

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

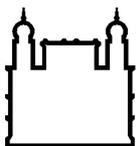
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**EFEITO DO DERIVADO *N*-ACILIDRAZÔNICO LASSBio-897 SOBRE A
RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR NA ASMA E SILICOSE
EXPERIMENTAIS**

DIANA DALZY VIVEIROS

RIO DE JANEIRO
2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DIANA DALZY VIVEIROS

**Efeito do derivado *N*-acilidrazônico LASSBio-897 sobre a resposta
inflamatória pulmonar na asma e silicose experimentais**

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

Orientador: Dr. Marco Aurélio Martins

RIO DE JANEIRO
2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

V857 Viveiros, Diana Dalzy

Efeito do derivado *N-acilidrazônico* LASSBio-897 sobre a resposta inflamatória pulmonar na asma e silicose experimentais / Diana Dalzy Viveiros. – Rio de Janeiro, 2014.

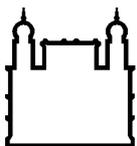
xix, 120 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 101-120

1. Asma. 2. Silicose. 3. LASSBio-897. I. Título.

CDD 616.200460724



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DIANA DALZY VIVEIROS

**EFEITO DO DERIVADO N-ACILIDRAZÔNICO LASSBio-897 SOBRE A
RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR NA ASMA E SILICOSE
EXPERIMENTAIS**

ORIENTADOR: Dr. Marco Aurélio Martins

Aprovada em: 25/09/2014

EXAMINADORES:

Dra. Patricia Torres Bozza – Presidente

Dra. Christianne Bandeira de Melo

Dr. Vinicius de Frias Carvalho

Dra. Cláudia Lucia Martins da Silva

Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Rio de Janeiro, 25 de setembro de 2014.

A Deus por sua misericórdia sem fim.

A minha querida mãe Rosilda
e a meu pai Frontin (*in memoriam*).

“Caminhos não há, mas os pés na grama os inventarão.”

Ferreira Gullar

*“Temos que pular de penhascos continuamente e desenvolver
nossas asas durante a queda.”*

Kurt Vonnegut

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor
fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era
antes.”*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado uma família maravilhosa e colocado pessoas especiais em meu caminho, por me sustentar nos momentos de maiores dificuldades, por sua misericórdia e cuidado incondicionais com minha vida.

Ao Dr. Marco Aurélio Martins pela oportunidade, pelo constante incentivo, paciência e disponibilidade irrestrita. Agradeço os ensinamentos e puxões de orelha; e pelo comprometimento, criatividade e entusiasmo com que conduziu a realização de todas as etapas deste trabalho.

À Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins pelo seu exemplo de dedicação, organização e método. Obrigada pela disponibilidade, por estar sempre pronta a auxiliar na resolução de problemas e pela participação em todas as etapas, desde o planejamento dos experimentos, discussão de resultados à criteriosa revisão deste trabalho.

Ao Dr. Renato Cordeiro por seu grande exemplo de amor e dedicação à Ciência.

Ao Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, na figura dos professores Eliezer de Jesus Barreiro e Carlos Alberto Manssour Fraga, pela colaboração e doação da substância utilizada nos experimentos que compõem o presente trabalho.

A todos do Laboratório de Inflamação que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, por toda amizade e companheirismo.

À Osirene Loureiro, ou melhor, Dadazinha, dentre suas outras habilidades fantásticas, por colocar ordem no caos, ajudar com as burocracias e encontrar as coisas perdidas debaixo dos nossos narizes.

À Dra. Magda Fráguas, Dr. Vinicius de Frias Carvalho, Ana Lúcia Pires e Dra. Andressa Bernardi pelo apoio e por compartilharem seus conhecimentos.

À Nathália Andrade, Daiana Oliveira, Rafael Martins, Rodrigo Azevedo, Bianca Andrade e Andrey Junior que foram fundamentais para realização deste trabalho e para descontração nos experimentos.

À Ana Carolina Arantes pela amizade, ajuda primordial em todos os experimentos, pontualidade, presteza, pelas conversas sobre a vida e debates animados e controversos que garantiram a diversão dos longos ensaios.

À Tatiana Paula Ferreira por toda ajuda com os experimentos e com o Endnote, pela disponibilidade e por vir de tão longe quando foi preciso, mesmo sem agendamento ou aviso prévio.

À Aline Vieira pela amizade e todo apoio, e principalmente, pelas conversas e conselhos que me trouxeram de volta ao eixo nos momentos mais tensos em que eu não conseguia enxergar uma solução. Foi um privilégio poder conviver

diariamente com uma pessoa incrível e iluminada como você! Serei eternamente grata!

À Dra. Edna Valotta pela contribuição essencial, por compartilhar seu conhecimento e por todo apoio e disponibilidade.

À Andressa Moraes, minha gêmea separada e hiperativa, pela amizade, pelas conversas filosóficas sobre a vida, comidinhas gostosas e receitinhas e por estar sempre por perto, mesmo que não fisicamente.

À Carolina Azevedo, um anjinho (*sic*) que Deus me enviou para mostrar diariamente a versão mais otimista e entusiasmada dos fatos da vida. Obrigada por ser uma amiga tão dedicada, pelas orações e pelo privilégio de sua amizade.

À Patrícia Trentin pela amizade e imenso carinho. Seu bom senso e paciência são fundamentais para equilibrar nossa loucura e do resto do mundo.

À Bianca Torres pela amizade e incrível ajuda em todos os experimentos. É muito bom conviver com você e ter o privilégio de aprender com sua perspectiva inusitada da vida.

À Suzana Cardozo pela amizade, apoio, ajuda nos experimentos e pelos muitos momentos Outback.

À Priscilla Olsen pela amizade, experimentos com linfócitos e saudosas sessões de terapia celular, por me permitir praticar “spoiler terapia” de HIMYM, pelas discussões literárias e dicas de livros e filmes.

À Luciana Pontes Coelho pela amizade e sua alegria contagiante. Tenho uma saudade imensa do exercício de criatividade que é conviver com você diariamente.

Aos amigos Rafael Carvalho, Thiago José e Davidson Dias pela amizade e apoio.

Às irmãs Dias, Márcia e Taís, pela ajuda em todos os experimentos gigantes, por toda a fofura e criatividade que deixam a vida mais leve.

A todos do Pavilhão Ozório de Almeida, em especial à equipe do biotério.

À Daniele Lobato por ajudar com todos os trâmites e procedimentos e sanar as dúvidas que surgiram durante os anos de mestrado e doutorado.

Aos meus irmãos, Danielly e Daniel, pelo amor incondicional, companheirismo e carinho. Agradeço a Deus pela oportunidade de ter a companhia de vocês na jornada da vida! Amo vocês!

Aos meus sobrinhos, Isabella e João Pedro, por colorirem meus dias, deixando-os mais bonitos e felizes. Amo demais!

A meu pai, Frontin, por todo amor, carinho e incentivo. Não há um dia em que a saudade não se faça presente. Amor além da vida!

A minha querida mãe Rosilda, simplesmente por tudo. Não é possível imaginar um momento em minha vida no qual você não tenha tido participação e que eu não tenha que agradecer. Precisaria escrever pelo menos 100 páginas para agradecer adequadamente, mas agradeço sucintamente por todo amor, apoio, incentivo, carinho e cuidado que tem comigo. Amo-te cada dia mais!

Ao Dr. Vinícius de Frias Carvalho, Dra. Patricia Torres Bozza, Dra. Christianne Bandeira de Melo, Dra. Claudia Lucia Martins da Silva e Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

Ao apoio financeiro concedido pela CAPES, CNPq, INCT e PRONEX.

