effective topical treatment options without such safety concerns. A new alternative treatment of AD is the use of non-steroidal anti-inflammatories. Indeed, meloxicam is a highly potent non-steroidal anti-inflammatory drug, but it possessed poor skin permeation. In this context, polymeric nanoparticles have been used as an interesting and modern approach to improve drug efficacy, allowing sustainable distribution within the skin. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC) on the topical treatment of symptoms, inflammatory response and oxidative stress in an AD model in male BALB/c mice. 2, 4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) (0.5 % in acetone/olive oil (3:1), 200 μ l,) was applied to the dorsal skin of mice on experimental days 1-3 for sensitization. Mice were challenged with DNBCB (1 %, 100 μ l) on the dorsal skin (on days 14, 17, 20, 23, 26, and 29) and ear (right) (on days 14-29). Treatments with blank nanocapsules (B-NC), free meloxicam (M-F) or M-NC were applied to the backs of the mice from days 14 to 29. On the day 30, skin severity scores and scratching behavior were determined. After, animals were sacrificed and ears and dorsal skin were removed for determination of inflammatory parameters (edema, myeloperoxidase (MPO) activity) and oxidative parameters (thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and non-protein thiol (NPSH) levels). Our results confirmed that DNBCB increased the severity of skin lesions, scratching behavior, ear edema, ear MPO activity and dorsal skin TBARS levels in mice. An important finding of the present study was that topical application of M-NC was able to reverse skin severity scores, scratching behavior and inflammatory response induced by DNBCB in mice, but did not have effect on the dorsal skin TBARS levels. B-NC or M-F treatments did not have effect in this model. Dorsal skin NPSH levels were not altered in any of the experimental groups. In summary, the data reported herein clearly demonstrated that meloxicam carried by polymeric nanocapsules the attenuate inflammatory response and subsequently ameliorated symptoms in a mouse model AD, while F-M treatment did not have effect.

Keywords: Nanoparticles, Meloxicam, 2, 4-Dinitrochlorobenzene, Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, Skin.

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

Figura 1	Lesão na pele	21
Figura 2	Marcha atópica	21
Figura 3	Mutação da filagrina pode provocar entrada de alérgenos e ocasionar dermatite atópica	25
Figura 4	Principais alterações fisiopatológicas na dermatite atópica	26
Figura 5	Fluxograma de tratamento da dermatite atópica	28
Figura 6	Meloxicam: Estrutura química do meloxicam	29
Figura 7	Ação do meloxicam sobre a COX-2	30
Figura 8	Ilustração representativa da pele	31
Figura 9	Ilustração representativa de nanoesferas e nanocápsulas	33

Manuscrito

Figura 1	Scheme of experimental protocol. The dorsal skin of mice was shaved and sensitized with topical 0.5 % DNCB on days 1-3	60
Figura 2	Effect of meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC), free meloxicam (M-F) or blank nanocapsules (B-NC) on DNCB-induced AD-like symptoms in mice	60
Figura 3	Effect of meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC), free meloxicam (M-F) or blank nanocapsules (B-NC) on DNCB-induced scratching behavior	61
Figura 4	Effect of meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC), free meloxicam (M-F) or blank nanocapsules (B-NC) on DNCB-induced inflammatory parameters in mice: (a) edema (day 30) and (b) myeloperoxidase (MPO) activity in the ears of mice.	62
Figura 5	Effect of meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC), free meloxicam (M-F) or blank nanocapsules (B-NC) on DNCB-induced oxidative stress parameters in mice: levels of (a) thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and (b) non-protein thiol (NPSH) in the dorsal skins of mice.	63

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1	Critérios diagnósticos para a dermatite atópica postulado por Hanifin e Rajka (1980)	22
Tabela 2	Critérios diagnósticos para a dermatite atópica modificado pela Academia Americana de Dermatologia	23
Tabela 3	Critérios diagnósticos para dermatite atópica desenvolvido por Williams e colaboradores (1994)	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
COX	Cicloxygenase
COX-1	Cicloxygenase-1
COX-2	Cicloxygenase-2
DA	Dermatite Atópica
DNCB	2,4-Dinitroclorobenzeno
EA	Eczema Atópico
EUA	Estados Unidos da América
ERs	Espécies reativas
FLG	Filagrina
IgE	Imunoglobulinas E
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-10	Interleucina-10
IL-11	Interleucina-11
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-18	Interleucina-18
IL-22	Interleucina-22
IFN gama	Interferon gama
TNF alfa	Fator de necrose tumoral alfa
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
pH	Potencial hidrogeniônico ou potencial de hidrogénio
Th	T auxiliares
Th0	T auxiliar despolarizado
Th1	T auxiliar 1
Th2	T auxiliar 2
Th17	T auxiliar 17

Th22	T auxiliar 22
TGF- β	Fator de crescimento tumoral β
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TPA	13-acetato de 12 tetradecanoiforbol

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
B	Beta
°C	Graus Celsius
M	Metro
μ	Micro
Nm	Nanômetros
%	Porcento

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	18
2.1.	OBJETIVO GERAL	18
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1.	DERMATITE ATÓPICA (DA)	19
3.1.1.	CARACTERISTICA GERAIS DA DOENÇA	19
3.1.2.	FISIOPATOLOGIA DA DERMATITE ATÓPICA	24
3.1.3	TRATAMENTO DA DERMATITE ATÓPICA	27
3.2.	MELOXICAM X PELE	28
3.3.	NANOTECNOLOGIA	32
3.4	MODELOS EXPERIMENTAIS DE DERMATITE ATÓPICA	35
4.	MANUSCRITO CIENTÍFICO	37
5.	CONCLUSÃO	64
	PERSPECTIVAS	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO	79

1. INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA), também conhecida como eczema atópico, é uma patologia alérgica inflamatória crônica da pele e sua morbidade tem aumentado em países desenvolvidos e em desenvolvimento (BIEBER et al., 2012). A DA pode manifestar-se em qualquer idade, entretanto, há uma maior incidência na infância e a maioria dos pacientes apresentam as primeiras manifestações clínicas antes dos primeiros cinco anos de vida, podendo persistir até a fase adulta (RYAN et al., 2013; WILLIAMS, 2005).

A DA é uma doença complexa e acredita-se que sua evolução ocorra a partir da predisposição genética a atopias, com a interação de diferentes estímulos ambientais. Os mecanismos subjacentes dessa doença ainda não estão bem elucidados, porém defeitos na resposta imune a alérgenos e defeitos da barreira epidérmica são considerados como os principais (BANDIER et al., 2014; JUNGERSTED et al., 2010). Estudos genéticos e moleculares mostraram que há um grande número de genes envolvidos no desenvolvimento da DA, incluindo genes que codificam citocinas que participam das reações atópicas, proteínas epidérmicas, entre outros (ZHENG et al., 2011; ESPARZA-GORDILLO et al., 2009).

Os principais sintomas clínicos da DA caracterizam-se por ressecamento intenso da pele (xerose) tornando-a áspera, eritema, edema, vermelhidão, níveis elevados de IgE e eosinofilia, inchaço da pele e prurido moderado ou intenso com predomínio a noite, com consequente impacto no sono, aprendizagem e humor (NASSARRE, 2009; SCHMITT et al., 2016). Estes sintomas geralmente são acompanhados de asma e rinite alérgica, formando assim uma tríade, geralmente chamada de marcha atópica, sugerindo que a DA é um "ponto de entrada" para doenças alérgicas posteriores (DHARMAGE et al., 2014; SPERGEL; PALLER, 2003).

Contudo, a maioria dos pacientes desenvolve primeiramente uma condição de inflamação, antes mesmo de quaisquer lesões na pele se tornarem visíveis (PARK; OH, 2014). Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese da DA, pois quando os leucócitos são recrutados para o local da inflamação, ocorre a liberação de diversas enzimas, espécies reativas (ERs) e mediadores químicos no intuito de eliminar o agente alérgeno. Assim, o estresse oxidativo desempenha um papel importante no processo inflamatório (BISWAS, 2016; VERRI et al., 2012).

Os corticosteroides tópicos têm sido o tratamento farmacológico mais utilizado para a DA, entretanto a eficácia destes tratamentos é limitada, e a aplicação a longo prazo traz vários efeitos adversos (EICHENFIELD et al., 2014; RING et al, 2012). Os imunossupressores sistêmicos também são usados para a DA e geralmente são mais eficazes do que os tratamentos tópicos, mas eles carregam consigo um alto risco de toxicidade. Conhecendo esses riscos, o índice de interrupção do tratamento torna-se elevado (BLUME-PEYTAVI e WANH 2011; HENGGE et al, 2006; KATAYAMA et al, 2011; SIDBURY et al, 2014).

Uma nova alternativa para o tratamento da DA é o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES). Recentemente, demonstrou-se a eficácia e segurança do *Crisaborole*, um AINE, para o tratamento tópico da pele de crianças e adultos com DA (JARNAGIN et al., 2016). Entretanto, existem poucos estudos mostrando o efeito dos AINES na DA.

Entre os AINES encontra-se o meloxicam, um potente anti-inflamatório que exerce sua ação através da inibição seletiva da atividade da enzima cicloxigenase (COX-2). Sua principal limitação inclui a baixa solubilidade aquosa, pobre incorporação em formulações e baixa permeabilidade na pele (JANTHARAPRAPAP e STAGNI, 2007; YUAN et al., 2006). Neste contexto, diversos estudos têm buscado melhorar a absorção e disponibilidade percutânea do meloxicam, evitando os efeitos adversos associado à via oral (AH et al., 2010; JANTHARAPRAPAP e STAGNI, 2007; KASLIWAL et al., 2008; RUIZ et al., 2007; YUAN et al., 2006, 2007a,b).

Na dermatologia, as nanopartículas poliméricas tem sido usadas como uma moderna ferramenta para melhorar a solubilidade e eficácia de diversas drogas, permitindo uma melhor distribuição, reduzindo a dose e a frequência de administração (KUMARI et al., 2010). No entanto, não existem estudos mostrando o efeito de nanocápsulas poliméricas contendo meloxicam em doenças de pele, como a DA. Assim, este estudo buscou investigar o efeito de nanocápsulas de meloxicam no tratamento da DA em camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do tratamento tópico com nanocápsulas contendo meloxicam na DA induzida por 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do tratamento tópico com as nanocápsulas de meloxicam frente aos sintomas da DA induzida por DNCB em camundongos.
- Analisar o efeito do tratamento tópico com as nanocápsulas de meloxicam na resposta inflamatória induzida por DNCB.
- Avaliar o efeito do tratamento tópico com as nanocápsulas contendo meloxicam sobre os parâmetros oxidativos induzido por DNCB.
- Comparar o efeito do meloxicam livre com as nanocápsulas contendo meloxicam na DA.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DERMATITE ATÓPICA (DA)

3.1.1. CARACTERÍSTICA GERAIS DA DOENÇA

A DA também denominada eczema atópica é uma doença alérgica inflamatória crônica recidivante, que atingiu proporções de epidemia no mundo inteiro, e sua prevalência está aumentando principalmente em lactentes e crianças (BIEBER; CORK; REITAMO, 2012; ODHIAMBO et al., 2009). A condição geralmente desenvolve-se durante a infância, onde 70% dos pacientes apresentam os primeiros sintomas antes dos 5 anos de vida, com incidência maior em lactentes, podendo persistir até a fase adulta, na qual a incidência varia entre 1 a 3% (BAE et al., 2013; NAIDOO e WILLIAMS, 2013).

O primeiro estudo científico a relatar sobre a DA foi escrito por Wise e Sulzberger, no ano de 1933, e define o termo “atopia”. Este artigo demonstrava diversas alterações cutâneas, as quais na época eram nomeadas como subgrupos das “neurodermites”, com suas várias nomenclaturas, tais como neurodermite generalizada, prurido generalizado com liquenificação, entre outros. Nesse artigo, os autores então sugerem que a melhor denominação dessas alterações dermatológicas seria a de DA (WISE e SULZBERGER, 1933).

Atualmente resultados mostrados pela *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) demonstraram grande variabilidade na prevalência mundial da DA nos Estados Unidos da América (EUA). Estimou-se que nos EUA a DA afetou 10,7 % das crianças, com uma variação entre regiões de 8,7-18,1 %. Na Europa, estimou-se que a prevalência variou entre 15 e 20 % das crianças (ODHIAMBO et al., 2009; STROM e SILVERBERG, 2016; WILLIAMS et al., 1999). Na América Latina, os resultados obtidos pela ISAAC mostraram uma prevalência entre 5 e 15 %, e no Brasil a média nacional de incidência de DA foi de 8,2 %, com variações entre 5,3 e 15%. Estes dados sugerem que os fatores sociais e/ou ambientais podem desempenhar um papel importante na manifestação da doença (SHAW et al., 2011; SOLÉ et al., 2006).

A DA pode ser dividida em aguda e crônica. Em lactentes e crianças há um predomínio da DA aguda, na qual a histopatologia das lesões é caracterizada por uma hiperplasia epidérmica, uma espongiose ocasionalmente levando a formação de

vesículas, um infiltrado inflamatório composto por linfócitos e histiócitos, com número variável de eosinófilos e mastócitos na derme superior, um eritema e uma exocitose de linfócitos para a epiderme. Na fase crônica, a incidência maior é nos adultos, na qual as lesões são liquenificadas com aparecimento de paraquetose, hiperplasia epidérmica irregular, ressecamento intenso (xerose), infiltrado superficial dérmico moderado de linfócitos, histiócitos e alguns eosinófilos com aumento do número de mastócitos. Além disso, o espessamento papilar da derme e as alterações venulares, incluindo hiperplasia endotelial e espessamento da membrana basal, são observados (BRUIN WELLER et al., 2012; DARSOW et al., 2010; MIHM et al., 1976).

Além de disfunção imunológica, existem anormalidades na formação da barreira da pele, que estão presentes, não só nas áreas danificadas, mas também na pele que não apresenta sintomas clínicos (ADDOR et al., 2012). As lesões na pele de lactentes podem se apresentar de forma generalizada, mas normalmente ocorrem em bochechas e no couro cabeludo. A medida que a criança começa a engatinhar, podem aparecer lesões nos joelhos e cotovelos (OH et al., 2012).

Em crianças mais velhas e na adolescência, as lesões são vistas mais comumente nas articulações, podendo também afetar mãos e a região inferior e lateral do pescoço. Nos adultos com DA, as erupções são mais localizadas e mais comumente encontradas nas flexões, particularmente joelhos e cotovelos, porém pode-se encontrar lesões nos pés, parte externa e interna das mãos, na parte peitoral e na região lateral e superior do pescoço (Figura 1) (MACK, 2004).

A presença destes sintomas clínicos tem impacto físico e social significativo nos pacientes e seus familiares, sendo que muitos pais de crianças com DA relatam sentimentos de culpa, cansaço, frustração e de impotência ao longo da doença, relatando também que os filhos sofrem com dificuldades para dormir, falta de frequência escolar e irritabilidade (DA VEIGA, 2012). KEMP (2003) descreveu que o estresse familiar associado aos cuidados de crianças com a DA moderada a grave foi significativamente maior do que a diabetes mellitus tipo I, e que os gastos com o tratamento tem sido extremamente elevados.

Um estudo realizado por ELLIS e DRAKE (2002) estimou que os custos associados ao tratamento da DA infantil nos EUA tem sido em torno de 364 milhões de dólares por ano, e esses valores seriam de gastos com o serviço médico e de medicamentos prescritos para o tratamento da DA. A DA tem representado um grande

desafio para a pediatria, pois trata-se de uma doença da infância, com início precoce e que altera muito a sociabilidade de quem a possui (SVENSSON et al., 2011).

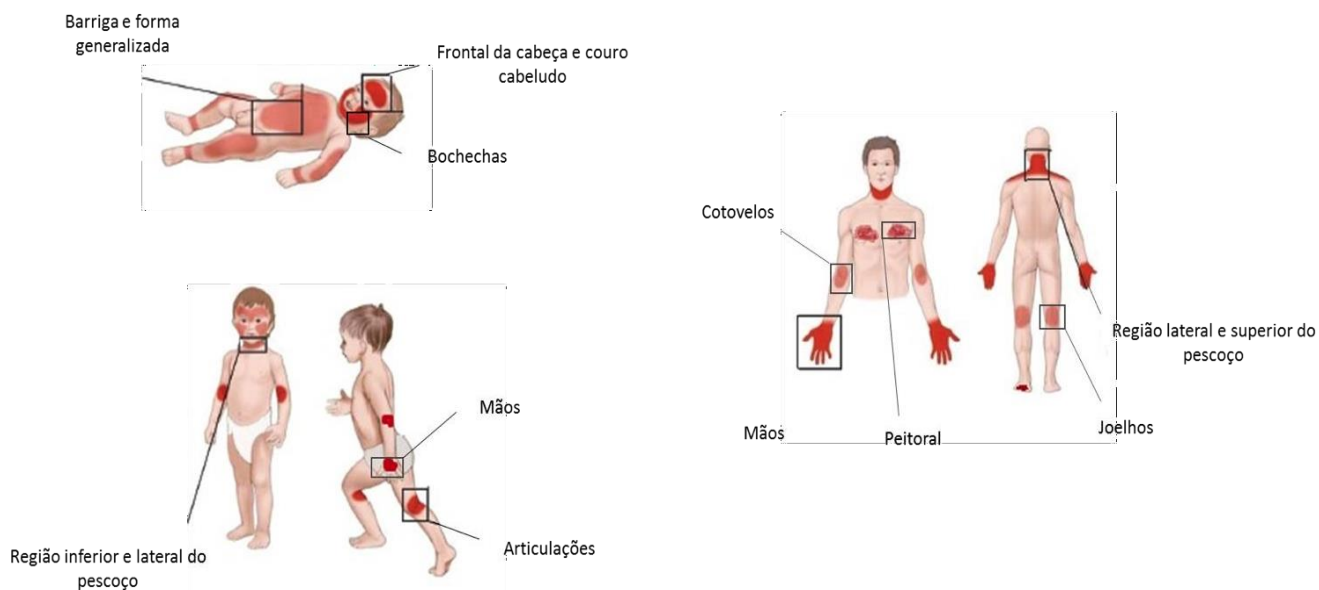


Figura 1: Lesões na pele de crianças e adultos com DA (Adaptado de WEIDINGER e NOVAK, 2016, p. 1111).