ÍNDICE

Ficha Catalográfica	ii
Lista de abreviaturas	xii
Lista de figuras.....	xv
Resumo	xviii
Abstract.....	xix
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Hipótese de trabalho e racional.....	01
1.2. Inflamação.....	02
1.3. Doenças pulmonares inflamatórias crônicas.....	03
1.4. Asma.....	04
1.4.1. Epidemiologia da asma.....	05
1.4.2. Fisiopatologia da asma	06
1.4.3. Tratamento da asma.....	08
1.5. Pneumoconioses.....	10
1.5.1. Silicose	11
1.5.2. Sílica	12
1.5.3. Epidemiologia da silicose.....	12
1.5.4. Fisiopatologia da silicose	14
1.5.5. Formas de manifestações clínicas da silicose	15
1.5.6. Tratamento da silicose	17
1.6. Adenosina e seus receptores.....	18
1.6.1. Receptor de adenosina A _{2A} (A _{2A} AR).....	22
1.7. Potencial anti-inflamatório de compostos acilidrazônicos	25
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Animais	29
3.2. LASSBio-897.....	29
3.3. Modelos experimentais	29
3.3.1. Protocolo de sensibilização e desafio antigênico com ovoalbumina	29

3.3.2. Protocolo de indução de inflamação pulmonar desencadeada pelo desafio com LPS.....	31
3.3.3. Protocolo de indução de silicose experimental	32
3.4. Avaliação de hiper-reatividade das vias aéreas e função pulmonar	33
3.5. Lavado broncoalveolar	33
3.6. Obtenção de tecido pulmonar	34
3.7. Análise histológica	34
3.8. Análise morfométrica	34
3.9. Imunohistoquímica	35
3.10. Microscopia de polarização.....	36
3.11. Quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA	36
3.12. Quantificação de colágeno por Sircol.....	37
3.13. Western Blotting	37
3.14. Avaliação de células alvo “ <i>in vitro</i> ”	38
3.14.1. Linfócitos.....	38
3.14.2. Mastócitos.....	39
3.14.3. Células epiteliais humanas	40
3.14.4. Macrófagos alveolares.....	40
3.14.5. Cultura primária de fibroblastos pulmonares	41
3.14.6. Ensaio de proliferação de fibroblastos pulmonares	42
3.15. Análise estatística	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Efeito do tratamento profilático com LASSBio-897 sobre a resposta pulmonar aguda induzida por ovoalbumina em camundongos	43
4.2. Efeito do composto LASSBio-897 “ <i>in vitro</i> ” sobre potenciais células alvos envolvidas na asma	48
4.3. Efeito do tratamento terapêutico com LASSBio-897 sobre a resposta pulmonar crônica induzida por ovoalbumina em camundongos.....	51
4.4. Efeito do tratamento profilático com LASSBio-897 sobre a resposta pulmonar crônica induzida por ovoalbumina em camundongos.....	55
4.5. Efeito do tratamento com LASSBio-897 sobre a resposta pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos.....	59
4.6. Efeito do tratamento terapêutico com LASSBio-897 sobre a resposta de hiper-reatividade brônquica em camundongos silicóticos	63
4.7. Efeito de LASSBio-897 sobre a resposta fibro-granulomatosa induzida por partículas de sílica em camundongos.....	65
4.8. Efeito de LASSBio-897 sobre a permanência de partículas de sílica no tecido pulmonar de animais silicóticos	68

4.9. Efeito de LASSBio-897 sobre a geração de mediadores inflamatórios nos pulmões de camundongos silicóticos	70
4.10. Efeito do composto LASSBio-897 sobre as principais células alvos presentes no tecido pulmonar envolvidas na silicose	71
4.11. Efeito do composto LASSBio-897 “ <i>in vitro</i> ” sobre as principais células alvos envolvidas na silicose	74
4.12. Efeito de LASSBio-897 sobre a resposta intracelular desencadeada pelo exposição à sílica	81
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NT	“3-nitrotyrosine” (3-nitrotirosina)
α -SMA	“alpha-smooth muscle actin” (alfa-actina de músculo liso)
A ₁ AR	“Adenosine A ₁ receptor” (receptor de adenosina subtipo A ₁)
A _{2A} AR	“Adenosine A _{2A} receptor” (receptor de adenosina subtipo A _{2A})
A _{2B} AR	“Adenosine A _{2B} receptor” (receptor de adenosina subtipo A _{2B})
A ₃ AR	“Adenosine A ₃ receptor” (receptor de adenosina subtipo A ₃)
A _{2A} R ^{-/-}	Camundongos deficientes em receptores de adenosina A _{2A}
ADA	“Adenosine deaminase” (adenosina deaminase)
ADA ^{-/-}	Camundongos deficientes em adenosina deaminase
ADA ^{-/-} /A _{2A} R ^{-/-}	Camundongos deficientes em ADA e A _{2A} R
ADP	“5' -adenosine diphosphate” (5' -adenosina difosfato)
AMP	“5' -adenosine monophosphate” (5' -adenosina monofosfato)
AP-1	“Activator protein-1” (proteína ativadora-1)
ATP	“5' -adenosine triphosphate” (5' -adenosina trifosfato)
BSA	“Bovine serum albumin” (albumina bovina sérica)
CBP	“CREB-binding protein” (proteína de ligação a CREB)
CCR1	“CC chemokine receptor type 1” (receptor de quimiocina 1)
CREB	“cAMP responsive element binding protein” (proteína de ligação a elemento responsiva a AMPc)
DNP-BSA	2,4-Dinitrofenil conjugado a BSA
DPOC	“Chronic obstructive pulmonary disease” (doença pulmonar obstrutiva crônica)
EGF	“Epidermal growth factor” (fator de crescimento epidermal)
EPAC-1	“Exchange protein activated by cAMP 1”
EPO	“Eosinophil peroxidase” (peroxidase eosinofílica)
ERK	“Extracellular signal-regulated kinase” (quinase regulada por sinal extracelular)

ROS/EROS	<i>"Reactive oxygen species"</i> (espécies reativas de oxigênio)
FGF	<i>"Fibroblast growth factor"</i> (fator de crescimento de fibroblastos)
fMLP	Peptídeo <i>"N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine"</i>
GPCR	<i>"G Protein Coupled Receptor"</i> (receptores acoplados a proteína G)
IGF-1	<i>"Insulin-like growth factor 1"</i> (fator de crescimento insulina-símile-1)
IκB	<i>"inhibitor-κB"</i> (inibidor de NF-κB)
HRP	<i>"Horseradish Peroxidase"</i> (peroxidase de <i>Armoracia rusticana</i>)
ICAM-1	<i>"Intercellular adhesion molecule-1"</i> (molécula de adesão intercelular 1)
IL-1β	<i>"Interleukin 1β"</i> (interleucina 1β)
IL-4	<i>"Interleukin 4"</i> (interleucina 4)
IL-5	<i>"Interleukin 5"</i> (interleucina 5)
IL-6	<i>"Interleukin 6"</i> (interleucina 6)
IL-13	<i>"Interleukin 13"</i> (interleucina 13)
IFN-γ	<i>"Interferon-gamma"</i> (Interferon gama)
iNOS	<i>"Inducible nitric oxide synthase"</i> (óxido nítrico sintase induzida)
JNK	<i>"c-jun-N-terminal kinase"</i> (c-jun-N-terminal quinase)
KC	<i>"Keratinocyte-derived chemokine"</i> (quimiocina derivada de queratinócitos)
LPS	<i>"Lipopolysaccharide"</i> (lipopolissacarídeo)
LTD ₄	<i>"Leukotriene D₄"</i> (leucotrieno D ₄)
MAPK	<i>"Mitogen-activated protein kinase"</i> (proteína quinase ativada por mitógeno)
MCLK	<i>"Myosin light chain kinase"</i> (quinase da cadeia leve da miosina)
MHC II	<i>"Major histocompatibility complex II"</i> (complexo principal de

histocompatibilidade II)

MIP-1 α	<i>“Macrophage inflammatory protein 1 alpha”</i> (proteína inflamatória de macrófago 1 alfa)
MIP-2	<i>“Macrophage inflammatory protein 2”</i> (proteína inflamatória de macrófago 2)
MPO	Mieloperoxidase
NF- κ B	<i>“Nuclear factor kappa B”</i> (fator de transcrição nuclear κ B)
NO	<i>“Nitric Oxide”</i> (óxido nítrico)
OVA	<i>“Ovalbumin”</i> (ovoalbumina)
PBS	<i>“Phosphate buffered saline”</i> (solução salina tamponada com fosfatos)
PGD ₂	<i>“Prostaglandin D₂”</i> (prostaglandina D ₂)
PKA	<i>“Protein kinase A”</i> (proteína quinase A)
PKC	<i>“Protein kinase C”</i> (proteína quinase C)
SARA	<i>“Acute respiratory distress syndrome”</i> (ARDS) (Síndrome da angústia respiratória aguda)
TGF- β	<i>“Transforming growth factor-beta”</i> (fator de transformação do crescimento beta)
TNF- α	<i>“Tumor necrosis factor alpha”</i> (fator de necrose tumoral alfa)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.: Vias de sinalização após ativação de receptores de adenosina ..	20
Figura 1.2.: Gênese estrutural de LASSBio-897	26
Figura 3.1.: Esquema do modelo experimental de inflamação pulmonar aguda induzida por ovoalbumina.....	30
Figura 3.2.: Esquema do modelo experimental de inflamação pulmonar crônica induzida por ovoalbumina.....	31
Figura 3.3.: Esquema do modelo experimental de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS	32
Figura 3.4.: Esquema do protocolo de indução de silicose experimental	32
Figura 4.1.: Efeito do tratamento com LASSBio-897 sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos ativamente sensibilizados, nos dias 0 e 14, e desafiados com ovoalbumina nos dias 19 e 20 após a sensibilização.....	45
Figura 4.2.: Efeito do tratamento com LASSBio-897 sobre o infiltrado de células inflamatórias nos pulmões de camundongos ativamente sensibilizados nos dias 0 e 14 e desafiados com ovoalbumina (OVA) nos dias 19 e 20 após a sensibilização.....	46
Figura 4.3.: Efeito do tratamento com LASSBio-897 sobre a geração de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos ativamente sensibilizados nos dias 0 e 14 e desafiados com OVA nos dias 19 e 20 após a sensibilização.....	47
Figura 4.4.: Efeito do composto LASSBio-897 sobre a proliferação e a sobrevivência de linfócitos provenientes de linfonodos cervicais, axilares e inguinais de camundongos DO11.10 (TCR Tg).....	49
Figura 4.5.: Efeito do tratamento com o composto LASSBio-897 sobre desgranulação anafilática de mastócitos.....	50
Figura 4.6.: Falta de efeito do tratamento terapêutico com o composto	