O diagnóstico da doença baseia-se nas manifestações clínicas do paciente, que variam com a idade (THOMSEN, 2014). Além disso, há uma predisposição genética a doenças atópicas e o aparecimento de outras doenças durante o curso da DA, como a rinite e a asma, sendo esta tríade conhecida como marcha atópica, o que auxilia no diagnóstico da doença (Figura 2) (SIMPSON, 2012).

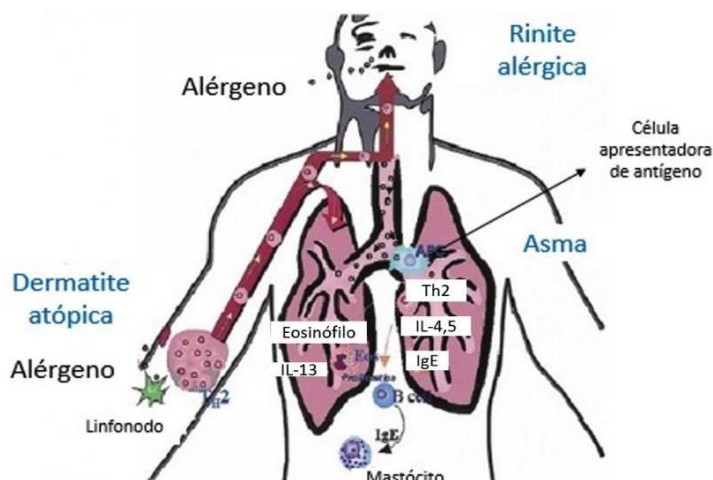


Figura 2: Características imunológicas da marcha atópica. (Adaptado de SPERGEL e PALLER, 2003, p. 125).

Hanifin e Rajka (1980) elaboraram uma lista de critérios clínicos para auxiliar no diagnóstico da DA, os quais ainda são utilizados nos dias atuais. Utilizando estes critérios, um paciente para ser diagnosticado com DA precisa ter três ou mais dos critérios considerado maiores, e três ou mais dos critérios considerados menores (Tabela 1).

Tabela 1: Critérios diagnósticos para a DA postulado por Hanifin e Rajka (1980).

Critérios maiores (três ou mais)	
Prurido	História pessoal ou familiar de atopia
Morfologia e distribuição típica das lesões	Dermatite crônica e recidivante
Critérios menores (três ou mais)	
Xerose	Hiperlinearidade palmar
Início precoce da doença	Tendência a infecções cutâneas
Queratose pilar	Prega infra orbital de Dennie-Morgan
Tendência a dermatite inespecífica de mãos e pés	Pitíriase alba
Dermografismo branco	Palidez ou eritema facial
Queilite	Eczema de mamilo
Pregas anteriores do Pescoço	Acentuação perifolicular
Escurecimento Periorbital	Alopécia areata
Sinal de Hertogue (rarefação das sobrancelhas)	Hiper-reatividade cutânea (Tipo I)
Elevação da IgE sérica	Enxaqueca
Conjuntivites recorrentes	Intolerância alimentar
Curso influenciado por fatores emocionais	Catarata
Curso influenciado por fatores ambientais	Ceratocone
Prurido	Urticaria colinérgica
Alergia ao níquel	

Os critérios postulados por Hanifin e Rajka (1980) foram posteriormente revisados pela Academia Americana de Dermatologia (HANIFIN et al., 2004). A tabela

original de Hanifin e Rajka foi reformulada, sendo criado critérios mais úteis para o diagnóstico da DA na prática clínica (Tabela 2).

Tabela 2: Critérios diagnósticos para DA modificado pela Academia Americana de Dermatologia (HANIFIN et al., 2004).

Características essenciais	Coceira, Eczema com morfologia típica e padrão específico da idade.
Características importantes	Idade de início precoce, Atopia (história pessoal ou familiar), Pele seca.
Características associadas	Resposta vascular atípica (ou seja, palidez facial, dermatografismo branco), Queratose pilar, hiperlinearidade palmar, ictiose, Alterações oculares e periorbitárias, Outros achados regionais (por exemplo, lesões perioral e periauricular), Acentuação perifoliculares, liquenificação e escoriações.

Além disso, Williams e colaboradores (1994) elaborou um conjunto de perguntas úteis para o diagnóstico da DA e amplamente utilizado em pesquisas epidemiológicas. Nessa forma de classificação, o paciente deve apresentar prurido, junto com três ou mais dos achados que estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Critérios diagnósticos para DA desenvolvido por Williams e colaboradores (1994).

História de dermatite flexural
História de alergia respiratória no paciente ou parente de primeiro grau
Pele seca
Lesões eczematosas ocorrendo antes dos dois anos de idade
Eczema presente

Alguns achados laboratoriais são importantes para o auxílio no diagnóstico da DA, entretanto, não são conclusivos (KATAYAMA et al., 2011). Alguns testes realizados são a contagem de eosinófilos no sangue periférico e a determinação dos níveis séricos de IgE total. A presença de eosinofilia e de níveis elevados de IgE geralmente são encontrados em pacientes com DA. Porém, cerca de 20 % dos indivíduos com essa patologia não apresentam alterações nos níveis de IgE, e a eosinofilia associada com aumento de IgE sérica também pode ser encontrado em outras situações clínicas, como por exemplo parasitoses, reações a drogas e doenças

infeciosas (BREUER et al., 2004; LONGO et al., 2013; WEIDINGER e NOVAK, 2016).

A avaliação laboratorial também pode realizar ensaios que venham a proporcionar a descoberta de agentes provocadores de DA. Testes esses que são essenciais para a elaboração de estratégias terapêuticas e para a prevenção de contato com alérgenos entre outros fatores desencadeantes (KATAYAMA et al., 2014).

Os testes mais utilizados são os testes cutâneos, como o teste de leitura imediata, que consiste em detectar quais alérgenos (natural, ambiental ou alimentar) podem induzir uma reação alérgica no paciente. Outro teste utilizado é o teste de contato para atopia, que é realizado diretamente na pele do paciente, colocando substâncias específicas em contato com a mesma, provocando uma exposição do paciente ao alérgeno e produzindo áreas de dermatite, quando entrar em contato com uma substância que desencadeia uma reação alérgica (BELTANI, 2003; KIM et al., 2015; OKUBO et al., 2014).

Além disso, há o teste de provocação oral com alimentos que pode ser dividido em três tipos, aberto quando o alimento é oferecido e de conhecimento do paciente, familiares e médico. Placebo controlado quando o alimento é mascarado de forma que o paciente não reconheça se está ingerindo o alimento suspeito ou o placebo, apenas o médico conhece o que está sendo administrado. E o teste duplo cego, no qual o alimento testado e o placebo são preparados por uma terceira pessoa não envolvida na avaliação do paciente, sendo este o mais fidedigno, por diminuir a influência tanto do observador quanto do paciente sobre o teste, no qual todos esses procuram algum agente alérgico ao paciente (MENDONÇA et al., 2011; SAEKI et al., 2016).

3.1.2. FISIOPATOLOGIA DA DERMATITE ATÓPICA

A fisiopatologia da DA é complexa e não é completamente compreendida. Acredita-se que a DA é um resultado das interações entre os genes de susceptibilidade e os fatores ambientais (LEUNG e BIEBER, 2003; ZHENG et al., 2011). Uma das hipóteses é que a propensão genética para uma barreira epidérmica comprometida, incluindo mutações de genes para proteínas estruturais da epiderme, tais como filagrina (FLG), que é uma proteína estrutural essencial da pele responsável

pela retenção de umidade, aumenta as possibilidades de penetração por alérgenos (Figura 3) (BANTZ; ZHU; ZHENG, 2014; BIEBER, 2010).

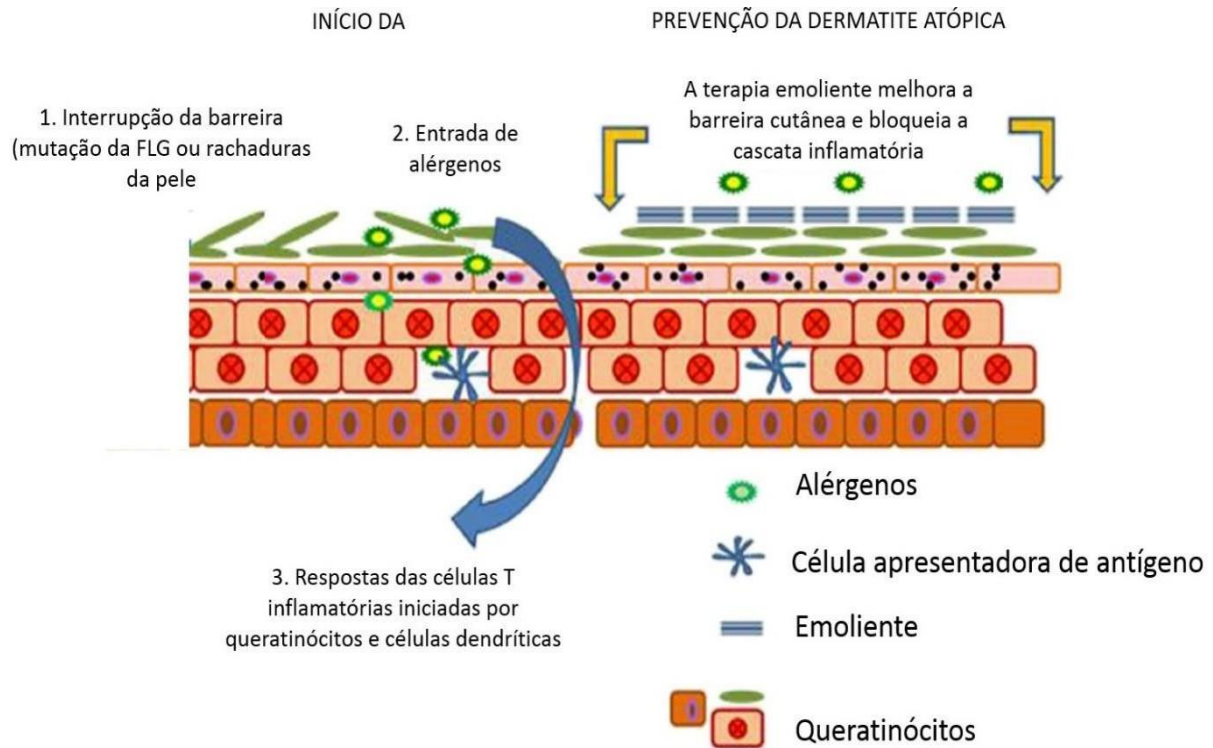


Figura 3: Mutação da Filagrina (FLG) pode provocar entrada de alérgenos e ocasionar a DA (Adaptado de SIMPSON et al, 2014, p. 820).

O processo de sensibilização é iniciado quando as células apresentadoras de antígenos, tais como células de Langerhans, processam o antígeno e apresentam seus fragmentos para os linfócitos, estimulando assim a infiltração de células T auxiliares (Th) na pele. Os estímulos fornecidos por essa célula apresentadora de antígeno ocasionará a polarização dos linfócitos Th0, fazendo assim com que ele se diferencie nos subtipos Th2 e Th22 (ESPERGEL, 2010). Estes linfócitos Th2 e Th22 segregam as citocinas pró-inflamatórias, incluindo as interleucinas (IL)-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-22 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), estimulando as respostas imunitárias humorais (fase aguda) (Figura 4) (DE BENEDETTO; KUBO; BECK, 2012).

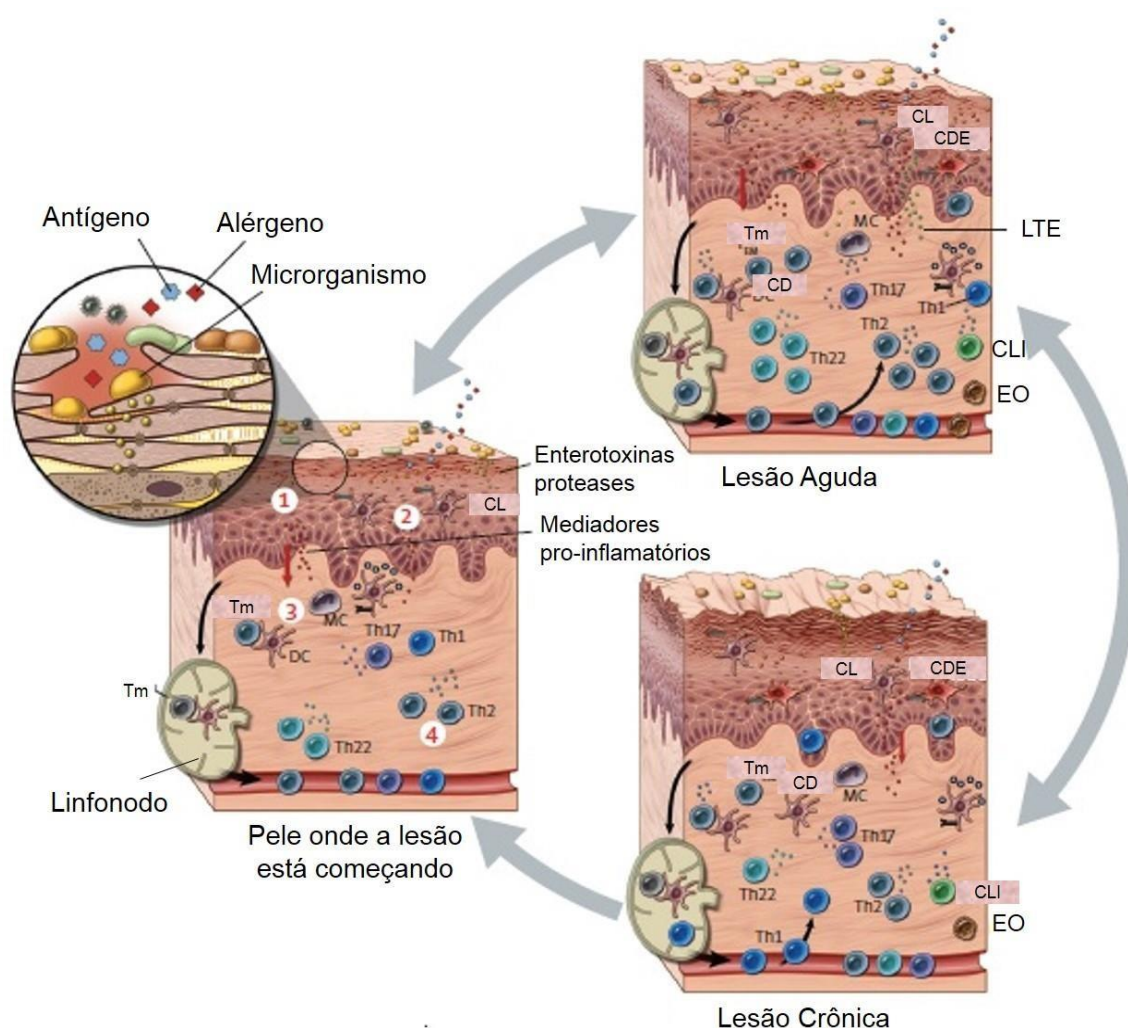


Figura 4: Principais alterações fisiopatológicas na DA. 1-barreira epidérmica, 2- Sensibilização, 3- Regulação imunológica, 4- Resposta do tecido, CL- Células de Langerhans, Tm- Células T de memória, CDE- Célula dendrítica epidermal, CD- Célula dendrítica, Th- T-helper, LTE- Linfopoeitina tímica estromal, CLI- Célula linfóide inata, EO- Eosinófilos, MC- Mastócitos (Adaptado de WEIDINGER e NOVAK, 2016, p.1114).

Os mediadores pró-inflamatórios prejudicam a diferenciação e a integridade epidérmica e ativam queratinócitos que liberam mais mediadores pró-inflamatórios e pruritogênicos. As lesões crônicas são caracterizadas por progressão adicional de hiperplasia epidérmica, composição corneocitária alterada, adesão e quantidades reduzidas de lipídios intercelulares. A ativação contínua dos subconjuntos Th2 e Th22 e ativação das vias Th1 e Th17 prejudicam ainda mais a função da barreira epidérmica, acelerando a inflamação local e promovendo a remodelação cutânea (FLOHR e MANN, 2014; ON et al., 2017).

3.1.3. TRATAMENTO DA DA

A DA ainda não tem cura, e muitos pacientes irão cronificar a doença. Por isso, o tratamento dessa patologia visa melhorar os sintomas, através de vários aspectos como, a contínua reparação da barreira epidérmica com emolientes e cremes hidratantes, e evitar irritantes específicos e inespecíficos, como alérgenos e roupas que não sejam de algodão. Assim ao reduzir a secura da pele, a coceira irá diminuir, e com isso diminuirá o risco de infecção (LANGAN; SILCOCKS; WILLIAMS, 2009).

Além disso, o tratamento de rotina é constituído pelo uso tópico de corticosteroides ou inibidores da calcineurina e do uso oral de anti-histamínicos. Porém, em casos mais graves utiliza-se a fototerapia e os imunossupressores sistêmicos (Figura 5) (CARR, 2013; MCCOLLUM; PAIK; EICHENFIELD, 2010).

Contudo, o insucesso do tratamento ocorre pela sua fraca adesão dos pacientes, em particular, a terapia tópica, devido aos potenciais efeitos adversos dos corticosteroides e dos inibidores da calcineurina (AUBERT-WASTIAUX et al., 2011). Além disso, o tratamento com anti-histamínico causa um efeito sedativo, podendo deixar o paciente sonolento durante o dia, prejudicando seu rendimento escolar, no trabalho e sua qualidade de vida (NQ; LIEW; ANG, 2015).

A falta de fármacos empregados para o tratamento da DA, que associem uma alta eficácia com baixos efeitos colaterais, tem estimulado a pesquisa de novos agentes terapêuticos. Neste sentido, tendo em vista que o processo inflamatório está envolvido na DA, uma alternativa para o tratamento seria utilizar fármacos que agem em enzimas Cicloxigenase-1 e Cicloxigenase-2 (COX-1 e COX-2) e mediadores pró-inflamatórios (GITTLER; WANG; ORLOW, 2017; GOTTLIEB, 2005).