LASSBio-897 sobre a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas com base no modelo de asma crônica 52

Figura 4.7.: Efeito do tratamento terapêutico com LASSBio-897 sobre a geração de citocinas e quimiocinas em amostras de tecido pulmonar de camundongos submetidos a provocação crônica com OVA 53

Figura 4.8.: Falta de efeito do tratamento terapêutico com o composto LASSBio-897 sobre o acúmulo de colágeno em pulmões de camundongos submetidos a provocação crônica com OVA..... 54

Figura 4.9.: Falta de efeito do tratamento profilático com o composto LASSBio-897 sobre a hiper-reatividade de vias aéreas de camundongos submetidos a provocação alérgica crônica..... 56

Figura 4.10.: Efeito do tratamento profilático com o composto LASSBio-897 sobre a geração de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos submetidos à provocação alérgica crônica..... 57

Figura 4.11.: Efeito do tratamento profilático com o composto LASSBio-897 sobre o acúmulo de colágeno em pulmões de camundongos submetidos a provocação alérgica crônica..... 58

Figura 4.12.: Efeito do tratamento com o composto LASSBio-897 sobre a hiper-reatividade e a função pulmonar de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25 µL)..... 60

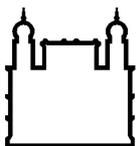
Figura 4.13.: Efeito do tratamento com LASSBio-897 sobre o infiltrado de células inflamatórias nos pulmões de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25 µL)..... 61

Figura 4.14.: Efeito do tratamento profilático com o composto LASSBio-897 sobre a geração de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25 µL) 62

Figura 4.15.: Efeito do tratamento terapêutico de LASSBio-897 sobre a hiper-reatividade de vias aéreas de camundongos desafiados com sílica. 64

Figura 4.16.: Efeito de LASSBio-897 sobre as alterações morfológicas do parênquima pulmonar em camundongos expostos à sílica..... 66

Figura 4.17.: Efeito de LASSBio-897 sobre a deposição de colágeno em pulmões de camundongos expostos à sílica	67
Figura 4.18.: Efeito de LASSBio-897 sobre o conteúdo de partículas de sílica presentes nas vias aéreas de camundongos silicóticos	69
Figura 4.19.: Efeito do tratamento com o composto LASSBio-897 sobre a geração de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos desafiados com sílica	70
Figura 4.20.: Efeito do composto LASSBio-897 sobre a expressão de F4/80 em pulmões de camundongos desafiados com sílica	72
Figura 4.21.: Efeito do composto LASSBio-897 sobre a expressão de α -actina de músculo liso em pulmões de camundongos desafiados com sílica.....	73
Figura 4.22.: Efeito do tratamento com o composto LASSBio-897 sobre a desgranulação de mastócitos induzida por partículas de sílica.....	75
Figura 4.23.: Efeito de LASSBio-897 sobre células epiteliais humanas estimuladas com sílica “ <i>in vitro</i> ”	76
Figura 4.24.: Efeito de LASSBio-897 sobre macrófagos alveolares estimulados com sílica “ <i>in vitro</i> ”	77
Figura 4.25.: Efeito de LASSBio-897 sobre a proliferação de fibroblastos pulmonares estimulados com IL-13 “ <i>in vitro</i> ”.....	79
Figura 4.26.: Efeito de LASSBio-897 sobre a produção de colágeno por fibroblastos pulmonares estimulados com IL-13 “ <i>in vitro</i> ”	80
Figura 4.27.: Efeito de LASSBio-897 sobre a expressão do fator de transcrição nuclear NF- κ B no tecido pulmonar de camundongos desafiados com sílica. ..	81



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

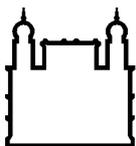
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESUMO

Efeito do derivado *N*-acilidrazônico LASSBio-897 sobre a resposta inflamatória pulmonar na asma e silicose experimentais

Doenças pulmonares crônicas, como a asma e a silicose, são caracterizadas por inflamação das vias aéreas e fibrose que levam à marcada deterioração da função pulmonar. O objetivo da presente tese é investigar o impacto das propriedades anti-inflamatórias e antifibróticas do composto LASSBio-897 na asma e silicose experimental. Utilizaram-se metodologias diversas, incluindo a quantificação da reatividade de vias aéreas por pletismografia barométrica, além da quantificação do teor tecidual de mediadores inflamatórios por ELISA e do infiltrado celular pulmonar com técnicas de histologia e imunohistoquímica. Foram ainda quantificados a produção de citocinas por fibroblastos e macrófagos “*in vitro*”. O tratamento oral profilático com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) preveniu a instalação do quadro de hiper-reatividade brônquica, o infiltrado celular e a geração de citocinas pró-inflamatórias em modelos de asma aguda em camundongos. Por outro lado, o tratamento mostrou-se inativo quando feito após a instalação da resposta asmática. Resultados mais promissores foram obtidos na condição da silicose experimental, onde o tratamento oral terapêutico com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) claramente inibiu o comprometimento da função pulmonar, o processo inflamatório e a fibrose observados induzidos pela exposição à sílica. O composto não interferiu com a atividade de mastócitos e células epiteliais estimuladas com sílica “*in vitro*”. No entanto, a administração de LASSBio-897 reduziu a expressão de F4/80 e α -SMA no tecido pulmonar de animais silicóticos, evidenciando assim sua atividade sobre macrófagos e miofibroblastos, respectivamente. Ensaios “*in vitro*” confirmaram esse efeito, uma vez que o composto reduziu a liberação de TNF- α por macrófagos alveolares estimulados com sílica e inibiu a proliferação e produção de colágeno induzida por IL-13 em fibroblastos pulmonares oriundos de animais silicóticos. Por fim, a administração do composto resultou na redução da expressão tecidual de NF- κ B após o desafio com sílica. Conclui-se que o composto LASSBio-897 pode prevenir a instalação do quadro de asma aguda, sem contudo alterar a resposta asmática já instalada. A capacidade do LASSBio-897 de reverter a resposta inflamatória e fibrótica pulmonar induzida por partículas de sílica sugere que uma aplicação na silicose, mais do que na asma, seja uma perspectiva verdadeiramente promissora.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

Effect of the *N*-acylhydrazone derivative LASSBio-897 on pulmonary inflammatory response in experimental asthma and silicosis

Chronic lung diseases such as asthma and silicosis are characterized by airway inflammation and fibrosis leading to marked deterioration of lung function. The aim of this thesis is to investigate the effect of compound LASSBio-897 on experimental asthma and silicosis. Various pathological parameters were assessed, including airway hyper-reactivity by barometric plethysmography, lung tissue content of inflammatory mediators by ELISA and cellular infiltration using histology and immunohistochemistry techniques. Cytokine generation from fibroblasts and macrophages *in vitro* was also quantified. Oral prophylactic treatment with LASSBio-897 (2 and 5 mg/kg) prevented airway bronchial hyper-reactivity, leukocyte recruitment and cytokine generation in a model of acute asthma in mice. However, this treatment was inactive when performed after installation of the asthmatic response. More promising results were obtained in the experimental silicosis condition, where the LASSBio-897 therapeutic treatment (2 and 5 mg/kg, oral) clearly inhibited airway hyper-reactivity, as well as inflammation and peribronchial fibrosis induced by silica particles. Furthermore, LASSBio-897 did not interfere with mast cells and epithelial cells activity after silica stimulation *in vitro*. However, LASSBio-897 clearly reduced F4/80 and α -SMA expression in the lung of silicotic mice, showing its inhibitory effect on macrophages and myofibroblasts, respectively. *In vitro* assays confirmed this effect, since the compound reduced TNF- α release by an alveolar macrophage cell lineage after silica exposure, and inhibited proliferation and collagen production induced by IL-13 in lung fibroblasts recovered from silicotic mice. Finally, LASSBio-897 reduced silica-induced upregulation of NF- κ B expression in the lung tissue. It is concluded that LASSBio-897 can prophylactically prevent the development of acute asthma, without altering the already installed asthmatic response. The capacity of LASSBio-897 to reverse silica but not allergen-induced lung inflammation and fibrosis suggests the application in silicosis, rather than in asthma, as a truly promising perspective.