Dentre esses fármacos, destacam-se os AINES, que são conhecidos como não-opiídeos, os quais são utilizados para o tratamento de dores e inflamações agudas e crônicas. Entre os AINES, um dos potentes anti-inflamatórios é o meloxicam, o qual atua diminuindo a inflamação através da inibição seletiva da atividade da COX-2 no local da lesão (AH et al., 2010; YUAN et al., 2010). Além disso, recentemente, Jarnagin e colaboradores (2016) demonstraram a eficácia e segurança do *Crisborole*, um AINE, para o tratamento tópico da pele de crianças e adultos com DA (JARNAGIN et al., 2016).

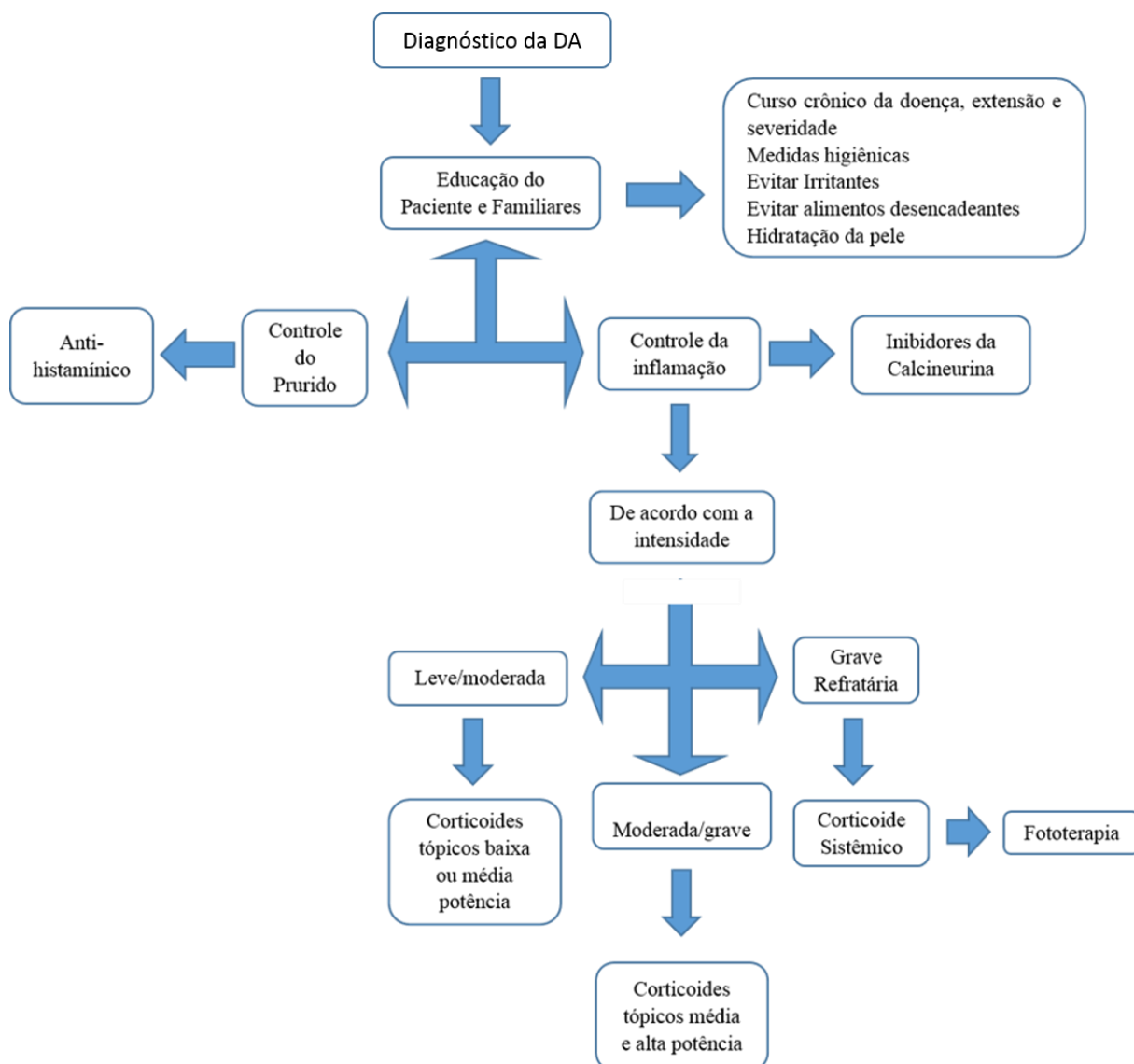


Figura 5: Fluxograma de tratamento da DA (Adaptado de GUILHERME et al., 2014, p. 166).

3.2 MELOXICAM X PELE

O mecanismo de ação dos AINES está envolvido no bloqueio da produção de prostaglandinas por meio da inibição da enzima COX no local da lesão, diminuindo assim, a inflamação. Existem três isoformas, denominadas COX-1, COX-2 e COX-3. Quais se diferenciam pela sua estrutura e função, a enzima COX-1 possui 576 aminoácidos e nós humanos é produzida pelo gene PTGS1, e é responsável pela catalise de prostaglandinas e tromboxano, participando da manutenção dos processos

de manutenção da proteção da mucosa gástrica e homeostasia e regulação de perfusão renal (BAPNA e CHAUHAN, 2015; OKSUZ et al., 2016).

A COX-2 possui 587 aminoácidos e nos seres humanos é codificada pelo gene PTGS2, está presente na maioria dos tecidos e diante de um quadro inflamatório sua expressão é aumentada cerca de 20 vezes. Esta enzima é responsável pela formação de importantes mediadores biológicos chamados prostanóides (incluindo prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano). A inibição farmacológica da COX-2 pode causar alívio aos sintomas da inflamação e da dor (MARTINEZ et al., 2017; UCHIDA, 2017).

Nos últimos anos foi proposto a existência de uma terceira isoforma desta família enzimática, denominada COX-3, a qual é encontrada no cérebro, medula espinhal e coração. Ao contrário das COX-1 e COX-2, não produz prostanóides pro-inflamatórios, mas sim substâncias anti-inflamatorias (DHULL et al., 2012; KONSTANTINIDOU, GKERMANI, HADJIPAVLOU-LITINA, 2015; WU e WAN, 2010).

Entre os AINES, destaca-se o meloxicam (4-hidroxil-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil) -2H-1,2-benzothiazina-3- carboximida-1,1-dióxido) (Figura 6) por possuir efeitos adversos menores quando comparados a outros AINES, é um AINE derivado do ácido enólico (enolcarboxamida). Esse fármaco surgiu fundamentado pela teoria da seletividade das COX, sendo assim esse medicamento, tal como outros AINES, é um potente inibidor da COX. Porém, distingue-se da maioria dos AINES disponíveis no mercado, por apresentar maior afinidade pela COX-2, do que pela COX-1. Com isso, atribui-se que este fármaco possui menores efeitos adversos do que outros fármacos de sua classe devido a sua maior afinidade pela COX-2 (Figura 7) (UEHARA et al., 2016).

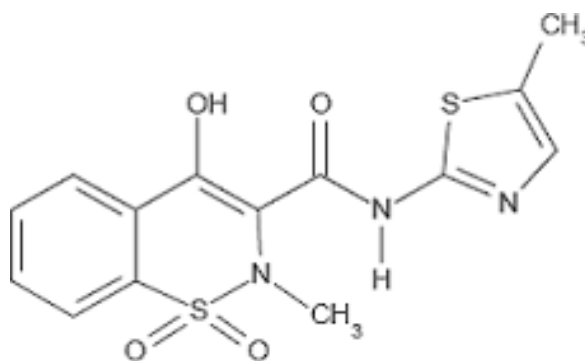


Figura 6: Estrutura química do meloxicam (JOLLIET et al, 1997).

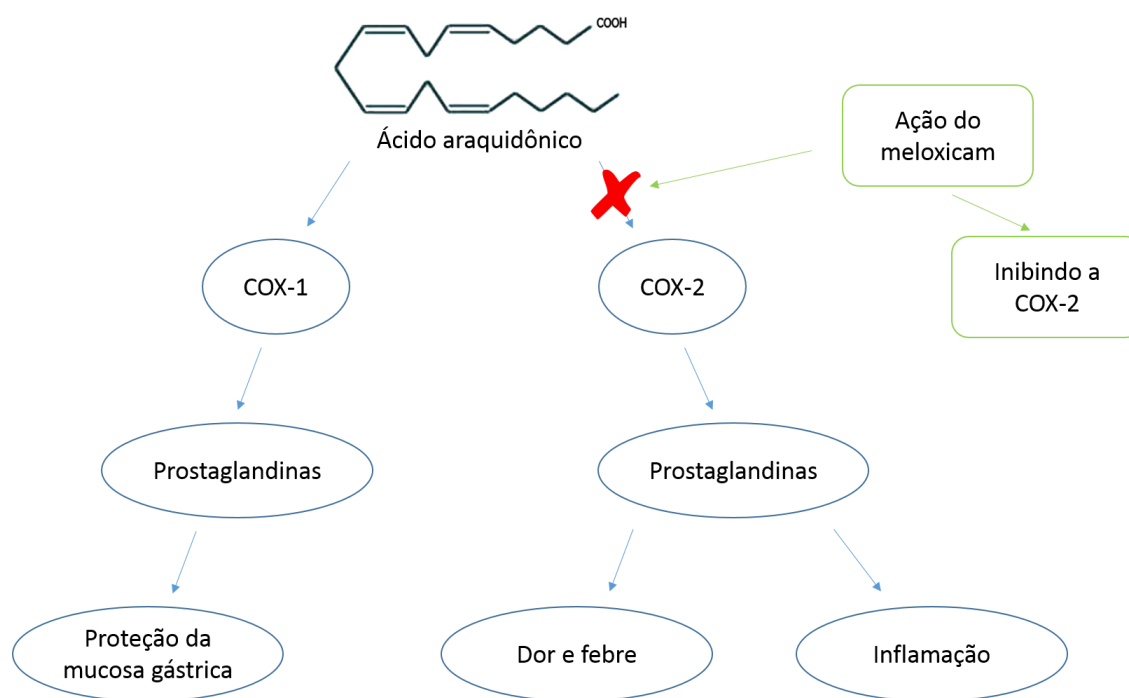


Figura 7: Ação do meloxicam sobre a COX-2 (Autoria própria, 2017).

Embora o meloxicam tenha menos efeitos adversos do que outros AINES, o seu efeito farmacológico é diminuído por possuir elevada afinidade por proteínas do plasma e baixos volumes de distribuição. Além disso, a administração dérmica do meloxicam torna-se prejudicada pelas propriedades da barreira estrato córnea (ASGHAR; JAMALI, 2015; EROGLU et al., 2012; SANATAKAR et al., 2014).

Este tipo de fármaco só poderá oferecer uma ação anti-inflamatória satisfatória, se for capaz de permear através do estrato córneo, o qual tem a função de manter a integridade da pele, representando assim a principal barreira para a permeação de fármacos (ASGHAR e JAMALI, 2015; MENON; CLEARY; LANE, 2012). A permeabilidade da pele depende de vários fatores, tais como a espessura, a integridade e a hidratação do estrato córneo (PHAM et al., 2016).

O estrato córneo, refere-se a uma camada fina (cerca de 20 μm) composta de células epidérmicas anucleadas mortas e secas, que são substituídas por filamentos de queratina incorporados a uma matriz lipídica multilamelar contínua. A composição lipídica é amplamente diferente em comparação com a maioria das outras membranas biológicas, uma vez que inclui basicamente componentes como fosfolipídios,

ceramidas de cadeia longa, ácidos graxos e colesterol (Figura 8) (YOSHIDA et al., 2017).

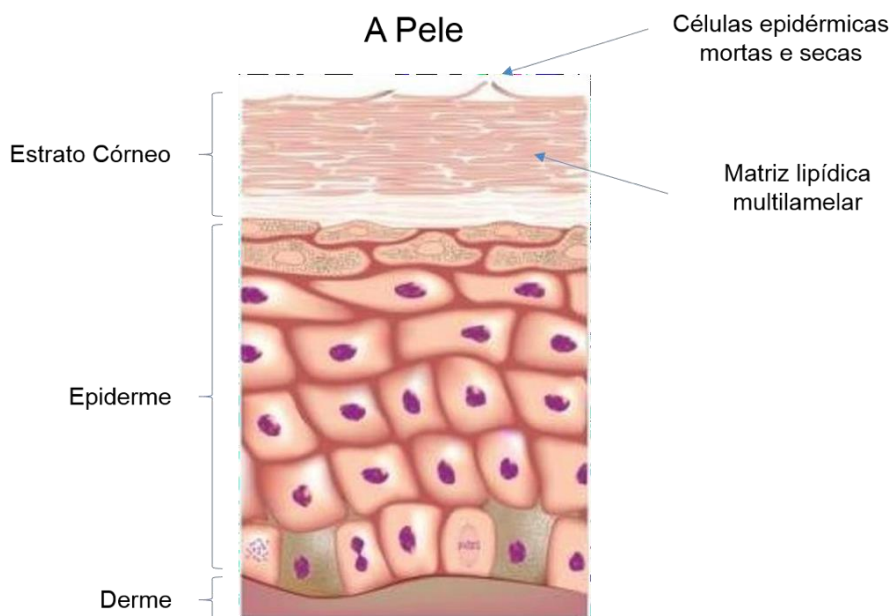


Figura 8: Ilustração representativa da pele (Adaptado de LINO et al., 2017).

O estrato córneo pode atuar como um reservatório para formulações aplicadas na pele, porém é a principal barreira para a permeação de substâncias ativas. Isso ocorre porque se trata de uma região que contém muitos lipídios, organizados em camadas lamelares, as quais acabam dificultando a difusão dos ativos (LINO et al., 2017).

A maioria dos fármacos utilizados para o tratamento de problemas dermatológicos tem como local de ação os tecidos mais profundos da pele. Porém, para que tenha uma ação satisfatória, o fármaco necessita permear o estrato córneo para chegar ao seu local de ação. Sendo assim, a utilização clínica de fármacos por esta via está limitada pela capacidade destes ultrapassarem a barreira da pele (TAKEICHI et al., 2017).

Um grande desafio no campo da pesquisa farmacêutica é encontrar fármacos que tenham a capacidade de permear esta barreira altamente ordenada. Dessa forma, diferentes estratégias têm sido propostas para aumentar a permeação cutânea de fármacos, sobretudo com a evolução da tecnologia na área farmacêutica. Um exemplo desta evolução são os sistemas que utilizam nanocarreadores, como por exemplo as

nanocápsulas, as quais possuem uma área superficial adequada, que as torna altamente propícias para a aplicação de substâncias lipofílicas, promovendo uma liberação homogênea do fármaco (WICKENS et al., 2016). De fato, no campo da dermatologia, as nanopartículas poliméricas tem sido usadas como uma moderna ferramenta para melhorar a solubilidade e eficácia de diversas drogas, permitindo uma melhor distribuição, reduzindo a dose e a frequência de administração (KUMARI et al., 2010).

3.3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma ciência capaz de manipular a matéria à escala atômica e molecular, criando novos materiais e desenvolvendo novos produtos na escala nanométrica (WRIGHT et al., 2010). O prefixo nano deriva do grego “*anão*” em que um nm equivale a 1 bilionésimo de metro (10^{-9} m) (GUTERRES; ALVES; POLHMANN, 2007). Os materiais e produtos com tamanhos desta ordem de grandeza geralmente exibem características funcionais únicas, não encontradas em matérias similares à escala macro (ZHANG et al., 2011).

A nanotecnologia vem sendo tratada como a principal inovação na área farmacêutica, sendo que estas nanoestruturas, aos poucos começam a ser consideradas como sistemas tecnológicos viáveis para incorporação de substâncias ativas, como fármacos e assim culminando no surgimento de novos produtos no mercado (COMOGLUAT; ARISOY; AKKUS, 2016; ZHU; ZHANG; YU, 2017). Além disso, ela tem sido aplicada em vários campos, tais como biomédico, óptico, eletrônico, na descontaminação de água, assim como a entrega de fármacos de maneira seletiva (MU e SPRANDO, 2010).

As nanocápsulas, por apresentarem alto potencial de encapsulamento de substâncias, especialmente fármacos lipofílicos, oferecem algumas vantagens exclusivas como a entrega controlada da droga e a liberação de fármacos em sítios de ação específicos. Neste sentido, elas melhoram o índice terapêutico ao aumentar a eficácia e/ou atenuar a toxicidade de fármacos, reduzindo a absorção sistêmica, e ao mesmo tempo, reduzindo os efeitos adversos provocados pelo fármaco (NAUMAN et al., 2015; ZHU; ZHANG; YU, 2017).

Existem ainda relatos do seu uso para a proteção de diferentes sistemas para aplicações farmacêuticas ou cosméticas, especialmente para substâncias sensíveis à

oxidação por variação de pH, presença de água ou por efeito de luz ultravioleta, ou ainda, substâncias que se degradam em temperaturas acima de 40 °C (PALMER e DELOUISE, 2016). Além disso, o número de aplicações ou das doses do medicamento pode ser reduzido, apresentando maior adesão dos pacientes ao tratamento (FRIEDRICH et al., 2016).

As nanopartículas utilizadas como vetores de entrega de fármacos são composta por diferentes materiais biodegradáveis, tais como polímeros naturais ou sintéticos, lipídios ou metais, e estes ainda podem ser administrados por diversas vias. As nanopartículas poliméricas em geral variam de 10 a 1000 nm, e são sistemas carreadores de fármacos que incluem as nanoesferas e as nanocápsulas (Figura 8) (MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010).