1. Introdução

1.1. Hipótese de trabalho e racional

A hipótese central deste trabalho de tese é a de que o derivado *N*-acilidrazônico, LASSBio-897, teria potencial para controlar doenças inflamatórias pulmonares como a asma e silicose. Ela está fundamentada em estudos prévios os quais constataram a marcada atividade anti-inflamatória e antifibrótica deste composto em condições experimentais associadas ao infarto agudo do miocárdio em ratos. Em paralelo, a investigação de potenciais alvos moleculares do LASSBio-897, realizada através da contratação de serviços da plataforma comercial CEREP (França), explorou mais de uma centena de alvos farmacológicos, e identificou apenas o receptor A_{2A} da adenosina como um sítio de ligação do composto candidato.

A adenosina é um nucleosídeo purinérgico endógeno, cuja concentração aumenta significativamente em condições de estresse e, que tem a capacidade de promover a inflamação e o reparo tecidual (Perez-Aso e cols., 2014). Há 4 receptores distintos de adenosina (A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ e A_3R), todos pertencentes à super-família de receptores associados à proteína G, todos são expressos no pulmão e são alvos para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da asma em humanos (Wilson, 2008).

A estratégia traçada para condução do estudo baseia-se na utilização de modelos experimentais bem estabelecidos de inflamação pulmonar em camundongos. Assim, através do perfil de ação e a maior ou menor sensibilidade ao tratamento, poderemos definir melhor a potencialidade terapêutica do composto LASSBio-897 no contexto da inflamação e remodelamento adverso pulmonar causada por alérgeno ou partículas de sílica.

1.2. Inflamação

A inflamação é uma complexa resposta fisiológica adaptativa que protege o organismo contra infecções e injúria tecidual, e tem como principal função restaurar a homeostasia tecidual. Em condições normais, a inflamação é benéfica e indispensável à sobrevivência do hospedeiro, no entanto, a resposta inflamatória pode também ser responsável por um grande número de doenças crônicas e autoimunes, quando se torna descontrolada ou não é adequadamente resolvida (Murdoch & Lloyd, 2010, Sousa e cols., 2013, Serhan e cols., 2007, Tabas & Glass, 2013)

A inflamação aguda é uma resposta de curta duração que visa destruir ou isolar rapidamente o agente nocivo através da infiltração de leucócitos ativados, principalmente neutrófilos, exsudação de fluido e proteínas plasmáticas na região atingida. Esse evento é seguido por processos de reparo tecidual que em geral resultam na cura, restaurando as funções normais do tecido (Weiss, 2008, Ashley e cols., 2012). Quando a reação inflamatória aguda não é suficiente na eliminação do agente patogênico, o processo inflamatório persiste e adquire uma natureza crônica. A transição da inflamação aguda a um estado crônico é marcada pela substituição do infiltrado neutrofílico por macrófagos, eosinófilos e linfócitos, angiogênese e fibrose. A inflamação crônica é um longo processo e é caracterizada por inflamação persistente, destruição tissular com simultâneas tentativas de reparo tecidual, resultando em perda de função do órgão afetado (Weiss, 2008, Medzhitov, 2008, Kumar e cols., 2007).

Um amplo espectro de condições patológicas pode resultar de inflamação persistente como infecções causadas por vírus, fungos e micobactérias, ativação exacerbada e inapropriada do sistema imune contra células e tecidos próprios, processo característico de doenças autoimunes, reação imunológica excessiva a estímulos ambientais inócuos como ocorre nas doenças alérgicas e exposição prologada a agentes tóxicos, a exemplo da exposição a partículas de sílica (Kumar e cols., 2007). Assim, a intervenção farmacológica no processo inflamatório faz-se necessária visando se não a cura definitiva dessas doenças, ao menos o alívio dos sintomas e a melhora da qualidade de vida dos pacientes. Apesar da evolução do conhecimento acerca

da cadeia de eventos celulares e moleculares envolvidos na inflamação, o desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios seguros e eficazes é ainda bastante limitado. Uma área expoente dentro das estratégias inovadoras de desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios é aquela que visa à modulação de mediadores endógenos que controlam a iniciação, supressão e/ou resolução da inflamação (Antonioli e cols., 2014).

1.3. Doenças pulmonares inflamatórias crônicas

As doenças respiratórias crônicas afetam cerca de 1.15 bilhão de pessoas em todo o mundo, o que representa 16,4% da população mundial (Soriano & Campos, 2012). Dentro desse grupo, destacam-se as doenças inflamatórias pulmonares como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose pulmonar idiopática (FPI) e silicose, que representam importantes causas de morbidade e mortalidade no mundo e são caracterizadas por diferentes graus de limitação ao fluxo de ar, inflamação e remodelamento das vias aéreas (Royce e cols., 2013, Kim & Rhee, 2010).

Classicamente, as doenças pulmonares são classificadas em obstrutivas e restritivas. As doenças obstrutivas do pulmão estão associadas à presença de inflamação nas vias aéreas (traqueia, brônquios e bronquíolos) que podem ser parcialmente ocluídas pela secreção excessiva de muco ou sofrerem estreitamento em virtude da contração excessiva da musculatura lisa ou perda de tração radial causando um aumento da resistência ao fluxo de ar, característico desse grupo de doenças. As principais doenças pulmonares obstrutivas são a asma e DPOC. As doenças pulmonares restritivas são caracterizadas pela restrição da expansibilidade dos pulmões resultante de alterações persistentes do seu parênquima, que afetam diretamente a capacidade pulmonar. Dentre as doenças pulmonares restritivas, destacam-se as pneumoconioses e a fibrose pulmonar idiopática (Kumar e cols., 2007, Royce e cols., 2013, West, 1996, Cotran e cols., 1999).

1.4. Asma

A definição mais atual para asma é fornecida pelo recente documento “*The Global Strategy for Asthma Management and Prevention*”, “*The Global Initiative for Asthma*” (GINA, 2014):

“Asma é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas. E é definida por um histórico de sintomas respiratórios como sibilo, falta de ar, sensação de aperto no peito e tosse, que variam ao longo do tempo em intensidade, associados à limitação variável ao fluxo de ar.”

A asma apresenta enorme heterogeneidade em relação a aspectos de sua história natural, imunopatogênese, fenótipos clínicos e resposta à terapia. As diferentes expressões clínicas da asma envolvem uma gama de agentes ambientais que interagem com as vias aéreas causando inflamação aguda que, muitas vezes, progride a um estado crônico (Holgate, 2008, Miglino e cols., 2012). Clinicamente, a doença pode ser dividida em asma alérgica (atópica) e não-alérgica (Miglino e cols., 2012, Murphy & O'Byrne, 2010). A primeira forma se distingue pela predisposição genética em montar uma resposta baseada na produção de imunoglobulina tipo E (IgE) contra alérgenos ambientais comuns (Murdoch & Lloyd, 2010). A maioria dos pacientes asmáticos são atópicos, aproximadamente 60% dos asmáticos adultos e 80% das crianças asmáticas, mas nem todos os indivíduos atópicos desenvolvem asma quando adultos (Miglino e cols., 2012). Assim, para o desenvolvimento do fenótipo asmático, faz-se necessária a exposição a estímulos ambientais somada à susceptibilidade genética (Holgate, 2008, Murphy & O'Byrne, 2010).

Classicamente, a asma é reconhecida como uma doença de perfil Th2 caracterizada por intensa inflamação eosinofílica e hiper-reatividade das vias aéreas (Kudo e cols., 2013). As células T CD4⁺ quando ativadas secretam citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-13. Essas citocinas estimulam mastócitos, causam eosinofilia, promovem o acúmulo de macrófagos e, em alguns casos, neutrófilos, e acentuam a produção de IgE por linfócitos B (Murphy & O'Byrne, 2010). A inflamação recorrente e as subseqüentes anomalias nos processos de reparo levam a alterações estruturais nas vias aéreas devido à injúria epitelial, aumento da produção de muco, hiperplasia de células musculares lisas e

fibrose subepitelial. Esse processo aumenta o estreitamento das vias aéreas, o qual associado à hiper-responsividade a estímulos inócuos, contribui para obstrução intermitente ao fluxo de ar, refletindo na manifestação dos sintomas clínicos da doença (Li & Hua, 2014, Cookson, 1999).