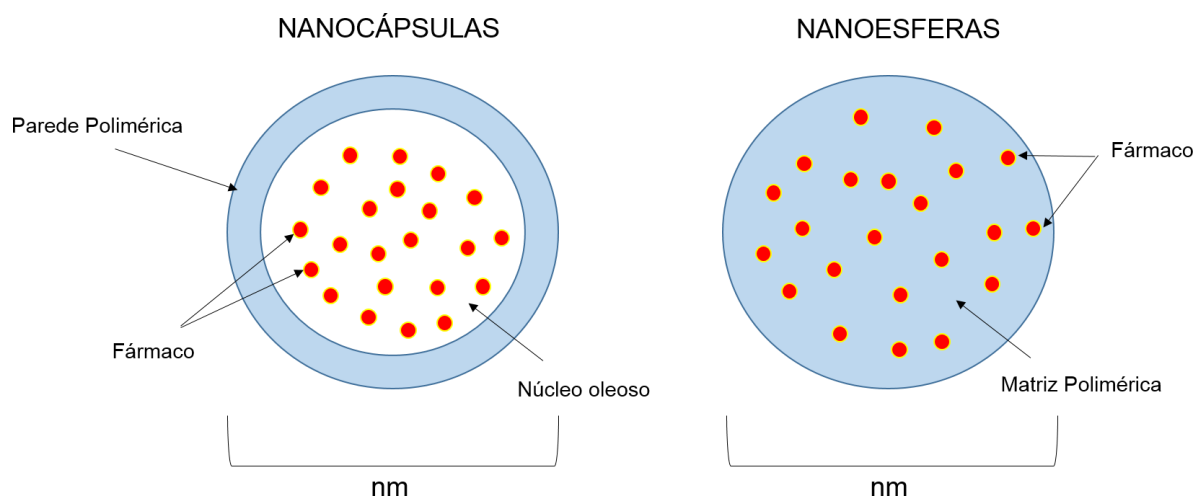


Figura 8: Ilustração representativa de nanoesferas e nanocápsulas (Adaptado de MELO; JUNIOR; FIALHO, 2012).

As nanocápsulas são estruturas coloidais constituídas por vesículas de um fino invólucro de polímero biodegradável e uma cavidade central com núcleo oleoso, no qual o medicamento é confinado neste núcleo e/ou adsorvido a parede polimérica (Figura 8) (SOPPIMATH et al., 2001). Além disso, o local onde o fármaco ficará dissolvido vai depender das propriedades físico-químicas e da composição das nanocápsulas (GRABOWSKI et al., 2016). As nanoesferas são sistemas de matriz em que o medicamento é uniformemente disperso na parede polimérica, pois elas não possuem óleo em sua composição (Figura 8) (MOUSLMANI e PATRA, 2015).

Além disso, o tamanho nanométrico das nanopartículas também permite o acesso para dentro da célula e em vários compartimentos celulares, inclusive o núcleo. Acredita-se que as nanocápsulas formem um filme de proteção na superfície e controlem a penetração das substâncias encapsuladas, e ainda por possuírem um tamanho muito pequeno, conseguem carrear o fármaco através do estrato córneo (LOWENAU et al., 2016). Portanto, as nanopartículas têm surgido como ferramentas promissoras, para estudos de entrega de drogas ou outras substâncias, tornando-se assim alternativas terapêutica para várias patologias (NAUMAN et al., 2015).

A possibilidade de convergência das diferentes áreas como a química, a biologia e a física, levam a nanotecnologia a ter uma multiplicidade de aplicações. Devido a esse caráter interdisciplinar, acredita-se que a nanotecnologia tenha o potencial de revolucionar tanto a área da saúde como a área tecnológica (CARR e WRIGHT, 2012). Por ser uma área com um grande potencial, as pesquisas envolvendo nanomateriais na busca por tratamentos mais eficientes vêm chamando a atenção de vários pesquisadores nos últimos anos (ADAIR et al., 2010; AHAD et al., 2014; MAYER et al., 2015; MOUSLMANI e PATRA, 2015).

O nosso grupo de pesquisa tem realizado trabalhos demonstrando a eficácia do meloxicam nanoencapsulado em vários modelos experimentais de inflamação. Ianiski e colaboradores (2012, 2016) demonstraram o efeito das nanocápsulas contendo meloxicam, após a administração oral, na profilaxia e no tratamento de um modelo de doença de Alzheimer em camundongos. Além disso, as nanocápsulas poliméricas contendo meloxicam, administradas pela via oral, apresentaram um efeito mais prolongado e pronunciado que o meloxicam livre em diferentes modelos de nocicepção e inflamação em camundongos (IANISKI et al., 2016; VILLALBA et al., 2014). Recentemente, Villalba e colaboradores (2016) mostraram que as nanocápsulas contendo meloxicam administradas pela via oral, não causaram toxicidade gástrica e hepática em camundongos, enquanto estas toxicidades foram evidentes após o tratamento com o fármaco na forma livre.

Mediante ao exposto, pode-se inferir que existem diversas vantagens farmacológicas no uso do meloxicam nanoencapsulado, frente ao uso do fármaco na forma livre, mostrando assim quão relevante a nanotecnologia tem se tornado na pesquisa de novos tratamentos eficazes no combate da inflamação. No entanto, não existem estudos mostrando o efeito de nanocápsulas poliméricas contendo meloxicam em doenças inflamatórias de pele.

3.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DERMATITE ATÓPICA

Modelos animais que mimetizem as doenças dermatológicas são necessários para permitir aos pesquisadores entender e estudar a ação de possíveis novas drogas. O modelo ideal deve incluir todas as características da patologia a ser estudada como sinais clínicos, imunológicos, comportamentais entre outros (PETERSEN, 2006). Atualmente são descritos alguns modelos experimentais indutores da DA, como o uso de 13-acetato de 12 tetradecanoiforbol (TPA), 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB) e o DNCB, pois ambos tem o poder de simular a DA em animais (AKRAM et al., 2016; LEE et al., 2016).

O TPA é um diéster do forbol, e também um constituinte ativo do óleo de cróton, sendo assim, uma substância pro-inflamatória com um alto poder de hiperproliferação celular da pele em animais, semelhante a muitas doenças de pele, como por exemplo a DA. Este composto tem a capacidade de induzir eritema na pele do camundongo após uma hora da aplicação e em uma fase mais tardia induzem a formação de edema. Porém o seu uso está limitado por ele ter uma grande chance de desenvolver câncer, por ser um dos promotores tumorais mais potentes e frequentemente utilizados (BHATTACHARYA et al 2017; PASSOS et al., 2013).

Outro reagente químico utilizado para induzir a DA é o DNFB, qual ocasiona o aumento da produção de IFN gama e IL-2, maior expressão de IL-1 beta, IL-10, TNF alfa e IL-4 na pele do animal após ser tratado. Porém este perfil de reações também semelhante ao da dermatite de contato (HUSSAIN et al., 2014; KIM et al., 2014)

Além destes, outro composto comumente utilizado em experimentos com animais para mimetizar a doenças da pele, como por exemplo a DA é a aplicação tópica DNCB, qual induz sintomas clínicos semelhantes ao da DA. Tipicamente para a indução da DA os camundongos tem a pele dorsal ou abdominal raspadas e são primeiramente sensibilizados com o DNCB, causando uma hipersensibilidade imediata, que ocorre pela apresentação do hapteno do DNCB (antígeno) pelas células de Langerhans aos linfócitos T auxiliares, o qual irá produzir citocinas tipo II e células T de memória, que induzirá a um aumento de IgE e mastócitos no tecido. Onde de cinco a quinze dias mais tarde passarão a ter uma exposição mais prolongada a este agente químico tanto na orelha como no dorso, para posterior avaliação da inflamação (CHAN et al., 2013; FANG et al., 2015; YOON et al., 2015).

Estudos da literatura, indicam que o DNCB tem o poder de provocar edema de orelha, infiltrações de mastócitos na orelha, aumento de IgE sérico, aumento dos níveis de histamina e aumento das interleucinas inflamatórias. Sendo assim, aplicações repetidas de DNCB no dorso e orelhas de camundongos provoca uma resposta similar a DA, representando ser um bom modelo animal dessa patologia (KU et al., 2017; LIM et al., 2016; LIN et al., 2015; SUN et al., 2014).

4. MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se estruturados de acordo com as normas da revista *Applied Biochemistry and Biotechnology*. O presente manuscrito encontra-se submetido a esta revista científica.

Topic application of meloxicam-loaded polymeric nanocapsules as a technological alternative for treatment of the atopic dermatitis in mice

Douglas Mroginski Weber^a, Guilherme Teixeira Voss^a, Renata Leivas de Oliveira ^a,
Francine Rodrigues Ianiski^b, Rodrigo de Almeida Vaucher^a, Cristiane Luchese^{a*},
Ethel Antunes Wilhelm^{a*}

^aPrograma de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Bioquímica (LaFarBio), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil

^bPrograma de Pós-graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano, CEP 97010-032, Santa Maria, RS, Brasil

* Address for correspondence

Ethel Antunes Wilhelm

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil; E-mail: ethelwilhelm@yahoo.com.br; Phone: 55-53-32757356

Cristiane Luchese

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil; E-mail: cristiane_luchese@yahoo.com.br; Phone: 55-53-32757233

Abstract

This study investigated the effect of the topical treatment with meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC) on symptoms, inflammatory response and oxidative stress in an atopic dermatitis (AD) model in BALB/c mice. 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) was applied to the dorsal skin on days 1-3 for sensitization. Mice were challenged with DNBCB on the ear (on days 14-29) and dorsal skin (on days 14, 17, 20, 23, 26, and 29). Treatments with blank nanocapsules (B-NC), free meloxicam (M-F) or M-NC were applied to the backs of the mice from days 14 to 29. On the day 30, skin severity scores and scratching behavior were determined. After that, animals were sacrificed, and ears and dorsal skin were removed for determination of inflammatory parameters (edema, myeloperoxidase (MPO) activity) and oxidative stress (thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and non-protein thiol (NPSH) levels), respectively. DNBCB increased the severity of skin lesions, scratching behavior, edema and MPO activity of ears, and dorsal skin TBARS levels. M-NC reversed skin severity scores, scratching behavior and inflammatory response induced by DNBCB. B-NC and M-F did not have effect in this model. In summary, meloxicam carried by polymeric nanocapsules reversed inflammatory response and ameliorated symptoms in an AD model.

Keywords: Nanoparticles, nanotechnology, 2,4-dinitrochlorobenzene, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

1. Introduction

Atopic dermatitis (AD) is a complex chronic inflammatory skin disease that affects up to 18 % of children and up to 5 % of adults worldwide, with up to 90 % of patients presenting with mild to moderate disease (1,2). This disease is characterized by erythematous and eczematous lesion, intense pruritus, dry and hypersensitivity skin (3,4). The patient's skin with AD is very sensitive and has an appearance of chronic redness, after skin will thicken gradually becoming harsh, affecting their appearance and contributing significant psychological, social and quality-of-life burdens to patients (5,6). In addition, AD is often associated with *comorbidities*, such as allergic rhinitis and asthma (7).

Topical treatments are commonly prescribed to improve AD symptoms and reduce inflammation (8). Recommended therapy has been the use of corticosteroids, calcineurin inhibitors, or both (9). Although available topical agents are generally well tolerated and despite their efficacy, effectiveness of the their treatments is limited, their applications may cause cutaneous and systemic side effects with long-term use (9,10). No new treatment has been approved for the AD therapy in the past 15 years. Thus, there is a need for new effective topical treatment options without such safety concerns.

A new alternative treatment of AD is the use of non-steroidal anti-inflammatories. Recently, several studies showed the efficacy and safety of a non-steroidal anti-inflammatory, the crisaborole, for the topical treatment of AD in children and adults (11-15). However, studies using non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the AD are still scarce. This study provides a new proposal for the treatment of AD using a NSAID, given that AD is an inflammatory disease.

Meloxicam is a highly potent NSAID that selectively inhibits the cyclooxygenase-2 (COX-2), blocking the prostaglandin synthesis and arachidonic acid metabolism (16). Its main limitations include poor aqueous solubility, poor incorporation into formulations and poor skin permeation (17,18). In this context, several studies have been carried out in order to improve the percutaneous absorption and bioavailability of meloxicam, avoiding the systemic side effect associated with oral route (17-23). In dermatology, polymeric nanoparticles have been used as an interesting and modern approach to improve drug solubility and efficacy, allowing sustainable distribution within the skin besides reducing dose and frequency of administration (24). However, there is a lack of studies showing the influence of nanoencapsulation of meloxicam in polymeric nanoparticles on its effect in skin diseases, such as AD. Importantly, previous studies from our research group demonstrated that meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC) showed higher pharmacological effect than free meloxicam (M-F) in various inflammatory models (25-28).

Based on the above considerations, the aim of this study was to investigate the effect of M-NC on the topical treatment of symptoms, inflammatory response and oxidative stress in an AD model. In addition, effects of M-NC were compared with M-F.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Female adult BALB/c mice (6-8 weeks old) were obtained from a local breeding colony. The animals were kept in a separate animal room, on a 12 h light/dark cycle with light on at 7:00 a.m. and acclimatized room (22 ± 2 °C). Commercial diet (GUABI, RS, Brazil) and tap water were supplied *ad libitum*. We applied strict ethical criteria in

our study to minimize pain and suffering and to reduce the number of animals used. Animals were used according to the guidelines of the Local Committee for Care and Use of Laboratory Animals of the Federal University of Pelotas (Pelotas, Brazil), under number 4294-2015.

2.2. Drugs

2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB), sorbitan monostearate, polysorbate 80 and poly (ϵ -caprolactone) MW = 80,000 were obtained from Sigma (St. Louis, MO). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade. All reagents were used as received.

2.3. Nanocapsules preparation

Suspensions of M-NC were prepared by the method of interfacial deposition of preformed polymer (29), at a concentration of 0.3 mg/ml. Suspensions of blank nanocapsules (B-NC) were prepared using the same protocol of M-NC suspensions, without the presence of drug. Meloxicam was dissolved in sorbitan monostearate, polysorbate 80 and water to obtain the solution of M-F. After preparation of suspensions, polymeric nanoparticles were incorporated into semisolid formulations (25). The particle diameter was around 247 and 212 nm for M-NC and blank B-NC, respectively. The polydispersity index was around 0.14 for M-NC and 0.10 for B-NC. The zeta potential was approximately - 36 mV for M-NC and -35 mV for B-NC. The content of meloxicam nanocoated was 99.9 %.

2.4. Experimental design

Figure 1 described experimental protocol of induction and treatment of AD. Mice were randomly divided into five groups ($n = 7-8$ per group). Mice belonging to group I (control group) were sensitized and challenged with acetone/olive oil (3:1). Animals of group II (DNCB group) were sensitized and challenged with DNCB. Animals belonging to groups III (B-NC + DNCB group), IV (M-F + DNCB group) and V (M-NC + DNCB group) were sensitized and challenged with DNCB and received topical treatment on the dorsal skin with of B-NC, M-F or M-NC, respectively.

AD-like pathology in mice was induced by DNCB as previously described by Chan et al. (30). Mice were shaved of dorsal hair and DNCB (200 μ l of 0.5 v/v% in acetone/olive oil (3:1 ratio) was applied to the area on experimental days 1-3 for sensitization. On days 14, 17, 20, 23, 26, and 29, mice were challenged with DNCB (100 μ l of 1 v/v%) on the dorsal skin, while on days 14-29 animals were challenged with DNCB (100 μ l of 1 v/v%) on the ear (right). Treatments with B-NC, M-F or M-NC were applied to the backs of the mice (0.5 g), daily, from days 14 to 29. Control animals received 100 μ l acetone/olive oil (3:1).

2.5. Assessment of the severity of skin lesions

On the day 30, the skin severity scores were measured according to Park et al. (31). Five signs of skin lesions were described: (1) pruritus/itching, (2) erythema/hemorrhage, (3) edema, (4) excoriation/ erosion, and (5) scaling/dryness. The above-mentioned symptoms were graded as follows: 0 (no symptoms), 1 (mild), 2 (moderate), and 3 (severe).

2.6. Scratching behavior

AD-like behavioral changes were investigated using scratching behavior. Time that mice spent rubbing their nose, ears, and dorsal skin with their hind paws for 20 min was measured and recorded on the day 30 (32). The results obtained are expressed in seconds (s).

2.7. Inflammatory parameters

2.7.1. Ear edema

On the day 30, after scratching behavior, mice were sacrificed and both ears were cut at the base and the weight difference between the samples of the control ear (left) and the DNCB-treated ear (right) was established on an analytical balance. The results obtained are represented in weight (mg). Subsequently, ears were used to determine the myeloperoxidase (MPO) activity.

2.7.2. MPO activity

MPO activity was assayed according to the method previously described by Suzuki et al. (33) with some modifications. The ears were homogenized in PBS (20 mmol/l, pH 7.4) containing ethylenediaminetetraacetic acid (0.1 mmol/l). After the homogenization, samples were centrifuged at 900 rpm at 4 °C for 10 min to yield a low speed supernatant fraction (S₁). Then, S₁ fraction was centrifuged at 20,000 rpm at 4 °C for 15 min to yield a final pellet (P₂). P₂ fraction was resuspended in medium containing potassium phosphate buffer (50 mmol/l, pH 6.0) and hexadecyltrimethyl ammonium bromide (0.5 wt/v%). Samples were finally frozen and thawed three times prior the posterior enzymatic assay. For the MPO activity measurement, an aliquot of resuspended P₂ (100 µl) was added to a medium containing the medium of resuspension and N,N,N',N'-tetramethylbenzidine (1.5 mmol/l). The kinetic analysis of MPO was started after addition of hydrogen peroxide (0.01 v/v%), and color reaction

was measured at 655 nm at 37 °C. Results are expressed as optic density (OD)/mg protein/min.

2.8. Oxidative stress parameters

Dorsal skin was removed and homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1:10, w/v) to determination of oxidative stress parameters. The homogenate was centrifuged at 2000 rpm for 10 min, and a S₁ was used for the following determinations: levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and non-protein thiol (NPSH).

2.8.1. TBARS levels

TBARS levels, a measure of lipid peroxidation, were determined as described by Ohkawa et al. (34). An aliquot (200 µl) of S₁ was incubated with 0.8 % thiobarbituric acid, acetic acid buffer pH 3.4 and 8.1% sodium dodecyl sulfate at 95 °C for 2 h. The color reaction was measured at 532 nm. TBARS levels were expressed as nmol MDA/mg protein.