1.4.1. Epidemiologia da asma

A asma representa um sério problema de saúde pública que afeta pessoas de todas as idades, e quando não adequadamente tratada, pode ser fatal. Nas últimas duas décadas a prevalência da asma praticamente dobrou e atualmente estima-se que a doença afete aproximadamente 300 milhões de pessoas no mundo (GINA, 2014, Cohn e cols., 2004). Dentre as doenças respiratórias, a asma só é superada em prevalência pela rinite, que acomete 400 milhões de pessoas em todo o mundo. Além disso, são registradas cerca de 180 mil mortes por ano em decorrência da asma (Soriano & Campos, 2012). Estudos preveem que até o ano de 2025 o número de asmáticos no mundo aumente em 100 milhões (Masoli e cols., 2004). O aumento da incidência de asma está intimamente relacionado a aspectos da cultura ocidental que incluem o aumento da urbanização e da poluição atmosférica, à imunização massiva de crianças e condições de vida cada vez mais assépticas (Cohn e cols., 2004).

A prevalência global de asma, entre adultos e crianças, atinge de 1% a 18% da população de diferentes países (GINA, 2014). Nos Estados Unidos, a asma acomete 5% da população. De acordo com as estatísticas americanas, um total de 2 milhões de atendimentos são realizados em unidades de saúde, aproximadamente 470 mil hospitalizações e 4,5 mil mortes anuais são causadas por asma no país (Barrios e cols., 2006). Além disso, 13% das crianças americanas são asmáticas, o que significa que 6,7 milhões de crianças sofrem com a doença nos Estados Unidos. Estima-se que 3,5 milhões dessas crianças têm uma ou mais crises de exacerbação ao ano, que resultam em 600 mil atendimentos hospitalares anuais (Nelson & Zorc, 2013).

O estudo multicêntrico ISAAC (*“International Study for Asthma and Allergies in Childhood”*) apontou regiões de alta incidência de asma no Brasil, comparáveis às observadas no norte Europeu e Oceania (Soriano & Campos,

2012). Considerando que a prevalência de asma atinge 10% da população mundial, estima-se que 20 milhões de brasileiros sejam asmáticos (SBPT, 2012). Estima-se que a asma seja responsável por uma média de 6 mortes diárias no Brasil, que representam cerca de 2 mil mortes ao ano. Um alto índice de morbidade da asma ainda é registrado no Brasil. Desse modo, a doença representa a quarta causa de hospitalização no Sistema Único de Saúde com cerca de 900 internações diárias, que ao final de um ano somam aproximadamente 350 mil hospitalizações em decorrência da asma. Essa situação representa anualmente um custo de R\$ 100 milhões aos cofres públicos brasileiros (Soriano & Campos, 2012, SBPT, 2006).

1.4.2. Fisiopatologia da asma

A asma é causada por uma resposta imunológica exacerbada a antígenos ambientais normalmente inócuos. As principais fontes de antígenos dessa natureza, denominados alérgenos, incluem ácaros da poeira doméstica, pelos de animais, fungos e pólen (Cookson & Moffatt, 1998). Em geral, alérgenos ambientais inalados juntamente com o ar inspirado por indivíduos não-atópicos geram uma resposta imunológica branda marcada pela produção de anticorpos alérgeno-específicos IgG1 e IgG4. Além disso, sabe-se que células T provenientes do sangue periférico de indivíduos não atópicos, após contato com alérgeno “*in vitro*”, respondem com uma discreta proliferação e secreção de interferon- γ , uma citocina normalmente envolvida em respostas associadas a linfócitos com perfil Th1. Ao passo que dado o contato com alérgenos ambientais, indivíduos atópicos apresentam uma resposta imunológica exagerada, na qual é observado um aumento de concentrações plasmáticas de IgE alérgeno-específica. Estudos “*in vitro*” mostram que células T oriundas desses indivíduos apresentam um aumento da produção de citocinas de perfil Th2 (Kay, 2003, Kemeny e cols., 1989).

A sensibilização alérgica se inicia quando alérgenos ultrapassam as barreiras físicas do sistema respiratório e penetram nas vias aéreas. Os alérgenos são captados e processados em pequenas moléculas antigênicas por células dendríticas. Esses fragmentos antigênicos são apresentados pelas células dendríticas, através de MHC de classe II, a linfócitos T *naïve* e

juntamente a sinais co-estimulatórios levam a ativação dessas células que adquirem características de células Th2 (Hamid & Tulic, 2009, Galli e cols., 2008). Esse processo também leva ativação de células Th2 que proliferam e passam a produzir citocinas pró-inflamatórias. A produção de mediadores inflamatórios, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 por linfócitos Th2 promovem ações subsequentes que influenciam diretamente o desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas, inflamação e remodelamento tecidual. IL-4 e IL-13 ativam células B que passam a sintetizar IgE, além de induzirem a produção de muco e fibrose. IL-4, IL-9 e IL-13 induzem o recrutamento de mastócitos e IL-3 e IL-4, a migração de basófilos. Enquanto, IL-5 é responsável pela diferenciação e ativação de eosinófilos (Murdoch & Lloyd, 2010).

As imunoglobulinas E secretadas por linfócitos B ativados são responsáveis pela sensibilização de mastócitos e basófilos, ao se ligarem a receptores de alta afinidade presentes na superfície dessas células (Hamid & Tulic, 2009, Stone e cols., 2010). A re-exposição a antígenos leva a formação do complexo IgE-FcεRI promovendo a ativação e desgranulação de mastócitos que secretam citocinas como IL-4, IL-5 e TNF-α. A ativação de mastócitos também resulta na liberação de mediadores como leucotrieno D₄ (LTD₄), prostaglandina D₂ (PGD₂), triptase e histamina que induzem a contração de células musculares lisas levando à broncoconstricção (Migliano e cols., 2012, Barrios e cols., 2006).

A parede das vias aéreas de asmáticos é infiltrada por células mononucleares, linfócitos T, eosinófilos e mastócitos (Kudo e cols., 2013, Cohn e cols., 2004). Alguns pacientes com asma severa apresentam um aumento do número de neutrófilos nas vias aéreas (Barnes, 2010). Com a progressão da doença e a persistência da inflamação, ocorrem mudanças na arquitetura pulmonar, que em conjunto caracterizam o processo de remodelamento das vias aéreas (Kudo e cols., 2013).

O remodelamento das vias aéreas define-se como alterações persistentes que ocorrem ao redor da traqueia, brônquios e bronquíolos, caracterizado pela mudança na composição e organização estrutural dos tecidos, e na função de células estruturais (Tang e cols., 2006, Lloyd & Robinson, 2007). As alterações estruturais que ocorrem durante o remodelamento, incluem perda de integridade epitelial, hiperplasia de células

mucígenas e aumento da produção de muco, fibrose subepitelial devido ao aumento da deposição de componentes de matriz extracelular, aumento de massa da musculatura lisa e angiogênese (Bergeron e cols., 2009). As consequências do remodelamento das vias aéreas incluem hiper-reatividade, obstrução ao fluxo de ar e declínio irreversível da função pulmonar (Tang e cols., 2006). A inflamação é amplamente relacionada à gênese das alterações estruturais ocorridas durante o processo de remodelamento das vias aéreas. No entanto, estudos recentes mostram que a força gerada por células musculares lisas durante a broncoconstricção é capaz de induzir remodelamento das vias aéreas em pacientes com asma, independente da presença de inflamação (Kudo e cols., 2013, Tang e cols., 2006, Grainge e cols., 2011).

1.4.3. Tratamento da asma

A associação de agonistas β_2 -adrenérgicos a corticosteroides inalatórios mantém-se como a base para o tratamento da asma há mais de 40 anos e visa à reversão da contração da musculatura lisa e o controle da inflamação das vias aéreas (Barnes, 2011, Myers & Tomasio, 2011). Quando corretamente administrada, a terapia é efetiva para a maioria dos pacientes, além de ser relativamente barata. No entanto, cerca de 5 - 10% pacientes não mantêm os sintomas da doença adequadamente controlados. Isso se deve em parte à baixa complacência dos pacientes ao tratamento administrado por inalação, particularmente aos agentes glicocorticoides (Barnes, 2010, Barnes, 2004). Ademais, a terapia da asma é limitada pelos inúmeros efeitos adversos e pela refratariedade ao tratamento com altas doses de glicocorticoides apresentada por uma parcela dos pacientes (1 - 5%) com asma grave (Louis e cols., 2012).