2.8.2. NPSH levels

NPSH levels were determined by the method of Ellman (35). A sample of S₁ was mixed (1:1, v/v) with 10 % trichloroacetic acid. The samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min. After the centrifugation, the protein pellet was discarded and free-thiols groups were determined in the clear supernatant. An aliquot of supernatant (200 µl) was added in 1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 and 10 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid). The color reaction was measured at 412 nm. NPSH levels were expressed as µmol NPSH/g tissue.

2.9. Protein quantification

Protein concentration was measured by the method of Bradford (36), using bovine serum albumin (1 mg/ml) as the standard.

2.10. Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard derivation (S.D.). Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls' test when appropriate. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Assessment of the severity of skin lesions

Effects of M-NC treatment on severity of skin lesions in mice are demonstrated in Figures 2a and 2b [$F_{4,31} = 43.01$, $p < 0.0001$]. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls' post-hoc test showed that DNCB significantly increased skin severity scores, when compared to the control group (Figures 2a and 2b). M-NC treatment partially reduced (around 51 %) the severity of skin lesions induced by DNCB (Figures 2a and 2b). In addition, no significant difference in severity of skin lesions was observed after treatments with B-NC or M-F, when compared with DNCB group (Figures 2a and 2b).

3.2. Scratching behavior

Effects of M-NC treatment on scratching behavior are showed in Figure 3 [$F_{4,31} = 16.22$, $p < 0.0001$]. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls' post-hoc test reveled that DNCB-exposed animals increased the scratching time, when compared to the control group (Figure 3). M-NC treatment partially decreased (around 46 %)

DNCB-induced scratching behavior, whereas B-NC or M-F treatments were not effective (Figure 3).

3.3. Inflammatory parameters: Ear edema and MPO activity

Figure 4a illustrates the effects of M-NC treatment on ear edema in mice [$F_{4,31} = 22.11$, $p < 0.0001$]. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls' post-hoc test demonstrated that DNCB substantially increased right ear swelling, when compared to the control group (Figure 4a). Topical application of M-NC partially reduced (around 44 %) the ear swelling induced by DNCB (Figure 4a). No significant difference in the ear swelling was observed after treatments with B-NC or M-F, when compared with DNCB group (Figure 4a).

Results depicted in Figure 4b show effects of M-NC administration on the ear MPO activity [$F_{4,31} = 28.63$, $p < 0.0001$]. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls' post-hoc test revealed that DNCB significantly increased the MPO activity in the mouse ear, when compared to the control group (Figure 4b). NC-M treatment completely restored the ear MPO activity to the control levels, while B-NC or M-F treatments did not have effect (Figure 4b).

3.4. Oxidative stress parameters: TBARS and NPSH levels

Figure 5a demonstrates the NC-M effect on dorsal skin TBARS levels of mice [$F_{4,31} = 2.794$, $p < 0.05$]. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls' post-hoc test showed that DNCB increased TBARS levels in dorsal skin of mice, when compared to the control group (Figure 5a). NC-M, M-F or B-NC application did not have effect in reducing the TBARS levels increased by DNCB (Figure 5a).

As verified in Figure 5b, statistical analysis demonstrated that NPSH levels of dorsal skin was not altered by DNCB or by NC-M, M-F or B-NC treatments, when compared to the control group [$F_{4,31} = 1.503$, $p > 0.05$].

4. Discussion

In the present study, we proposed a new therapy for AD using nanotechnology and the meloxicam (a NSAID). Our results confirmed that DNCB induced the AD-like pathology in mice. The most important finding of this study is that topical application of M-NC was able to reverse DNCB-induced inflammatory response and subsequently ameliorate AD symptoms in mice. However, B-NC or M-F treatment did not have effect in this model. Therefore, our current results indicate that M-NC can be used in the treatment of AD.

It is well documented that AD is a complex chronic inflammatory skin disease characterized by erythematous and eczematous skin lesions, often intense pruritus, an impairment of the skin-barrier function, increased oxidative stress, and dysfunctional immune system (4,37). AD model induced by DNCB is widely used to study this disease, once it mimics the clinical symptoms this pathology (6, 32, 38-42). In this view, the present study confirmed that DNCB caused AD-like symptoms (as evidenced by increase on the severity of skin lesions and scratching behavior), inflammatory process (as showed by increase in the ear edema and ear MPO activity) and lipid peroxidation (as evidenced by increase of dorsal skin TBARS levels) in BALB/c mice, causing AD-like pathology.

In the present study, we demonstrated that meloxicam carried by polymeric nanocapsules topically applied was efficient in the treatment of AD induced by DNCB in mice. In fact, M-NC partially reduced DNCB-induced skin lesion severity, while M-

F or B-NC treatments did not have effect in this parameter, indicating effectiveness of M-NC against AD-like skin damage. Indeed, clinical skin severity scores have been used to evaluate the progression/treatment of AD (42).

Moreover, topical treatment with M-NC partially decreased DNCB-induced scratching behavior, whereas B-NC or M-F treatments were not effective against the pruritus/itching. Itching is a characteristic symptom of AD and analysis of spontaneous scratching behavior is useful for evaluating of effectiveness of anti-pruritus/itching (31,42). The reduction of pruritus/itching is very important for the treatment of AD, given that the act of scratching aggravates the skin lesions and causes more itching ensues. These finding indicated that the treatment with meloxicam into nanocapsules form was able to reduce scratching behavior, reducing the itching and scratching, preventing aggravation of the skin lesion in AD.

Another important finding of this study was M-NC treatment reduced the ear edema and ear MPO activity, indicating a reduction severity of inflammation in AD. However, M-F or B-NC treatments did not have effect in these parameters. It is well established that DNCB causes a skin irritation and local inflammation due to increase vascular permeability, developing edema in the ear (31,32). Thereby, polymorphonuclear leukocytes migrate to the inflammation local, increasing the MPO activity in the site, given that this enzyme is used as a marker of leukocytes infiltration (43). Moreover, meloxicam inhibits COX-2 activity, blocking prostaglandins production, arachidonic acid metabolism and cytokine production, reducing the vasodilatation and migration polymorphonuclear leukocytes to the inflammation site (19, 44). In this context, we can suggest that M-NC treatment could cause a reduction of inflammation by inhibiting the COX-2 activity, reducing the vasodilatation and consequently the

edema, and reducing the leukocytes infiltration into the ear tissues that corroborate with the inhibition on the MPO activity.

Oxidative stress has been associated with AD, can lead to increase in production of reactive species (45). In the present study, it was demonstrated an increase in the lipid peroxidation of mouse dorsal skin induced by DNCB, but treatments with M-NC, B-NC or F-M did not have effect in this parameter. A previous study by our group showed the cerebral antioxidant effect of M-NC in a neurodegenerative disease model (25). However, in the present study, we can rule out the involvement of M-NC antioxidant effect in the protection against lipid peroxidation in this model of AD.

Taking everything into consideration, results of the present study demonstrated that meloxicam into nanocapsules form showed a better effect in restoring symptoms and inflammatory process in a mouse AD model than M-F. Previously, our group demonstrated that M-NC were more powerful than M-F in several inflammatory models (25-28, 46). Some hypotheses main explain the pharmacological effect more pronounced of M-NC than F-M in AD-like pathology. First, polymeric nanocapsules promoted a sustained release by slowly deliver the meloxicam, prolonging the release of drug. In accordance with the results demonstrated in this study, other authors have reported a superior efficacy of polymeric nanocapsules, when compared to free drug, in different experimental models (25-28, 46-51). Second, meloxicam into polymeric nanocapsules contributed to the reduction of skin dryness, reducing the damage caused by DNCB. In accordance, Wissing and Müller (52) demonstrated that nanoparticles increased the cutaneous hydration degree, reducing transepidermal water loss. Moreover, a clinical symptom of AD is skin dryness and the use of substances that increase the cutaneous hydration are important (9).

In summary, the data reported herein clearly demonstrated that meloxicam carried by polymeric nanocapsules reversed inflammatory response and subsequently ameliorated symptoms in a mouse model AD, while F-M treatment did not have effect. Additional investigations will be performed to determine the transdermal penetration of M-NC.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge UFPel, FAPERGS, CAPES, CNPq for the financial support. C.L. is recipients of CNPq fellowship.

References

1. Shaw, T., Currie, G., Koudelka, C. and Simpson, E. (2011) Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 National Survey of Children's Health. *J. Invest. Dermatol.* 131, 67-73.
2. Bruin Weller, M., Knulst, A., Meijer, Y., Bruijnzeel-koomen, C. and Pasmans, S. (2012) Evaluation of the child with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy.* 42, 352-362.
3. Galli, S.J., Tsai, M. and Piliponsky, A.M. (2008) The development of allergic inflammation. *Nature.* 454, 445-454.
4. Bieber, T., Cork, M. and Reitamo, S. (2012) Atopic dermatitis: a candidate for disease-modifying strategy *Allergy. Eur. J. Allergy. Clin. Immunol.* 67, 969-975.
5. Tokura, Y. (2010) Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 58, 1-7.

6. Berke, R., Singh, A. and Guralnick, M. (2012) Atopic dermatitis: an overview. *Am. Fam. Physician.* 86, 35-42.
7. Bieber, T. (2010) Atopic Dermatitis. *Ann. Dermatol.* 22, 125-137.
8. Carr, W. (2013) Topical calcineurin inhibitors for atopic dermatitis: review and treatment recommendations. *Paediatr. Drugs.* 15, 303-310.
9. Eichenfield, LF., Tom, WL., Berger, TG., Krol, A., Paller, AS., Schwarzenberger, K., Bergman, JN., Chamlin, SL., Cohen, DE., Cooper, KD., Cordoro, KM., Davis, DM., Feldman, SR., Hanifin, JM., Margolis, DJ., Silverman, RA., Simpson, EL., Williams, HC., Elmetts, CA., Block, J., Harrod, CG., Smith Begolka, W. and Sidbury, R. (2014) Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 71, 116-132.
10. Ring, J., Alomar, A., Bieber, T., Deleuran, M., Fink-Wagner, A., Gelmetti, C., Gieler, U., Lipozencic, J., Luger, T., Oranje, A., Schäfer, T., Schwennesen, T., Seidenari, S., Simon, D., Ständer, S., Stingl, G., Szalai, S., Szepietowski, J., Taïeb, A., Werfel, T., Wollemberg, A. and Darsow, U. (2012) Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) part II. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 26, 1176-1193.
11. Jarnagin, K., Chanda, S., Coronado, D., Ciaravino, V., Zane, LT., Guttman-Yassky, E. and Lebwohl, MG. (2016) Crisaborole Topical Ointment, 2%: A Nonsteroidal, Topical, Anti-Inflammatory Phosphodiesterase 4 Inhibitor in Clinical Development for the Treatment of Atopic Dermatitis. *J. Drugs Dermatol.* 15, 390-396.
12. Paller, AS., Tom, WL., Lebwohl, MG., Blumenthal, RL., Boguniewicz, M., Call, RS., Eichenfield, LF., Forsha, DW., Rees, WC., Simpson, EL., Spellman, MC., Stein Gold, LF., Zaenglein, AL., Hughes, MH., Zane, LT. and Hebert, AA. (2016) Efficacy and safety of crisaborole ointment, a novel, nonsteroidal phosphodiesterase 4

- (PDE4) inhibitor for the topical treatment of atopic dermatitis (AD) in children and adults. *J. Am. Acad. Dermatol.* 75, 494-503.
13. Tom, WL., Van Syoc, M., Chanda, S. and Zane, LT. (2016) Pharmacokinetic Profile, Safety, and Tolerability of Crisaborole Topical Ointment, 2% in Adolescents with Atopic Dermatitis: An Open-Label Phase 2a Study. *Am. J. Clin. Dermatol.* 33, 150-159.
 14. Zane, LT., Chanda, S., Jarnagin, K., Nelson, DB., Spelman, L. and Gold, LS. (2016a) Crisaborole and its potential role in treating atopic dermatitis: overview of early clinical studies. *Drug Evaluation.* 8, 853-866.
 15. Zane, LT., Hughes, MH. and Shakib, S. (2016b) Tolerability of Crisaborole Ointment for Application on Sensitive Skin Areas: A Randomized, Double-Blind, Vehicle-Controlled Study in Healthy Volunteers. *Am. J. Clin. Dermatol.* 17, 519-526.
 16. Honma, S., Shinohara, M., Takahashi, N., Nakamura, K., Hamano, S., Mitazaki, S., Abe, S. and Yoshida, M. (2014) Effect Of Cyclooxygenase (Cox)-2 Inhibition On Mouse Renal Interstitial Fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 578-583.
 17. Yuan, Y., Li, S., Mo, F., and Zhong D. (2006). Tolerability of Crisaborole Ointment for Application on Sensitive Skin Areas: A Randomized, Double-Blind, Vehicle-Controlled Study in Healthy Volunteers. *Int. J. Pharm.* 32, 17-23.
 18. Jantharaprapap, R. and Stagni, G. (2007) Effects of penetration enhancers on in-vitro permeability of meloxicam gels. *Int. J. Pharm.* 343, 26-33.
 19. Ah, YC., Choi, JK., Choi, YK., Ki, HM. and Bae, HA. (2010) A novel transdermal patch incorporating meloxicam: in vitro and in vivo characterization. *Int. J. Pharm.* 385, 12-19.

20. Kasliwal, N., Derle, D., Negi, J and Gohil, K. (2008) Effect of permeation enhancers on the release and permeation kinetics of meloxicam gel formulations through rat skin. *J. Pharm. Sci.* 19, 3-9.
21. Ruiz, MA., Lopez, J., Benavides, MM., Dios, J. and Gallardo, V. (2007) Rheological behavior of gels and meloxicam release. *Int. J. Pharm.* 333, 17-23.
22. Yuan, Y., Chen, X. and Zhong, D. (2007a) Determination of meloxicam in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry following transdermal administration. *J. Chromatogr.* 852, 650-654.
23. Yuan, Y., Li, S., Yu, L., Dang, P. and Zhong, D. (2007b) Physicochemical properties and evaluation of microemulsion systems for transdermal delivery of meloxicam. *Chem. Res. Chin. Univ.* 23, 81-86.
24. Kumari, A., Yadav, SK. and Yadav, SC. (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids. Colloids Surf., B. Biointerfaces.* 75, 1-18.
25. Ianiski, F., Alves, C., Souza, A., Pinton, S., Roman, S., Rhoden, C., Alves, M. and Luchese, C. (2012) Protective effect of meloxicam-loaded nanocapsules against amyloid- β peptide-induced damage in mice. *Behav. Brain. Res.* 230, 100-107.
26. Villalba, B., Ianiski, F., Wilhelm, E., Fernandes, R., Alves, M. and Luchese, C. (2014) Meloxicam-loaded nanocapsules have antinociceptive and antiedematogenic effects in acute models of nociception. *Life. Science.* 115, 36-43.
27. Ianiski, FR., Silva, FD., Wilhelm, EA., Fernandes, RS., Alves, MP., Duarte, Mmmf. and Luchese C. (2016a) Enhanced anti-inflammatory benefits of meloxicam-loaded lipid-core nanocapsules in a mouse pleurisy model: A comparative study with a free form drug. *J. Appl. Biomed.* 14, 105-112.

28. Ianiski, FR., Alves, C.B., Ferreira, C.F., Rech, VC., Savegnago, L., Wilhelm, EA. and Luchese, C . (2016b) Meloxicam-loaded nanocapsules as an alternative to improve memory decline in an Alzheimers disease model in mice: involvement of Na⁺, K⁺-ATPase. *Metab. Brain. Dis.* 31, 793-802.
29. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, P., Ammoury, N. and Benita, S. (1989) Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. *Int. J. Pharm.* 55, 1-4.
30. Chan, C., Liou, C., Xu, P., Shen, J., Kuo, M., Len, W., Chang, L. and Huang, W. (2013) Effect of dehydroepiandrosterone on atopic dermatitis-like skin lesions induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in mouse. *J. Dermatol. Sci.* 72, 149-157.
31. Park, G. and Sook, OHM. (2014) Inhibitory effects of Juglans mandshurica leaf on allergic dermatitis-like skin lesions-induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* 66, 97-101.
32. Kim, H., Kim, J., Kang, H., Choi, J., Yang, H., Lee, P., Kim, J. and Lee, K. (2014) 7,8,4'-Trihydroxyisoflavone Attenuates Dncb-Induced Atopic Dermatitis-Like Symptoms In Nc/Nga Mice. *PLoS ONE.* 8, e104938.
33. Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T. and Fujikura, T. (1983) Assay Method For Myeloperoxidase In Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Anal. Biochem.* 132, 345-352.
34. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) Assay For Lipid Peroxides In Animal Tissues By Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
35. Ellman, L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
36. Bradford, M. (1976) A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principles Of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

37. Sivaranjani, N., Rao, SV. and Rajeev, G. (2013) Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *J. Clin. Diagn.* 7, 2683-2685.
38. Fang, L., Cheng, C., Hwang, T., Huang, W., Liou, C., Chen, W. and Wu, S. (2015) Danggui Buxue Tang Inhibits 2,4-Dinitrochlorobenzene: Induced Atopic Dermatitis In Mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 1, 1-10.
39. Lin, G., Gao, S., Cheng, J., Li, Y., Shan, L. and Hu, Z. (2015) 1 β -Hydroxylantolactone, A Sesquiterpene Lactone From *Inula Japonica*, Attenuates Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions Induced By 2,4-Dinitrochlorobenzene In The Mouse. *Pharm. Biol.* 54, 516-522.
40. Yoon, H., Jang, M., Kim, H., Song, D., Nam, K-Il., Bae, C., Kim, S., Lee, S., Ku, C., Jang, D-II and Ahn, B. (2015) Protective Effect Of Diet Supplemented With Rice Prolamin Extract Against Dncb-Induced Atopic Dermatitis In Balb/C Mice. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 1-7.
41. Kim, C., Kang, M., Lee, Y., Min, W., Kim, Y., Kang, S., Song, C., Park, S., Park, J., Han, C., Lee, J. and Ku, S. (2015) Bathing Effects Of Various Seawaters On Allergic (Atopic) Dermatitis-Like Skin Lesions Induced By 2,4-Dinitrochlorobenzene In Hairless Mice. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 66, 1-25.
42. Park, G. and Sook Oh, M. (2014) Inhibitory Effects Of *Juglans Mandshurica* Leaf On Allergic Dermatitis-Like Skin Lesions-Induced By 2,4-Dinitrochlorobenzene In Mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* 66, 97-101.
43. Odobasic, D., Kitching, AR. and Holdsworth, S. R. (2016). Neutrophil-Mediated regulation of innate and adaptive immunity: the role of myeloperoxidase. *J. Immunol. Res.* 2016, 1-11.

44. Mazario, J., Gaitan, G. and Herrero, J.F., (2001). Cyclooxygenase-1 vs. cyclooxygenase-2 inhibitors in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. *Neuropharmacol.* 40, 937-946.
45. Li, W., Wu, X., Xu, X., Wang, W., Song, S., Liang, K., Yang, M., Guo, L., Zhao, Y. and Li, R. (2016) Coenzyme Q10 Suppresses TNF- α -Induced Inflammatory Reaction In Vitro And Attenuates Severity Of Dermatitis In Mice. *Inflammation.* 39, 281-289.
46. Ianiski, F., Silva, F., Wilhelm, E., Fernandes, R., Alves, M., Duarte, M. and Luchese, C. (2015) Enhanced Anti-Inflammatory Benefits Of Meloxicam-Loaded Lipid-Core Nanocapsules In A Mouse Pleurisy Model: A Comparative Study With A Free Form Drug. *J. Appl. Biomed.* 14, 105-112.
47. Badran, M.M., Taha, E.I., Tayel, M.M. and Al-Suwayeh, S.A. (2014) Ultra-Fine Self Nanoemulsifying Drug Delivery System For Transdermal Delivery Of Meloxicam: Dependency On The Type Of Surfactants. *J. Mol. Liq.* 190, 16-22.
48. Bernardi, A., Braganhol, E., Jäger, E., Figueiró, F., Edelweiss, M.I., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. and Battastini, A.M. (2009a). Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer. Lett.* 18, 53-63.
49. Bernardi, A., Zilberstein, A., Jager, E., Campos, M.M., Morrone, F.B., Calixto, J.B., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. and Battastini, A.M.O. (2009b). Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. *Br. J. Pharmacol.* 158, 1104-1111.
50. Bernardi, A., Frozza, R.L., Horn, A.P., Campos, M.M., Calixto, J.B., Salbego, C., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. and Battastini, A.M.. (2010) Protective effects of indomethacin-loaded nanocapsules against oxygen-glucose deprivation in

organotypic hippocampal slice cultures: Involvement. of neuroinflammation. *Neurochem. Int.* 57, 629-636.

51. Khachane, P., Date, A.A. and Nagarsenker, M.S. (2011) Positively charged polymeric nanoparticles: application in improving therapeutic efficacy of meloxicam after oral administration. *DiePharmazie.* 66, 334-338.
52. Wissing, S.A. and Müller, R. H. (2003) The Influence Of Solid Lipid Nanoparticles On Skin Hydration And Viscoelasticity - In Vivo Study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 67-72.

Legend of figures

Figure 1 - Scheme of experimental protocol. The dorsal skin of mice was shaved and sensitized with topical 0.5 % DNCB on days 1-3. Next, the mice were challenged with 1% DNCB at dorsal skin on days 14, 17, 20, 23, 26, and 29, and the right ear on days 14-29. Mice were treated with a topical application (0,5 g) of free meloxicam (M-F), blank nanocapsules (B-NC) or meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC) on days 14-29. Finally, mice were sacrificed on day 30.

Figure 2 - Effect of meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC), free meloxicam (M-F) or blank nanocapsules (B-NC) on DNCB-induced AD-like symptoms in mice. (a) Images of skin and ear lesions from the groups of mice taken on the last day of the experiment (day 30) (b) Skin lesions scores evaluated on day 30. Data represent the mean $\pm$ standard deviation (S.D) (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls' test). (*) $p < 0.05$ compared to the control group, (#) $p < 0.05$ compared to the DNCB group and (&) $p < 0.05$ compared to the M-F.

Figure 3 - Effect of meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC), free meloxicam (M-F) or blank nanocapsules (B-NC) on DNCB-induced scratching behavior. Scratching time was evaluated on day 30. Data represent the mean $\pm$ standard deviation (S.D.) (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls' test). (*) $p < 0.05$ compared to the control group, (#) $p < 0.05$ compared to the DNCB group and (&) $p < 0.05$ compared to the M-F.

Figure 4 - Effect of meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC), free meloxicam (M-F) or blank nanocapsules (B-NC) on DNCB-induced inflammatory parameters in mice: (a) edema (day 30) and (b) myeloperoxidase (MPO) activity in the ears of mice. Data represent the mean $\pm$ standard deviation (S.D.) (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls' test). (*) $p < 0.05$ compared to the control group, (#) $p < 0.05$ compared to the DNCB group and (&) $p < 0.05$ compared to the M-F. < 0.05 compared to the DNCB group and &p < 0.05 compared to the F-M group.

Figure 5 - Effect of meloxicam-loaded nanocapsules (M-NC), free meloxicam (M-F) or blank nanocapsules (B-NC) on DNCB-induced oxidative stress parameters in mice: (a) levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and (b) non-protein thiol (NPSH) in the dorsal skins of mice. Data represent the mean $\pm$ standard deviation (S.D.) (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls' test). (*) $p < 0.05$ compared to the control group.

Figure 1

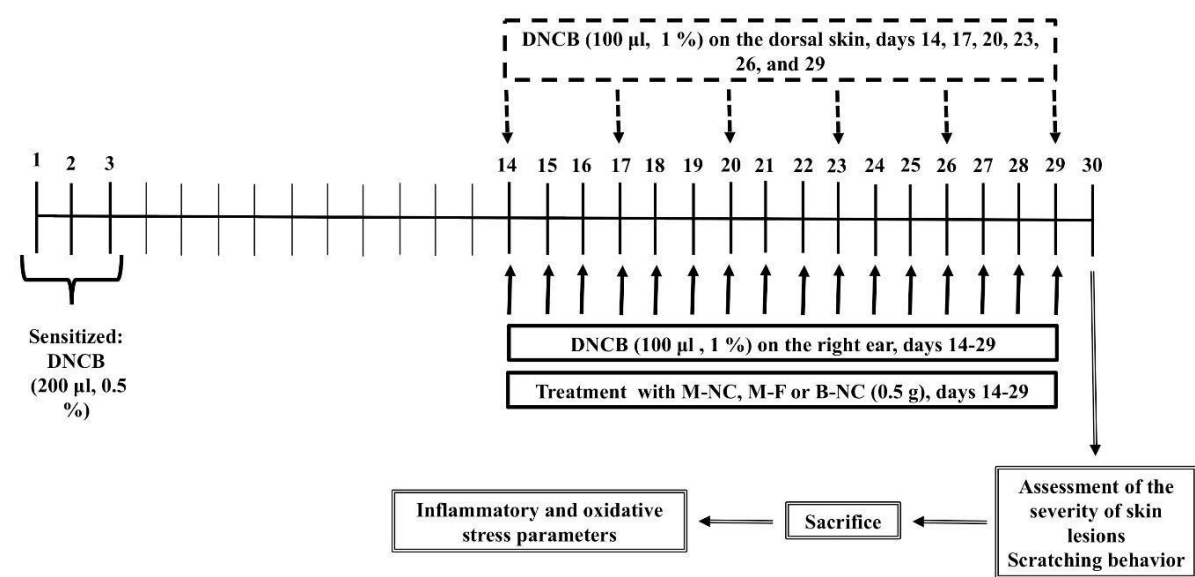
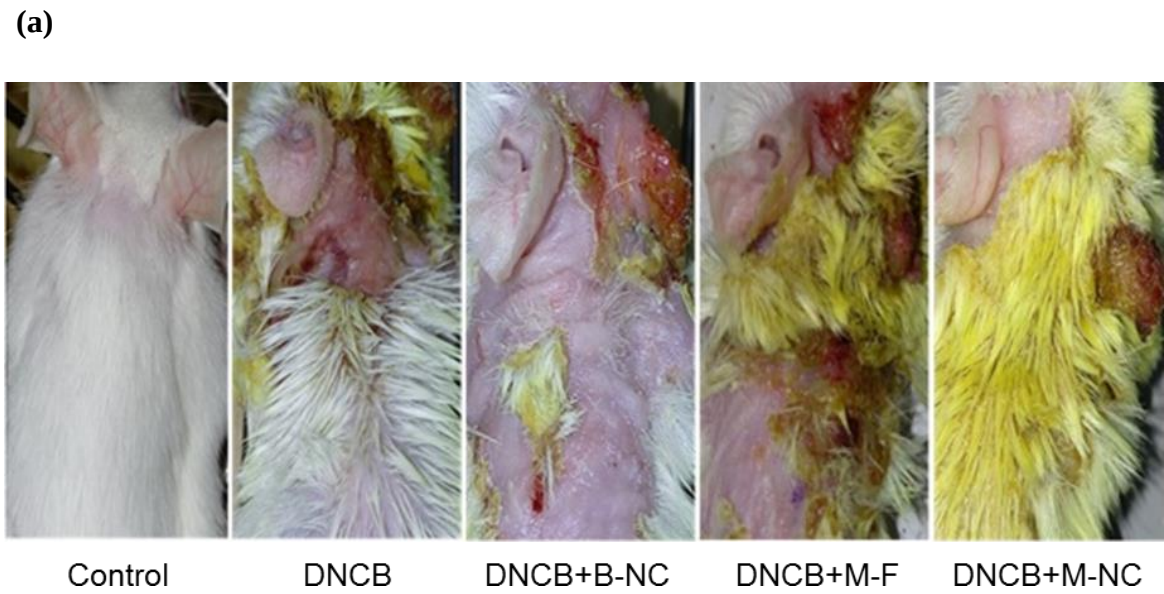


Figure 2



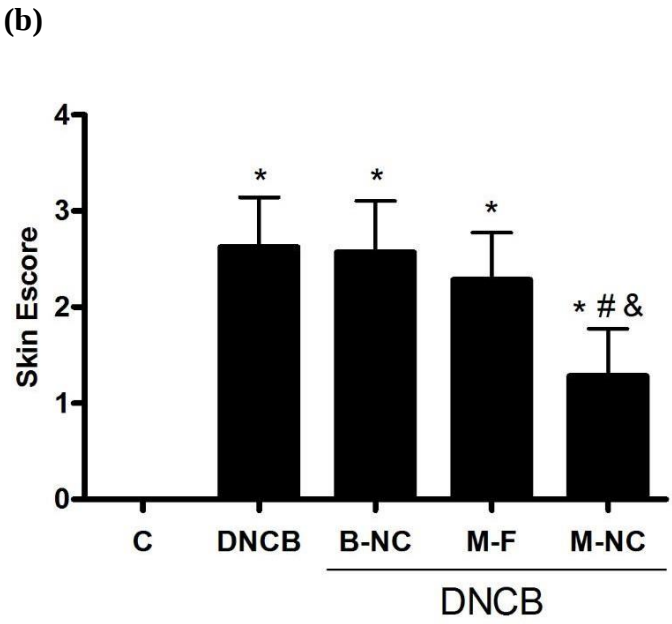


Figure 3

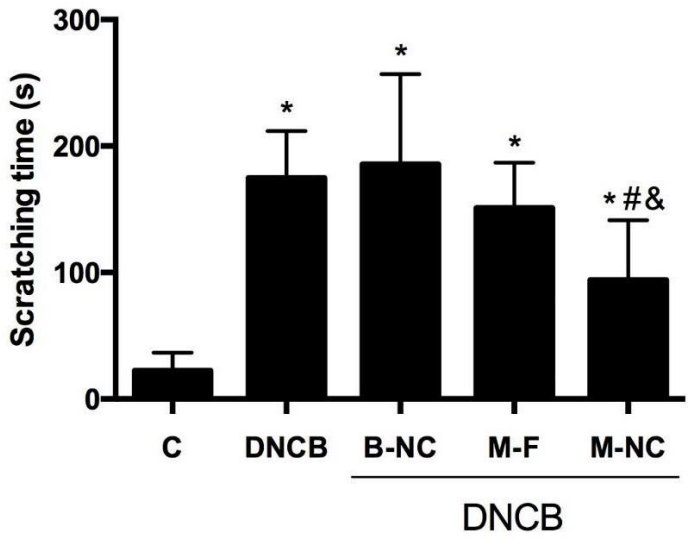


Figure 4

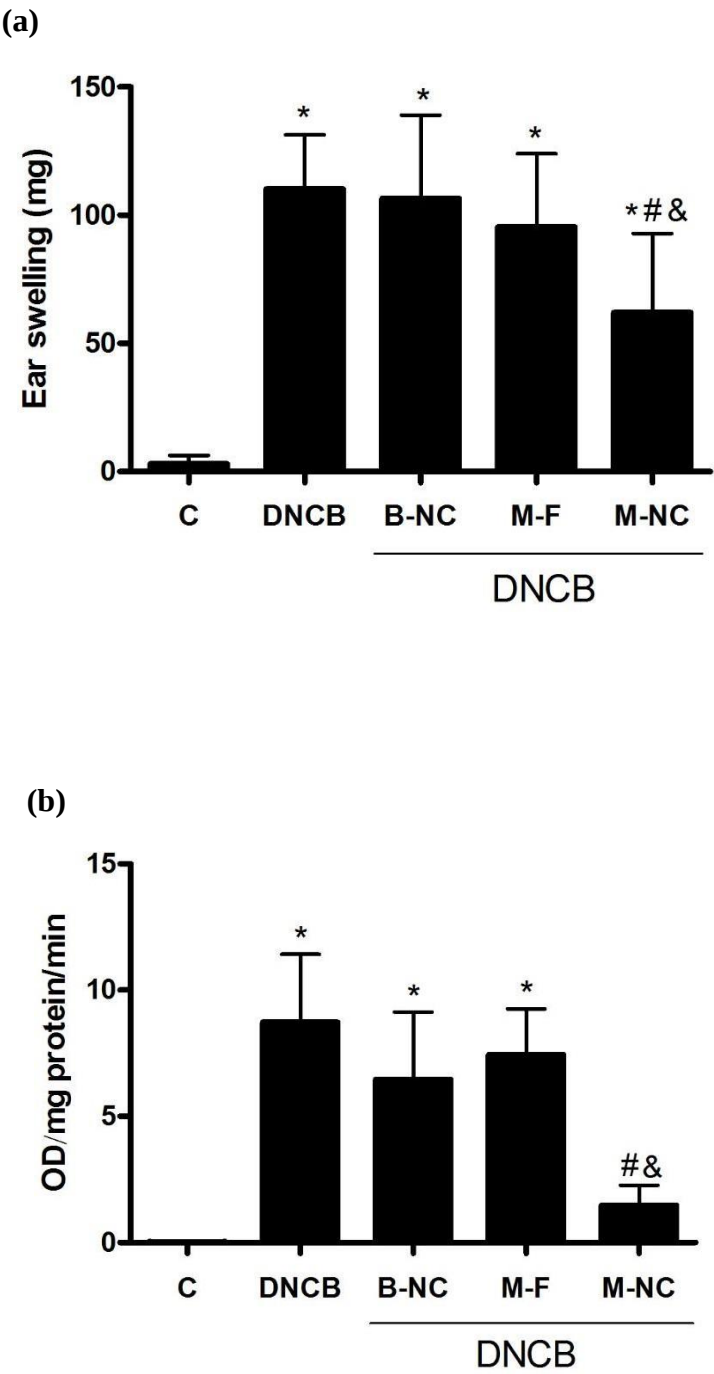
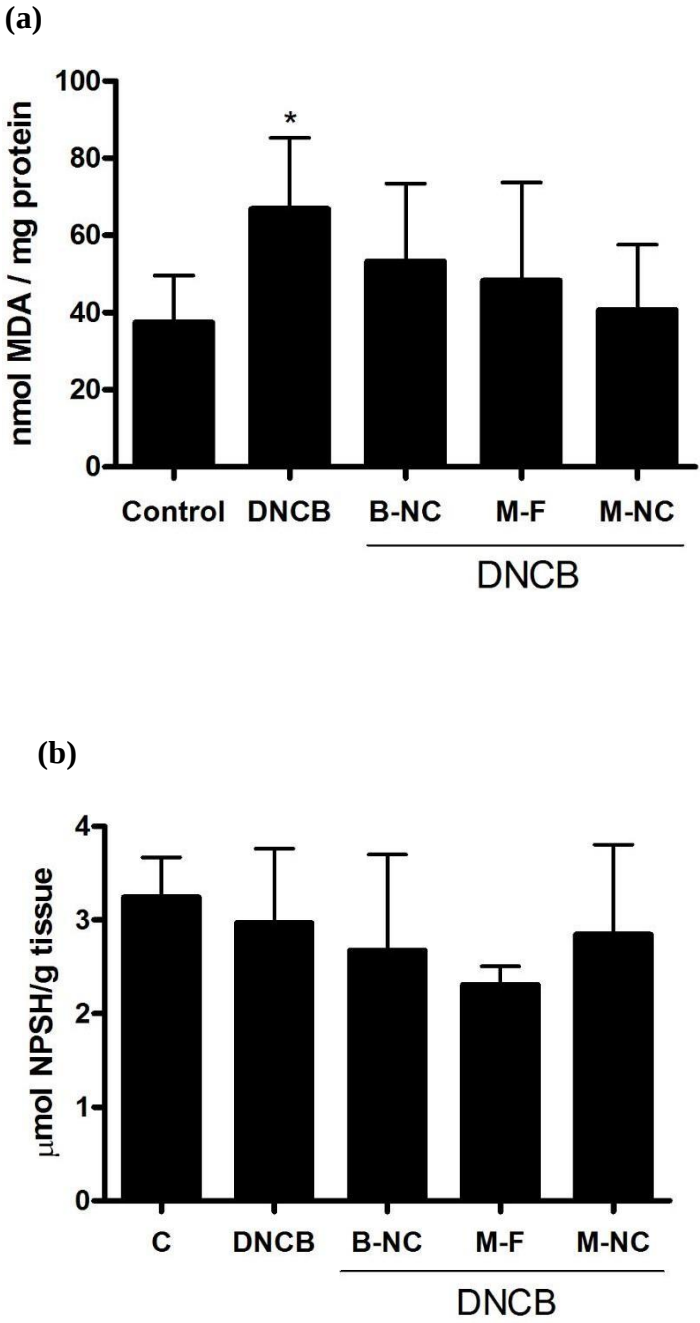


Figure 5



5. CONCLUSÃO

- As nanocápsulas contendo meloxicam reduziram os sintomas da DA induzida por DNCB em camundongos.
- O tratamento tópico com as nanocápsulas de meloxicam reduziram a resposta inflamatória induzida por DNCB.
- O parâmetros oxidativos induzidos por DNCB não foram afetados pelo tratamento com as nanocápsulas de meloxicam.
- As nanocápsulas contendo meloxicam demonstraram um efeito farmacológico superior quando comparado ao meloxicam livre no tratamento da DA induzida por DNCB.