Glicocorticoides inalatórios representam o cerne da terapêutica da asma e são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento de asma persistente, inclusive em crianças. O uso de glicocorticoides inalatórios melhora a qualidade de vida do paciente, através da restauração da função pulmonar, redução dos sintomas, diminuição da frequência das exacerbações e pode prevenir alterações estruturais irreversíveis das vias aéreas, além de reduzir o número de internações hospitalares e mortes por asma (Tattersfield e cols.,

2002, Barnes, 2011). O mecanismo de ação de glicocorticoides é baseado em sua interação com receptores citoplasmáticos de glicocorticoides (GR), da qual resulta a ativação do receptor e translocação do complexo para o núcleo celular. A ligação do complexo a regiões específicas do DNA, denominadas como elemento responsivo a glicocorticoides (GRE), leva à atividade transcricional e modula mecanismos de transativação e transrepressão gênica (Holgate & Polosa, 2008, Caramori & Adcock, 2003). Os glicocorticoides são altamente eficazes na supressão da inflamação das vias aéreas mediada por células Th2 devido ao seu importante papel na regulação de fatores de transcrição nuclear como NF- κ B e AP-1 que reflete diretamente na inibição da expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Holgate & Polosa, 2008). O uso de doses mais altas de glicocorticoides inalatórios durante longos períodos implica em efeitos adversos sistêmicos como redução de densidade mineral óssea, cataratas e glaucoma (Tattersfield e cols., 2002).

Os agonistas β_2 -adrenérgicos dividem-se em agonistas β_2 -adrenérgicos de curta e de longa duração. A ação desses agonistas se dá através de sua ligação a receptores β_2 -adrenérgicos, os quais são altamente expressos em células musculares lisas. A interação desses agonistas a β_2 -adrenoceptores culmina na ativação de adenilato ciclase e aumento dos níveis intracelulares de AMPc, que por sua vez, leva a ativação da proteína quinase A (PKA) e Epac. PKA ativa proteínas reguladoras do tônus de células musculares lisas, como a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), levando ao relaxamento da musculatura das vias aéreas. A ativação de receptores β_2 -adrenérgicos leva a abertura de canais de potássio dependentes de Ca^{2+} , reduzindo a broncoconstrição (Barnes, 2011, Holgate & Polosa, 2008, Cazzola e cols., 2013). Os agonistas β_2 -adrenérgicos de curta duração são recomendados para a prevenção da asma induzida por exercício e para a rápida reversão da obstrução ao fluxo de ar em ataques agudos de asma. O uso frequente de agonistas β_2 -adrenérgicos de curta duração não é recomendado, sendo o uso excessivo associado à mortalidade de pacientes com asma (Barnes, 2011, Myers & Tomasio, 2011, Tattersfield e cols., 2002). Agonistas β_2 -adrenérgicos de longa duração são indicados para uso regular e é a única classe de broncodilatadores cujo efeito tem duração superior a 12 horas, devendo ser administrado duas vezes ao dia. Embora controlem os sintomas e reduzam as

exacerbações da asma, a monoterapia com agonistas β_2 -adrenérgicos de longa duração nunca é indicada, pois não são capazes de controlar o processo inflamatório (Barnes, 2011, Tattersfield e cols., 2002, Holgate & Polosa, 2008). O uso combinado de agonistas β_2 -adrenérgicos e glicocorticoides inalatórios aumenta a aderência do paciente ao tratamento, melhora a função pulmonar e os sintomas da doença, além de reduzir o uso de agonistas β_2 -adrenérgicos de curta duração para alívio imediato da broncoconstrição (Myers & Tomasio, 2011, Tattersfield e cols., 2002).

Outras classes de medicamento são utilizadas para controle da asma. As metilxantinas, como a teofilina e a aminofilina, são inibidores não seletivos de fosfodiesterase (PDE). A teofilina apresenta efeitos broncodilatadores e anti-inflamatórios moderados, menos potentes que os apresentados por glicocorticoides e agonistas β_2 -adrenérgicos. Seu uso torna-se pouco atrativo, pois apresenta uma estreita janela terapêutica, em virtude dos efeitos adversos cardíacos e sobre o sistema nervoso central. Além disso, a teofilina pode interagir com o efeito de outras drogas (Myers & Tomasio, 2011, Tattersfield e cols., 2002, Holgate & Polosa, 2008, Cazzola & Matera, 2014). Modificadores de leucotrienos como inibidores de lipoxigenase, zileuton, ou antagonistas de receptores de leucotrienos, montelukaste e zafirlukaste, por serem administrados oralmente, são muito bem aceitos pelos pacientes e promovem um bom controle da asma, reduzindo sintomas e exacerbações (Myers & Tomasio, 2011, Tattersfield e cols., 2002). Pacientes que não respondem ao tratamento com glicocorticoides combinados a agonistas β_2 -adrenérgicos podem ter uma boa resposta a baixas doses de imunossupressores como metotrexato, ciclosporina e azatioprina (Tattersfield e cols., 2002, Holgate & Polosa, 2008).

1.5. Pneumoconioses

O termo pneumoconiose foi cunhado por Zenker em 1866 e, atualmente, engloba um conjunto genérico de doenças pulmonares parenquimatosas que se desenvolvem em consequência da inalação de poeiras minerais em ambientes de trabalho (Saúde, 2006, Lido e cols., 2008, Castro e cols., 2005). Define-se poeira como qualquer partícula sólida inanimada capaz de manter-se

em suspensão no ar, de tamanho, natureza e origem diversos, produzida através de mecanismos de trituração ou ruptura de materiais sólidos (Ribeiro, 2010). As manifestações patogênicas decorrentes da inalação de poeiras inorgânicas dependem de diversos fatores como propriedades físico-químicas das partículas como tamanho, forma, solubilidade e reatividade, quantidade de partículas inaladas e retidas no parênquima pulmonar e vias aéreas; e reação idiossincrásica do indivíduo, onde fatores como doenças pulmonares pré-existentes e tabagismos podem ser determinantes para a progressão das pneumoconioses (Saúde, 2006).

Didaticamente, as pneumoconioses são classificadas em fibrogênicas e não-fibrogênicas. Essa classificação baseia-se na potencialidade das partículas contidas no aerossol de poeira em suscitar uma reação inflamatória que ative mecanismos de fibrogênese no parênquima pulmonar (Saúde, 2006, Castro e cols., 2005). Siderose, baritose e estanose são exemplos de pneumoconioses não-fibrogênicas, as quais em geral estão associadas à inalação de poeiras contendo elementos metálicos e sais inorgânicos, sendo caracterizadas histopatologicamente por formação macular isolada, fibrose discreta ou ausente e sem comprometimento da função pulmonar. Dentre as pneumoconioses fibrogênicas, destacam-se a silicose e asbestose, causadas pela inalação de material particulado, e são caracterizadas por fibrose progressiva do parênquima pulmonar (Saúde, 2006, Capitani & Algranti, 2006).

Embora as pneumoconioses possam ser evitadas através de medidas de contenção à exposição de poeiras, ainda assim, milhares de novos casos de pneumoconioses são anualmente registrados em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento. Isso se deve ao grande número de trabalhadores envolvidos em atividades com risco de exposição a poeiras potencialmente lesivas e à carência de programas de vigilância e controle de doenças ocupacionais (Lido e cols., 2008).

1.5.1. Silicose

Silicose é uma doença do interstício pulmonar classificada como pneumoconiose fibrogênica, de caráter progressivo, irreversível e potencialmente fatal, etiologicamente relacionada à inalação e deposição de

partículas de sílica cristalina nos pulmões. Na maioria dos casos, a silicose desenvolve-se a partir da inalação cumulativa de elevadas concentrações de poeiras minerais com alto teor de sílica cristalina em ambientes de trabalho. Embora a natureza ocupacional da silicose a torne passível de prevenção definitiva, ainda está longe de ser uma doença do passado e destaca-se dentre as principais pneumoconioses devido a sua alta taxa de incidência e prevalência no Brasil e no mundo (Greenberg e cols., 2007, Leung e cols., 2012, Rimal e cols., 2005, Martinez e cols., 2010, Capitani, 2006).

1.5.2. Sílica

Sílica ou dióxido de silício (SiO_2) é um dos minerais mais abundantes da crosta terrestre e resulta da ligação de um átomo de silício a dois átomos de oxigênio. A sílica existe na natureza em duas formas distintas, amorfa e cristalina. Ambas as formas compartilham a mesma fórmula molecular, diferindo apenas no arranjo estrutural das moléculas (Costantini e cols., 2011, Terra Filho & Santos, 2006). A denominação “cristalina” dada à sílica refere-se a um padrão fixo de orientação dos átomos de oxigênio e silício, enquanto, os átomos da forma amorfa apresentam um padrão randômico de organização (Greenberg e cols., 2007). A sílica ocorre mais frequentemente em sua forma cristalina, a qual apresenta cinco polimorfismos, o quartzo, a tridimita, a cristobalita, a coesita, e a stishovita, sendo todos amplamente associados a efeitos potencialmente tóxicos e fibrogênicos (Castranova & Vallyathan, 2000, Brown, 2009). Embora a forma amorfa da sílica não seja desprovida de atividade biológica, tem sido descrita por uma menor toxicidade e fibrogenicidade que a forma cristalina (Terra Filho & Santos, 2006).