PERSPECTIVAS

Mais estudos são necessários para investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito protetor exercido pelas nanocápsulas contendo meloxicam no modelo de DA. Além disso, é preciso determinar se há o envolvimento da COX- 2 na ação anti-inflamatória das nanocápsulas contendo meloxicam e qual o possível efeito tóxico dessas nanopartículas em animais.

REFERÊNCIAS

- ADAIR, H., PARETTE P., ALTINOGLU, I., KESTER M. Nanoparticulate alternatives for drug delivery. **American Chemical Society Nano**, v. 4, 4967-4970, 2010.
- ADDOR, F., TAKAOAKA, R., RIVITTI, E., AOKI, V. Atopic dermatitis: correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 6, p. 672-676, 2012.
- AH, Y., CHOI, J., CHOI, Y., KI, H., BAE, J., A novel transdermal patch incorporating meloxicam: In vitro and in vivo characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 2, p. 12-19, 2010.
- AHAD, A., RAISH, M., AL-MOHIZEA, A., AL-JENOABI, F., ALAM, M. Enhanced anti-inflammatory activity of carbopol loaded meloxicam nanoethosomes gel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.67, p. 99-104, 2014.
- AKRAM, M., SHIN, J., KIM, K., NOH, D., BAEK, S., CHANG, S., KIM, H, BAE, O. A newly synthesized macakurzin C-derivative attenuates acute and chronic skin inflammation: The Nrf2/heme oxygenase signaling as a potential target. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 307, n. 1, p. 62-71, 2016.
- AUBERT-WASTIAUX, H., MORET, L., LE RHUN, A., FONTENOY, A., NEGUYEN, J., LEUX, C., MISERY, L., YOUNG, P., CHASTAING, M., DANOU, N., LOMBRIL, P., BORALEVI, F., LACOUR, J., MAZEREEUW-HAUTIER, J., STALDER, J., BARBAROT, S. Topical corticosteroid phobia in atopic dermatitis: a study of its nature, origins and frequency. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 4, p. 808-814, 2011.
- ASGHAR, W., JAMALI, F. The effect of COX-2-selective meloxicam on the myocardial, vascular and renal risks: a systematic review. **Inflammopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1-16, 2015.
- BAE, J., CHOI, Y., PARK, C., CHUNG, K., LEE, K. Efficacy of allergen-specific immunotherapy for atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 1, p. 110-117, 2013.
- BANDIER, J., JOHANSEN, J., PETERSEN, L., CARLSEN, B. Skin pH, atopic dermatitis, and filaggrin mutations. **Dermatitis**, v. 25, n. 3, 127-129, 2014.
- BANTZ, K., ZHU, Z., ZHENG, T. The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 5, n. 2, p. 1-16, 2014.
- BAPNA, M., CHAUHANL. The ambidextrous cyclooxygenase: an enduring target. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v. 13, n.6, p. 387-392, 2015.
- BELTANI, V. The role of house dust mites and other aeroallergens in atopic dermatitis. **Clinics in Dermatology**, v. 21, n. 3, p. 177-182, 2003.
- BHATTACHARYA, S., LI, S., WHEELER, H., WANG, R., LOHR, C., LEID, M., GANGULI-INDRA, G., INDRA, A. Ablation of Ctip2/Bcl11b in adult epidermis

enhances TPA/UV induced proliferation and increases susceptibility to DMBA/TPA induced epidermal carcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, *in press*, 2017.

BIEBER, T. Atopic Dermatitis. **Annales de dermatologie et de venereologie**, v. 22, n. 2, p. 125-137, 2010.

BIEBER, T., CORK, M., REITAMO, S. Atopic dermatitis: a candidate for disease-modifying strategy Allergy. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 67, n. 8, p. 969-975, 2012.

BISWAS, S. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 1, p. 1-9. 2016.

BLUME-PEYTAVI, U., WAHN, U. Optimizing the treatment of atopic dermatitis in children: a review of the benefit/risk ratio of methylprednisolone aceponate. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 5, p. 508-515, 2011.

BRUIN WELLER, M., KNULST, A., MEIJER, Y., BRUIJNZEEL-KOOMEN, C., PASMANS, S. Evaluation of the child with atopic dermatitis. **Clinical e Experimental Allergy**, v. 42, n. 3, p. 352-362, 2012.

BREUER, K.; HERATIZADEH, A.; WULF, A.; BAUMANN, U.; CONSTIEN, A.; TETAU, D.; KAPP, A.; WERFEL, T. Late eczematous reactions to food in children with atopic dermatitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, n. 5, p. 817-824, 2004.

CARR, B., WRIGHT, M. Nanoparticle Tracking Analysis. A Review of Applications and Usage 2010-2012. **NanoSight Ltd**, v. 1, n. 1, p. 5-27, 2012.

CARR, W. Topical Calcineurin Inhibitors for Atopic Dermatitis: Review and Treatment Recommendations. **Pediatric Drugs**, v. 15, n. 4, p. 303-310, 2013.

CHAN, C., LIOU, C., XU, P., SHEN, J., KUO, M., LEN, W., CHANG, L., HUANG, W. Effect of dehydroepiandrosterone on atopic dermatitis-like skin lesions induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in mouse. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n.1, p. 149-157, 2013.

COMOGLUAT, T., ARISOY, S., AKKUS, Z. Nanocarriers For Effective Brain Drug Delivery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 8, p. 1-8, 2016.

DA VEIGA, S. Epidemiology of atopic dermatitis: a review. **Allergy & Asthma Proceedings**, v. 33, n. 3, p. 227-234, 2012.

DARSOW, U., WOLLENBERG, A., SIMON, D., TAIEB, A., WERFEL, T., ORANGE, A., GELMETTI, C., SVENSSON, A., DELEURAN, M., CALZA, A., GIUSTI, F., SEIDENARJ, S., RING, J., EUROPEAN TASK FORCE ON ATOPIC DERMATITIS/EADV ECZEMA TASK FORCE. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 3, p. 317-328, 2010.

DE BENEDETTO, A., KUBO, A., BECK, A. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? **Journal of Investigative Dermatology**, v.123, n. 3, p. 949-963, 2012.

DHARMAGE, S., LOWE, A., MATHESON, J., BURGESS, K., ALLEN, K., ABRAMSON, M. Atopic dermatitis and the atopic march revisited. **Allergy**, v. 69, n. 1, p. 17-27, 2014.

DHUL, D., BHATEJA, D., DHULL, R., PADI, S. Differential role of cyclooxygenase isozymes on neuronal density in hippocampus CA1 region of intracerebroventricular streptozotocin treated rat brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 43, n. 1, p. 48-51, 2012.

EROGLU, H., BURUL-BOZKURT, N., UMA, S., ONER, L. Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation of Microparticle Formulations Containing Meloxicam. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, p. 46-52, 2012.

EICHENFIELD, F., TOM, W., CHAMLIN, S., FELDMAN, S., HANIFIN, J., SIMPSON, E., BERGER, T., BERGMAN, J., COHEN, D., COOPER, K., CORDORO, K., DAVIS, D., KROL, A., MARGOLIS, D., PALLER, A., SCHWARZENBERGER, K., SILVERMAN, R., WILLIAMS, H., ELMETS, C., BLOCK, J., HARROD, C., SMITH, W., SIDBURY, R. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 2, p. 338-351, 2014.

ELLIS, C., DRAKE, L., PRENDERGAST, M., ABRAMOVITS, W., BOGUNIEWICZ, M., DANIEL, C., LEBWOHL, M., STEVENS, S., WHITAKER-WORTH, D., CHENG, J., TONG, K. Cost of atopic dermatitis and eczema in the United States. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 46, n. 3, p. 361-370, 2002.

ESPARZA-GORDILLO, J., WEIDINGER, S., FÖLSTER-HOLST, R., BAUERFEIND, A., RUSCHENDORF, F., PATONE, G., ROHDE, K., MARENHOLZ, L., SCHULZ, F., KERSCHER, T., HUBNER, N., WAHN, U., SCHREIBER, S., FRANKE, A., VOGLER, R., HEATH, S., BAURECHT, H., NOVAK, N., RODRIGUEZ, E., ILLIG, T., LEE-KIRSCH, M., CIECHANOWICZ, A., KUREK, M., PISKACKOVA, T., MACEK, M., LEE, Y., RUETHER, A. A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. **Nature Genetics**, v. 41, n. 5, p. 596-601, 2009.

ESPERGEL, J., PALLER, A. Atopic dermatitis and the atopic march. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 6, p. 118-127, 2003.

ESPERGEL, J. Epidemiology of atopic dermatitis and atopic march in children. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 269-280, 2010.

FANG, L., CHENG, C., HWANG, T., HUANG, W., LIOU, C., CHEN, W., WU, S. Danggui Buxue Tang Inhibits 2,4-Dinitrochlorobenzene: Induced Atopic Dermatitis In Mice. **Evidence Based Complementary and alternative Medicine**, v. 1, n.1 p. 1-10, 2015.

FLOHR, C., MANN, J. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. **Allergy**, v. 69, n.3 p. 3-16, 2014.

FRIEDRICH, R., CORADINI, K., FONSECA, F., GUTERRES, S., BECK, R., POHLMANN., Lipid-Core Nanocapsules Improved Antiedematogenic Activity of Tacrolimus in Adjuvant-Induced Arthritis Model. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n.1, 1265-1274, 2016.

GITTLER, J., SHEMER, A., SUÁREZ-FARIÑAS, M., FUENTES-DUCULAN, J., GULEWICZ, J., WANG, Q., MITSUI, H., CARDINALE, I, DE GUZMAN STRONG, C., KRUEGER, J., GUTTMAN-YASSKI, E. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 6, p. 1344-1354, 2012.

GITTLER, J., WANG, J., ORLOW, S. Bathing and Associated Treatments in Atopic Dermatitis. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 18, n. 1, p. 45-57, 2017.

GRABOWSKI, N., HILLAIREAU, H., VERGNAUD-GAUDUCHON, J., NICOLAS, V., TSAPIS, N., Kerdine-Römer S., FATTAL, E. Surface-Modified Biodegradable Nanoparticles' Impact on Cytotoxicity and Inflammation Response on a Co-Culture of Lung Epithelial Cells and Human-Like Macrophages. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 1, p. 135-146, 2016.

GOTTLIEB, A. Therapeutic options in the treatment of psoriasis and atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 1, p. 3-16, 2005.

GUILHERME, A., CARVALHO, B., DINIZ, B., BIANCO, B., ANDRADE, T., ARAÚJO, L. Abordagem da dermatite atópica na infância pelo Médico de Família e Comunidade. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 9, n. 31, p. 159-168, 2014.

GUTERRES, S., ALVES, M., POLHMANN, A. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drugs Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HANIFIN, J.; RAJKA, G. Diagnostic features of atopic dermatitis. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 92, n. 1, p. 44-47, 1980.

HANIFIN, J.; COOPER, K.; HO, V.; KANG, S.; KRAFCHIK, B.; MARGOLIS, D.; SCHACHNER, L.; SIDBURY, R.; WHITMORE, S.; SIECK, C.; VAN VOORHEES, A. "Guidelines of care for atopic dermatitis, developed in accordance with the American Academy of Dermatology (AAD)/American Academy of Dermatology Association "Administrative Regulations for Evidence Based Clinical Practice Guidelines". **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 50, n. 3, p. 391-404, 2004.

HENGGE, R., RUZICKA, T., SCHWARTZ, R., CORK, M. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 1, p. 1-15, 2006.

HUSSAIN, Z., KATAS, H., MOHD, M., KUMOLOSASI, E., SAHUDIN, S. Downregulation of immunological mediators in 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions by hydrocortisone-loaded chitosan nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 5143-5156, 2014

IANISKI, F., ALVES, C., SOUZA, A., PINTON, S., ROMAN, S., RHODEN, C., ALVES, M., LUCHESE, C. Protective effect of meloxicam-loaded nanocapsules against amyloid- β peptide-induced damage in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 230, p. 100-107, 2012.

IANISKI, F., ALVES, C., FERREIRA, C., RECH, V., SAVEGNAGO, L., WILHELM, E., LUCHESE, C. Meloxicam-loaded nanocapsules as an alternative to improve memory decline in an Alzheimer's disease model in mice: involvement of Na⁺, K⁺-ATPase. **Metabolic Brain Disease**, v. 31, n. 4, p. 793-802, 2016

IANISKI, F., DA SILVA, F., WILHELM, E., FERNANDES, S., ALVES, M., FRESCURA DUARTE, M., LUCHESE, C. Enhanced anti-inflammatory benefits of meloxicam-loaded lipid-core nanocapsules in a mouse pleurisy model: A comparative study with a free form drug. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 14, n. 1, p. 105-112, 2016.

JANTHARAPRAPAP, R., STAGNI, G. Effects of penetration enhancers on in vitro permeability of meloxicam gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n. 1-2, p. 26-33, 2007.

JARNAGIN, K., CHANDA, S., CORONADO, D., CIARAVINO, V., ZANE, L., GUTTMAN-YASSKY, E., LEBWOHL, M. Crisaborole Topical Ointment, 2%: A Nonsteroidal, Topical, Anti-Inflammatory Phosphodiesterase 4 Inhibitor in Clinical Development for the Treatment of Atopic Dermatitis. **Journal of drugs in dermatology**, v. 15, n. 4, p. 390-396, 2016.

JOLLIET, P., SIMON, N., BRÉE, F., URIEN, S., PAGLIARA, A., CARRUPT, P.A., TESTA, B., TILLEMENT, J. Blood-to-brain transfer of various oxicams: effects of plasma binding on their brain delivery. **Pharm Res.** v. 14, n. 5, p. 650-656, 1997.

JUNGERSTED, J., SCHEER, H., MEMPEL, M., BAURECHT, H., CIFUENTES, L., HOGH, J., HELLGREN, L., JEMEC, G., AGNER, T., WEIDINGER, S. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. **Allergy**, v. 65, n. 7, p. 911-918, 2010.

KASEMSARN, P., BOSCO J., NIXON, R. The Role of the Skin Barrier in Occupational Skin Diseases. **Current Problems in Dermatology**, v. 49, n. 1, p. 135-43, 2016.

KASLIWAL, N., DERLE, D., NEGI, J., GOHIL, K. Effect of permeation enhancers on the release and permeation kinetics of meloxicam gel formulations through rat skin. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 3193-3199, 2008.

KATAYAMA, I., KOHNO, Y., AKIYAMA, K., IKEZAWA, Z., KONDO, N., TAMAKI, K., KOURO, O. Japanese Guideline for Atopic Dermatitis. **Allergology International**, v. 60, n.2, p. 205-220, 2011.

KATAYAMA, I.; KOHNO, Y.; AKIYAMA, K.; AIHARA, M.; KONDO, N.; SAEKI, H.; SHOJI, S.; YAMADA, H.; NAKAMURA, K.; JAPANESE SOCIETY OF ALLERGOLOGY. Japanese Guideline for Atopic Dermatitis 2014. **Allergology International**, v. 63, n. 3, p. 377-398, 2014.

KEMP, A. Cost of illness of atopic dermatitis in children: a societal perspective. **PharmacoEconomics**, v. 21, n. 2, p. 105-113, 2003.

KIM, J., KIM, H., LEW, B., HONG, S., JANG, Y., PARK, K., SEO, S., BAE, J., CHOI, E., SUHR, K., LEE, S., KO, H., PARK, Y., SON, S., SEO, Y., LEE, Y., CHO, S., PARK, C., ROH, J. Consensus Guidelines for the Treatment of Atopic Dermatitis in Korea (Part I): General Management and Topical Treatment. **Annals of Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 563-577, 2015.

KIM, G., LEE, S., PARK, Y., SHIN, D., PARK, G., PARK, C. Immunosuppressive effects of fisetin against dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, n. 1, p. 341-349, 2014.

KONSTANTINIDOU, M., GKERMANI, A., HADJIPAVLOU-LITINA, D. Synthesis and Pharmacochimistry of New Pleiotropic Pyrrolyl Derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16354-16374, 2015.

KU, J., HONG, S., KIM, H., SEO, H., SHIN, Y., KO, S. Effects of Angelicae dahuricae Radix on 2, 4-Dinitrochlorobenzene-Induced Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in mice model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017.

KUMARI, A., YADAV, K., YADAV, C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LANGAN, S.; SILCOCKS, P.; WILLIAMS, H. What causes flares of eczema in children? **British Journal of Dermatology**, v. 161, n. 13, p. 640-646, 2009.

LEUNG, Y., BIEBER, T. Atopic Dermatitis. **The Lancet**, v. 361, n. 9352, p. 151-160, 2003.

LEE, J., CHOI, Y., KIM, M., HAN, J., LEE, J., KIM, E., HONG, J., KIM, J., YANG, W. Topical Application of Angelica sinensis Improves Pruritus and Skin Inflammation in Mice with Atopic Dermatitis-Like Symptoms. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 1, p. 98-105, 2016.

LIM, S., KIM, M., RANDY, A., NAM, E., NHO, C. Effects of Hovenia dulcis Thunb. extract and methyl vanillate on atopic dermatitis-like skin lesions and TNF- α /IFN- γ

induced chemokines production in HaCaT cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 11, p. 1465-1479, 2016.

LIN, G., GAO, S., CHENG, J., LI, Y., SHAN, L., HU, Z. 1 β -Hydroxyalantolactone, A Sesquiterpene Lactone From *Inula Japonica*, Attenuates Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions Induced By 2,4-Dinitrochlorobenzene In The Mouse. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 516-522, 2015.

LINO, H., FUJII, M., FUJINO, M., KOHARA, S., HASHIZAKI, K., KIRA, H., KOIZUMI, N., WATANABE, Y., OTOGUCHI, N. Influence of Characteristics of Oily Vehicle on Skin Penetration of Ufenamate. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 220-226, 2017.

LONGO, G.; BERTI, I.; BURKS, A.; KRAUSS, B.; BARBI, E. IgE-mediated food allergy in children. **The Lancet**, v. 382, n. 9905, p. 1656-1664, 2013.

LOPES, C., DUARTE, F., CORREIA, O., DELGADO, L. Atopic dermatitis, innate immunity, and infection. **Dermatology Online Journal**, v. 17, n. 8, p. 1-4, 2011.

LOWENAU, L., ZOSCHKE, C., BRODWOLF, R., VOLZ, P., HAUSMANN, C., WATTANAPITAYAKUL, S., BORAHAM, A., ALEXIEV, U., SCHAFER-KORTING, M. Increased permeability of reconstructed human epidermis from UVB-irradiated keratinocytes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 16, n. 1, p. 120-129, 2016.

MACK, S. Atopic dermatitis: an overview for the nurse practitioner. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, v. 16, n. 10, p. 451-454, 2004.

MARTINEZ, V., BELOEIL, H., MARRET, E., FLETCHER, D., RAVAUD, P., TRINQUART, L. Non-opioid analgesics in adults after major surgery: systematic review with network meta-analysis of randomized trials. **British Journal of Anaesthesia**, v. 118, n. 1, p. 22-31, 2017

MAYER, F.; ADORNE, M.; BENDER, E.; CARVALHO, T.; DILDA, A.; BECK, R.; GUTERRES, S.; GUGLIANI, R.; MATTE, U.; POHLMANN, A. Laronidase-Functionalized Multiple-Wall Lipid-Core Nanocapsules: Promising Formulation for a More Effective Treatment of Mucopolysaccharidosis Type I. **Journal of Pharmacy Research**, v. 32, n. 1, p. 941-954, 2015.

MCCOLLUM, A., PAIK, A., EICHENFIELD, L. The safety and efficacy of tacrolimus ointment in pediatric patients with atopic dermatitis. **Pediatric Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 425-436, 2010.

MELO, C., JUNIOR, A., FIALHO, S. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 469-477. 2012.

MENDONÇA, R., COCCO, R., SAMI, R., SOLÈ, D. Teste de provocação oral aberto na confirmação de alergia ao leite de vaca mediada por IgE: qual seu valor na prática clínica?. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 29, n. 3, p. 415-422, 2011.

MENON, G., CLEARY, G., LANE, M. The structure and function of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 3-9, 2012.

MIHM, M., SOTER, N., DVORAK, H., AUSTEN, K. The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 67, n. 3, p. 305-312, 1976.

MORA-HUERTAS, C. E., FESSI, H., ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 3 p.113-142, 2010.

MOUSLMANI, M., PATRA, B. Poly (9-(2-diallylaminoethyl) adenine HCl-co-sulfur dioxide) deposited on silica nanoparticles constructs hierarchically ordered nanocapsules: Curcumin conjugated nanocapsules as a novel strategy to amplify guanine selectivity among nucleobases. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, n. 1, p. 181-188, 2015.

MU, L., SPRANDO, R., Application of Nanotechnology in Cosmetics. **Pharmaceutical Research**, v.27, n. 1, p.1746-1749, 2010.

NAIDOO, R., WILLIAMS, H. Therapeutic use of stories for children with atopic eczema and other chronic skin conditions. **Pediatric Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 765-767, 2013.

NASSARRE, Q. Atopic dermatitis. **Revista Pediatría de Atención Primaria**, v. 11, n. 17, p. 317-329, 2009.

NAUMAN, K., MOHD, S., HARJOH, W., TIN, W. Nanocarriers and their Actions to Improve Skin Permeability and Transdermal Drug Delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 20, p. 2848-2866, 2015.

NQ, J., LIEW, H., ANG, S. Use of emollients in atopic dermatitis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 5, p. 854-857, 2015.

ODHIAMBO, J.A., WILLIAMS, H.C., CLAYTON, T.O., ROBERTSON, C.F., ASHER, M.I., ISAAC PHASE THREE STUDY GROUP. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 6, p. 1251-1258, 2009.

OH, J.; CONLAN, S.; POLLEY, E.; SEGRE, J.; KONG, H. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. **Genome Medicine**, v. 4, n. 10, p. 1-11, 2012.

OKUBO, K., KURONO, Y., FUJIEDA, S., OGINO, S., UCHIO, E., ODAJIMO, H., TAKENAKA, H., JAPANESE SOCIETY OF ALLERGOLOGY. Japanese Guideline for Allergic Rhinitis 2014. **Allergology International**, v. 63, n. 3, p. 357-375, 2014.

ON, R., LEE, S., KIM, S., HONG, W., KIM, H., NOMURA, T., SUZUKI, S., SHIMIZU, H., KIM, S. Filaggrin Mutation in Korean Patients with Atopic Dermatitis. **Yonsei Medical Journal**, v. 58, n. 2, p. 395-400, 2017.

OSKUZ, E., ATALAR, F., TANIRVERDI, G., BILIR, A., SHAHZADI, A., YAZICI, Z. Therapeutic potential of cyclooxygenase-3 inhibitors in the management of glioblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 126, n. 2, p. 271-278, 2016.

PALMER, B., DELOUISE, L. Nanoparticle-Enabled Transdermal Drug Delivery Systems for Enhanced Dose Control and Tissue Targeting. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 17-19, 2016.

PARK, G., SOOK OH, M. Inhibitory effects of Juglans mandshurica leaf on allergic dermatitis-like skin lesions-induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, p.97-101, 2014.

PASSOS, G., MEDEIROS, R., MARCON, R., NASCIMENTO, A., CALIXTO, J., PIANOWSKI, L. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, n. 1-3, p. 413-420, 2013.

PHAM, Q., BJÖRKLUND, S., ENGBLOM, J., TOPGAARD, D., SPARR, E. Chemical penetration enhancers in stratum corneum - Relation between molecular effects and barrier function. **Journal of Controlled Release**, v. 232, n. 1, p. 175-187, 2016.

PETERSON, T. In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 99, n. 2, p. 104-115, 2006.

RING, J., ALOMAR, A., BIEBER, T., DELEURAN, M., FINK-WAGNER, A., GELMETTI, C., GIELER, U., LIPOZENCIC, J., LUGER, T., ORANJE, A., SCHÄFER, T., SCHWENNESEN, T., SEIDENARI, S., SIMON, D., STÄNDER, S., STINGL, G., SZALAI, S., SZEPIETOWSKI, J., TAÏEB, A., WERFEL, T., WOLLEMBERG, A., DARSOW, U., EUROPEAN DERMATOLOGY FORUM (EDF), EUROPEAN ACADEMY OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY (EADV), EUROPEAN TASK FORCE ON ATOPIC DERMATITIS (ETFAD), EUROPEAN FEDERATION OF ALLERGY (EFA), EUROPEAN SOCIETY OF PEDIATRIC DERMATOLOGY (ESPD), GLOBAL ALLERGY AND ASTHMA EUROPEAN NETWORK (GA2LEN). Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) part II. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, n. 9, p. 1176-1193, 2012.

RUIZ, M., LÓPEZ-VIOTA, G., DE BENAVIDES, M., DE DIOS GARCIA, J., GALLARDO, V. Rheological behavior of gels and meloxicam release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, n. 2, p. 17-23, 2007.

RYAN, C., SHAW, R., COCRERELL, C., HAND, S., GHALI, F. Novel sodium hypochlorite cleanser shows clinical response and excellent acceptability in the treatment of atopic dermatitis. **Pediatric Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 308-315, 2013.

SAEKI, H., NAKAHARA, T., TANAKA, A., KABASHIMA, K., SUGAYA, M., MUROTA, H., EBIHARA, T., KATAOKA, Y., AIHARA, M., ETOH, T., KATOH, N., COMMITTEE FOR CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF ATOPIC DERMATITIS OF JAPANESE DERMATOLOGICAL ASSOCIATION. Clinical Practice Guidelines for the Management of Atopic Dermatitis 2016. **The Journal of Dermatology**, v. 1, n. 1, p. 1-29, 2016.

SANATKAR, T., HADADZADEH, H., JANNESARI, Z., KHAYAMIAN, T., EBRAHIMI, M., RUDBARI, H., TORKZADEH-MAHANI, M., ANJOMSHOA, M. Characterization, photocleavage, molecular modeling, and DNA- and BSA-binding studies of Cu(II) and Ni(II) complexes with the non-steroidal anti-inflammatory drug meloxicam.

Inorganica Chimica Acta, v. 423, n. 2, p. 256-272, 2014.

SCHMITT, J., SCHWARZ, K., BAURECHT, H., HOTZE, M., FÖLSTER-HOLST, RODRIGUEZ, E., LEE, Y., FRANKE, A., DEGENHARDT, F., LIEB, W., GIEGER, C., KABESCH, M., NÖTHEN, M., IRVINE, A., MCLEAN, W., DECKERT, S., STEPHAN, V., SCHWARZ, P., ARIENGER, M., NOVAK, N., WEIDINGER, S. Atopic dermatitis is associated with an increased risk for rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease, and a decreased risk for type 1 diabetes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 1, p. 130-136, 2016.

SHAW, T., CURRIE, G., KOUDELKA, C., SIMPSON, E., Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 National Survey of Children's Health. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 1, p. 67-73, 2011.

SIDBURY, R., DAVIS, D., COHEN, D., CORDORO, K., BERGER, T., BERGMAN, J., CHAMLIN, S., COOPER, K., FELDMAN, S., HANIFIN, J., KROL, A., MARGOLIS, D., PALLER, A., SCHWARZENBERGER, K., SILVERMAN, R., SIMPSON, L., TOM, W., WILLIAMS, H., ELMETS, C., BLOCK, J., HARROD, C., BEGOLKA, W., EICHENFIELD, L., AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 3. Management and treatment with phototherapy and systemic agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 71, n. 2, p. 327-349, 2014.

SIMPSON, E.; KECK, L.; CHALMERS, J.; WILLIAMS, H. How should an incident case of atopic dermatitis be defined? A systematic review of primary prevention studies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 137-144, 2012.

SIMPSON, E., CHALMERS, J., HANIFIN, J., THOMAS, K., CORK, M., IRWIN MCLEAN, W., BROW, S., CHEN, Z., CHEN, Y., WILLIAMS, H. Emollient enhancement of the skin barrier from birth offers effective atopic dermatitis prevention. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 4, p. 818-823, 2014.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal Control Release**, v. 70, n. 1, p. 1-20, 2001.

STROM, M., SILVERBERG, J. Eczema Is Associated with Childhood Speech Disorder: A Retrospective Analysis from the National Survey of Children's Health and the National Health Interview Survey. **Journal of Pediatrics**, v. 168, n. 4, p. 185-192, 2016.

SUN, M., WANG, S., ZHAO, H., YAO, W., JIN, W., WEI, M. Suppression of 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis by extract of *Bacillus Calmette-Guerin*. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 2, p. 689-694, 2014.

SVENSSON, A., CHAMBERS, C., GANEMO, A., MITCHELL, S. A systematic review of tacrolimus ointment compared with corticosteroids in the treatment of atopic dermatitis. **Current Medical Research and Opinion**, v. 27, n. 7, p. 1395-1406, 2011.

TAKEICHI, T., NOMURA, T., TAKAMA, H., KONO, M., SUKIURA, K., WATANABE, D., SHIMIZU, H., SIMPSON, M., MCGRATH, J., AKIYAMA, M. Deficient stratum corneum intercellular lipid in a Japanese patient with lamellar ichthyosis by a homozygous deletion mutation in SDR9C7. **British Journal of Dermatology**, *in press*, 2017.

THOMSEN, S. Atopic Dermatitis: Natural History, Diagnosis, and Treatment. **International Scholarly Research Notices: Allergy**, v. 2014, n. 2, p. 1-7, 2014.

UCHIDA, K. HNE as an inducer of COX-2. **Free Radical Biology & Medicine**, *in press*, 2017.

UEHARA, Y., MURATA, Y., SHIGA, S., HOSOI, Y. NSAIDs diclofenac, indomethacin, and meloxicam highly upregulate expression of ICAM-1 and COX-2 induced by X-irradiation in human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 4, p. 847-852, 2016.

VERRI, M., PASTORIS, O., DOSSENA, M., AQUILANI, R., GUERRIERO, F., CUZZONI, G., VENTURINI, L., RICEVUTI, G., BONGIORNO, A. Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer diseases. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 345-353, 2012.

VILLALBA, B., IANISKI, F., WILHELM, E., FERNANDES, R., ALVES, M., LUCHESE, C. Meloxicam-loaded nanocapsules have antinociceptive and antiedematogenic effects in acute models of nociception. **Life Science**, v. 115, n. 2, p. 36-43, 2014.

VILLALBA, B., IANISKI, F., VOGT, A., PINZ, M., REIS, A., VAUCHER, R., SOARES, M., WILHELM, E., LUCHESE, C. Polymeric nanocapsules as a technological alternative to reduce the toxicity caused by meloxicam in mice. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, v. 81, p. 316-321, 2016.

WEIDINGER, S.; NOVAK, N. Atopic Dermatitis. **The Lancet**, v. 387, n. 1, p. 1109-1122, 2016.

WICKENS, J., ALSAAB, H., KESHARWANI, P., BHISE, K., AMIM, M., TEKADE, R., GUPTA, U., IYER, A. Recent advances in hyaluronic acid-decorated nanocarriers for targeted cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 3, p. 158- 166, 2016.

WILLIAMS, H., BURNEY, P., HAY, J., ARCHER, C., SHIPLEY, M., HUNTER, J., BINGHAM, E., FINLAY, A., PEMBROKE, A., GRAHAM-BROWN, R. The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. I. Derivation of a minimum

set of discriminators for atopic dermatitis. **British Journal of Dermatology**, v. 131, n. 3, p. 383-396, 1994.

WILLIAMS, H., ROBERTSON, C., STEWART, A., AIT-KHALED, N., ANABWANI, G., ANDERSON, R., ASHER, I., BEASLEY, R., BJÖRKSTÉN, B., BURR, M., CLAYTON, T., CRANE, J., ELWOOD, P., KEIL, U., LAI, C., MALLOL, J., MARTINEZ, F., MITCHELL, E., MONTEFORT, S., PEARCE, N., SHAH, J., SIBBALD, B., STRACHAN, D., VON MUTIUS, E., WEILAND, S. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 1, p. 125-138, 1999.

WILLIAMS, H., Clinical practice. Atopic dermatitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 22, 2314-2324, 2005.

WISE, I.; SULZBERGER, M.B. Yearbook of dermatology and syphilology. **Year Book of Dermatology and Syphilology**, p. 38-39, 1933.

WU, M., WAN, J. COX-3: is it the target of acetaminophen? **Sheng Li Ke Xue Jin Zhan**, v. 41, n.1, p. 40-42, 2010.

YOON, H., JANG, M., KIM, H., SONG, D., NAM, K-II., BAE, C., KIM, S., LEE, S., KU, C., JANG, D-II., Ahn, B. Protective Effect Of Diet Supplemented With Rice Prolamin Extract Against Dncb-Induced Atopic Dermatitis In Balb/C Mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine** v. 15, n. 353, p. 1-7, 2015.

YOSHIDA, S., OBATA, Y., ONUKI, Y., UTSUMI, S., OHTA, N., TAKAHASHI, H., TAKAYAMA, K. Molecular Interaction between Intercellular Lipids in the Stratum Corneum and l-Menthol, as Analyzed by Synchrotron X-Ray Diffraction. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 65, n. 2, p. 134-142, 2017.

YUAN, X., LIU, W., ZHANG, P., WANG, Y., GUO, Y. Effects and mechanisms of aloperine on 2, 4-dinitrofluorobenzene induced allergic contact dermatitis in BALB/c mice. **European Journal of Pharmacology**. V. 29, n. 6, p. 147-152, 2010.

YUAN, Y., LI, S., MO, F, ZHONG, D. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 231, n. 1-2, p. 117-123, 2006.

YUAN, Y., CHEN, X, ZHONG, D. Determination of meloxicam in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry following transdermal administration. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life science**. v. 852, n. 2, p. 650-654, 2007.

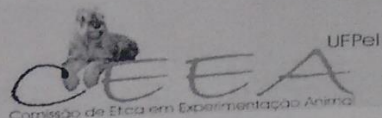
ZHANG, W., DING, B., TANG R., DING, X., HOX, X., WANG, X. Combination of microneedles with PLGA nanoparticles as a potential strategy for topical drug delivery. **Current Nanoscience**, v.7, p. 545-51, 2011.

ZHENG, T., YU, J., OH, M., ZHU, Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. **Allergy, Asthma & Immunology Research: AAIR**, v. 3, n. 2, p. 67-73, 2011.

ZHU, B., ZHANG, H., YU, L. Novel transferrin modified and doxorubicin loaded Pluronic 85/lipid-polymeric nanoparticles for the treatment of leukemia: In vitro and in vivo therapeutic effect evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, n. 1, p. 547-554, 2017.

ANEXO

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO



Pelotas, 13 de julho de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)
Para: Prof. Dra. Cristiane Luchese
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Avaliação do efeito de biomateriais na dermatite atópica induzida por 2,4-dinitroclorobenzeno em camundongos**”, processo nº 23110.004294/2015-91, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4294-2015).

Vigência do Projeto: 15/07/2015 a 15/07/2018

Espécie/Linhagem: *Mus musculus*/ Balb/c

Nº de animais: 364

Idade: 60 dias

Sexo: Fêmeas

Origem: Biotério Central/UFPEL

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2015

Assinatura do Professor Responsável: _____