1.5.3. Epidemiologia da silicose

Os riscos de exposição a poeiras contendo sílica, associados a atividades de mineração e construção, já eram conhecidos pelas civilizações egípcia, grega e romana desde a Antiguidade. Com o processo de industrialização, houve um crescimento no número de atividades envolvendo exposição à sílica cristalina devido ao uso de minerais em processos industriais

em muitas indústrias (Castro e cols., 2005, Terra Filho & Santos, 2006). Os riscos de exposição ocupacional à sílica cristalina estão presentes em diversas atividades como extração e beneficiamento de rochas, mineração, perfuração de poços, limpeza e manutenção de poços, indústrias metalúrgicas, de cerâmicas, de materiais de construção, de vidro, fundição de ferro, na produção de talco, e jateamento abrasivo com areia, o qual é aplicado em diversos processos industriais e, interessante, é utilizado no desgaste de jeans em fábricas de roupas, entre outros (Greenberg e cols., 2007, Terra Filho & Santos, 2006, Hobson, 2013).

A silicose apresenta alta prevalência em todo o mundo sendo considerada a principal causa de invalidez dentre as demais doenças respiratórias ocupacionais, no entanto, a verdadeira dimensão da ocorrência da doença é muitas vezes subestimada em países pobres ou em desenvolvimento devido à carência de notificação e vigilância por parte das autoridades (Leung e cols., 2012, Terra Filho & Santos, 2006).

No Brasil, estima-se que aproximadamente 6 milhões de trabalhadores estejam expostos à sílica (Castro e cols., 2005, Terra Filho & Santos, 2006). O maior número de casos se concentra no estado de Minas Gerais, onde há relatos de que 4 500 trabalhadores sofreram de silicose em decorrência de atividades de mineração subterrânea de ouro entre os anos de 1978 e 1998 (Leung e cols., 2012, Carneiro e cols., 2006). Além disso, estima-se que entre 1999 e 2000, cerca de 1,8 milhão de trabalhadores foram expostos à sílica no Brasil durante períodos que ultrapassaram 30% de suas jornadas de trabalho (Saúde, 2006).

O maior número de pacientes com silicose no mundo é encontrado na China, onde mais de 500 mil casos foram registrados entre os anos de 1991 e 1995. A cada ano, 24 mil mortes de chineses são atribuídas a complicações da silicose e 6 mil novos casos da doença são registados (Leung e cols., 2012).

A silicose também representa um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, o “*National Institute for Occupational Safety and Health*” (NIOSH) estima que cerca de 59 mil americanos estejam em risco de desenvolver algum grau de silicose. Além disso, são registradas anualmente 250 mil mortes em decorrência da doença (Castranova & Vallyathan, 2000). Na Europa, dados revelam que cerca de 3

milhões de trabalhadores foram expostos à sílica cristalina entre os de 1990 a 1993 (Leung e cols., 2012). A doença foi considerada como a sexta doença respiratória ocupacional mais frequente pelo “*European Occupational Disease Statistics*” (EODS) no ano de 2001 (Santos e cols., 2010).

1.5.4. Fisiopatologia da silicose

As poeiras inaladas juntamente com o ar inspirado são, em geral, removidas através do sistema muco-ciliar. A perpetuação da intensa exposição a poeiras em ambientes de trabalho sobrepõem os mecanismos de filtração do ar e o “*clearance*” muco-ciliar ascendente, e partículas de sílica cristalina com diâmetro entre 0.5 e 5 µm podem se depositar em bronquíolos respiratórios e alvéolos (Ribeiro, 2010, Terra Filho & Santos, 2006, Davis, 1986). Essas partículas podem causar citotoxicidade direta ao entrar em contato com água e lipoproteínas da camada de revestimento bronquioloalveolar, causando peroxidação de lipídeos com consequentes danos a membranas celulares. O processo de lesão celular culmina na liberação de enzimas intracelulares, iniciando um ciclo de lesão e reparo tecidual (Terra Filho & Santos, 2006, Castranova & Vallyathan, 2000).

Macrófagos alveolares residentes e células epiteliais são as principais células-alvos que participam do processo inflamatório desencadeado por partículas de sílica no pulmão, sendo os macrófagos diretamente ativados pela sílica. Receptores “*scavengers*”, como receptores MARCO, expressos na superfície de macrófagos, são cruciais no processo de reconhecimento e captação das partículas de sílica (Huaux, 2007, Hamilton e cols., 2008). A fagocitose de partículas de sílica por macrófagos desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), como H₂O₂, espécies reativas de nitrogênio e radicais livres, contribuindo para a lesão do tecido pulmonar (Sato e cols., 2008). Concomitantemente, ocorre a ativação de fatores de transcrição nuclear, como NF-κB e AP-1, culminando na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β e IL-6, acompanhado ainda da liberação de proteases e produtos do metabolismo de ácido araquidônico como leucotrieno B₄ e prostaglandina E₂ (Greenberg e cols., 2007). A secreção de tais mediadores inflamatórios resulta no recrutamento de células inflamatórias,

como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, para a superfície alveolar. A ingestão de sílica por macrófagos alveolares pode resultar em morte celular e na liberação de partículas de sílica intracelulares, que são novamente fagocitadas por outros macrófagos, perpetuando o processo inflamatório e a injúria tecidual (Greenberg e cols., 2007, Rimal e cols., 2005). Muitas vezes o tamanho e o formato das partículas de sílica, representam um fator limitante à fagocitose e neutralização, onde a protrusão para o englobamento do corpo estranho é formada, mas a formação do fagossomo ao redor de partículas muito grandes não é completa. Essa fagocitose “frustada”, dentre outros fatores, pode resultar na formação de granulomas, onde macrófagos podem fundir-se uns aos outros formando "células gigantes" que encapsulam o corpo estranho na tentativa de neutralizá-lo e proteger o hospedeiro, em um mecanismo ainda não completamente elucidado (Medzhitov, 2008).

A injúria tecidual causada pela inflamação recorrente é acompanhada por processos de reparo tecidual, o qual é iniciado pela secreção de fatores de crescimento pró-fibróticos como FGF, TGF- β , EGF e IGF-1 por macrófagos alveolares que estimulam o recrutamento e a proliferação de células mesenquimais, como pneumócitos tipo II e fibroblastos, e regulam a neovascularização e re-epitelização de tecidos danificados. Neutrófilos e linfócitos recrutados e células epiteliais residentes também participam desse processo através da produção de mediadores inflamatórios e fatores pró-fibróticos, amplificando a resposta fibrótica. A intensa produção de fatores fibrogênicos contribui para o desenvolvimento de lesões silicóticas devido à intensa produção de componentes de matriz extracelular como colágeno tipo I e II, fibronectina e proteoglicanos que culminam em alterações permanentes da arquitetura do parênquima pulmonar (Greenberg e cols., 2007, Rimal e cols., 2005, Terra Filho & Santos, 2006, Huaux, 2007).

1.5.5. Formas de manifestações clínicas da silicose

A silicose apresenta, em geral, um longo período de latência, raramente manifestando-se em indivíduos com menos de 50 anos de idade. A silicose pode apresentar-se clinicamente em três formas distintas, aguda, acelerada e

crônica, as quais estão diretamente relacionadas à intensidade e duração da exposição à sílica (Greenberg e cols., 2007, Santos e cols., 2010).

A silicose aguda ou silicoproteinose é a manifestação menos comum da doença e desenvolve-se após exposição a altos níveis de finas partículas de sílica recém-fraturadas em um curto período de tempo, geralmente manifestando-se após alguns meses a poucos anos de exposição em atividades como jateamento de areia ou perfuração de rochas. A evolução da doença é rápida e a sobrevivência dos pacientes é de cerca de 10 anos. Histopatologicamente, a doença é caracterizada por edema pulmonar, exsudato lipoproteico rico em surfactantes no lúmen alveolar, lesão de pneumócitos tipo I, hipertrofia de pneumócitos tipo II e inflamação intersticial. Tais alterações estruturais manifestam-se clinicamente como tosse, dispneia, fadiga, perda de peso, hipoxemia e diminuição da função pulmonar (Terra Filho & Santos, 2006, Castranova & Vallyathan, 2000, Santos e cols., 2010).

A silicose acelerada é associada a um histórico de exposições a altas concentrações de sílica em um período de tempo que varia de 5 a 15 anos. Essa forma de silicose assemelha-se clínica e histopatologicamente à silicose crônica, no entanto, progride mais rapidamente (Greenberg e cols., 2007, Santos e cols., 2010).

A silicose crônica, também denominada silicose clássica, é a forma clínica mais frequente de apresentação da doença. Geralmente ocorre após décadas de exposição cumulativa a concentrações relativamente baixas de partículas de sílica (Greenberg e cols., 2007, Leung e cols., 2012). Essa forma da doença apresenta um longo período de latência, podendo permanecer assintomática por até 45 anos após a exposição inicial a sílica (Greenberg e cols., 2007). Morfologicamente, essa forma de manifestação da doença é caracterizada pela presença de lesões nodulares, conhecidos como granulomas ou nódulos silicóticos, predominantemente nas zonas pulmonares superiores e regiões subpleurais. Os nódulos silicóticos apresentam-se histologicamente como lesões de arranjos concêntricos de fibras colágenas com regiões centrais hialinas, podendo apresentar graus variados de necrose e calcificação. Periféricamente, os nódulos silicóticos apresentam uma camada constituída por macrófagos, fibroblastos e linfócitos e reticulina (Greenberg e cols., 2007, Terra Filho & Santos, 2006, Castranova & Vallyathan, 2000). A

doença pode progredir para uma séria e debilitante condição conhecida como fibrose maciça progressiva (FMP) ou silicose complicada, a qual é caracterizada pela coalescência dos nódulos silicóticos, formando grandes massas fibróticas (Greenberg e cols., 2007, Terra Filho & Santos, 2006, Ferreira e cols., 2006). Os principais sintomas da doença são dispneia de esforço progressiva e tosse crônica. A progressão da doença pode ocasionar um quadro de insuficiência respiratória, perda de peso e maior susceptibilidade a infecções das vias aéreas inferiores (Santos e cols., 2010, Ferreira e cols., 2006).

A exposição à sílica vem sendo associada ao desenvolvimento de diversas doenças concomitantes a silicose. Estudos epidemiológicos recentes destacam o aumento da incidência de doenças extrapulmonares como artrite reumatoide, esclerodermia, lúpus, esclerose sistêmica progressiva e doenças renais não-malignas, causadas pela exposição a partículas de sílica (Greenberg e cols., 2007, Brown, 2009). Ademais, alguns estudos correlacionam a sílica a potenciais ações carcinogênicas, onde a exposição crônica a essas partículas minerais leva um maior risco de câncer de pulmão em humanos. Assim, a sílica foi inicialmente classificada pela “*International Agency for Research on Cancer*” (IARC) como uma substância cancerígena do Grupo 2B (“provavelmente cancerígena” para humanos) e, em seguida, reclassificada como uma substância do Grupo 1 (“cancerígena para humanos”) (Greenberg e cols., 2007). A silicose é ainda associada a uma maior susceptibilidade à tuberculose. Estudos mostram que indivíduos silicóticos apresentam risco que varia 2,8 a 39 vezes maior de contrair tuberculose, dependendo da severidade da silicose, que indivíduos saudáveis, fato que se relaciona a ações diretas da sílica ao potencializar o crescimento bacilar e à alta toxicidade da partícula a macrófagos alveolares, e à redução da atividade linfática no pulmão silicótico (Greenberg e cols., 2007, Capitani, 2006, Terra Filho & Santos, 2006, Ferreira e cols., 2006, Barboza e cols., 2008).

1.5.6. Tratamento da silicose

Atualmente, diversos estudos propõem uma gama de estratégias terapêuticas que objetivam minimizar o processo inflamatório observado na

silicose. No entanto, uma vez estabelecida, nenhum tratamento farmacológico mostrou-se efetivo no controle da doença (Greenberg e cols., 2007). Dentre as modalidades de tratamento farmacológico, o uso de corticosteroides mostrou benefícios bastante limitados a longo prazo para pacientes com silicose crônica ou acelerada. Além disso, a imunossupressão causada por agentes glicocorticoides pode aumentar o risco desses pacientes contraírem tuberculose (Leung e cols., 2012). O tratamento baseado na inalação de pó de alumínio com a finalidade de reduzir a solubilidade de partículas de sílica retidas no pulmão resulta em uma melhora pouco expressiva dos sintomas da doença (Greenberg e cols., 2007). O procedimento de lavagem broncoalveolar para a remoção de partículas retidas no parênquima pulmonar é indicada para pacientes com silicose aguda e crônica, no entanto, não possui eficácia comprovada (Terra Filho & Santos, 2006).

Assim, as principais medidas para evitar as complicações da doença baseiam-se no afastamento do paciente de áreas de exposição à sílica, na cessação do tabagismo e na profilaxia de infecções pulmonares intercorrentes através da vacinação (vacina contra influenza e vacina pneumocócica). O tratamento farmacológico da silicose atualmente restringe-se ao uso de broncodilatadores, agentes antitussígenos e agentes mucolíticos para alívio dos sintomas, e de antibióticos para o tratamento de infecções concomitantes. Por fim, dentro de um contexto clínico bem definido e apropriado, pode-se considerar a opção de transplante pulmonar para alguns pacientes (Leung e cols., 2012, Terra Filho & Santos, 2006, Santos e cols., 2010).

1.6. Adenosina e seus receptores

A adenosina é um nucleosídeo ubíquo, formado pela união de uma base purínica, a adenina, a uma ribose através de ligação glicosídica (Vass & Horvath, 2008). A participação da adenosina em uma miríade de processos biológicos essenciais, como geração de energia e o metabolismo de proteínas, é muito bem estabelecida. Contudo, somente nas últimas décadas o papel da adenosina como um importante mediador inflamatório em diversas desordens pulmonares crônicas e em doenças imunes vem sendo reconhecido (Spicuzza e cols., 2006).

A adenosina é constitutivamente encontrada em concentrações baixas em tecidos humanos que não ultrapassam faixas nanomolares (400 – 600 nM), na ausência de condições patológicas (Arch & Newsholme, 1978, Zhou e cols., 2009). A manutenção de níveis fisiológicos de adenosina é finamente controlada por sua re-captação, conversão à inosina pela adenosina deaminase (ADA), ou através de sua fosforilação pela ação da adenosina kinase, e consequente geração de AMP (Fredholm, 2007, Cicala & Ialenti, 2013). No entanto, em resposta ao estresse metabólico e dano celular, ocorre um drástico aumento desse nucleosídeo no fluido extracelular como resultado do metabolismo de nucleotídeos de adenina. ATP e ADP são desfosforilados a AMP pela ação da ecto-5'-nucleotidase CD39, e subsequentemente, ocorre a clivagem enzimática de AMP pela ecto-5'-nucleotidase CD73 presente na membrana plasmática, elevando os níveis de adenosina no exterior da célula (Zhou e cols., 2009, Fredholm, 2007, Cicala & Ialenti, 2013). Quadros agudos tais como observados na sepse e isquemia produzem adenosina em concentrações que chegam a 10 µM. Concentrações de adenosina na faixa de 100 µM podem ser atingidas em doenças crônicas como a artrite, asma e DPOC (Zhou e cols., 2009, Cicala & Ialenti, 2013).

A sinalização de adenosina em resposta a estímulos nocivos exerce um papel dual na modulação da homeostase tecidual, suscitando mecanismos citoprotetores e anti-inflamatórios, assim como, mecanismos pró-inflamatórios. A exemplo disso, estudos mostram que elevadas concentrações de adenosina durante estágios agudos de inflamação favorecem vias anti-inflamatórias e de proteção tecidual, entretanto, caso a inflamação prossiga sem resolução e adquira uma natureza crônica, a manutenção de níveis aumentados de adenosina pode levar à ativação de vias de exacerbação do processo inflamatório e disfunção tecidual (Zhou e cols., 2009, Blackburn, 2003, Linden, 2001). A heterogeneidade de tais efeitos não é surpreendente, posto que uma grande variedade de vias de sinalização intracelular é acessada em decorrência da ativação de receptores de adenosina (Blackburn, 2003). As múltiplas atividades biológicas da adenosina resultam de sua interação a quatro diferentes subtipos de receptores acoplados a proteína G (GPCR), designados A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR e A₃AR. Esses receptores são amplamente distribuídos pelo organismo e expressos em diversos tipos celulares; e

sinalizam através de vias de transdução de sinal independentes, cuja ativação pode implicar tanto em efeitos benéficos quanto prejudiciais ao desenvolvimento ou persistência da inflamação (Driver e cols., 1993, Fredholm e cols., 2001). A capacidade da adenosina interagir com esses receptores, assim como, a natureza da resposta resultante da ativação dos mesmos dependem de fatores como afinidade de ligação, densidade do receptor e do tipo de proteína G envolvida (Polosa & Blackburn, 2009). Estudos mostram que a atividade agonista da adenosina sobre receptores dos subtipos A_1 (sinalização via $G_{i/o}$) e A_3 (sinalização via $G_{i/o}/G_q$) culmina em uma redução dos níveis intracelulares de AMPc e, no curso de doenças crônicas, esses receptores podem regular funções pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A ativação dos receptores dos subtipos A_{2A} (sinalização via G_s) e A_{2B} (sinalização via G_s/G_q) leva ao aumento dos níveis intracelulares de AMPc. O primeiro medeia potentes ações anti-inflamatórias, enquanto o segundo promove inflamação (Figura 1.1) (Spicuzza e cols., 2006, Polosa & Blackburn, 2009).

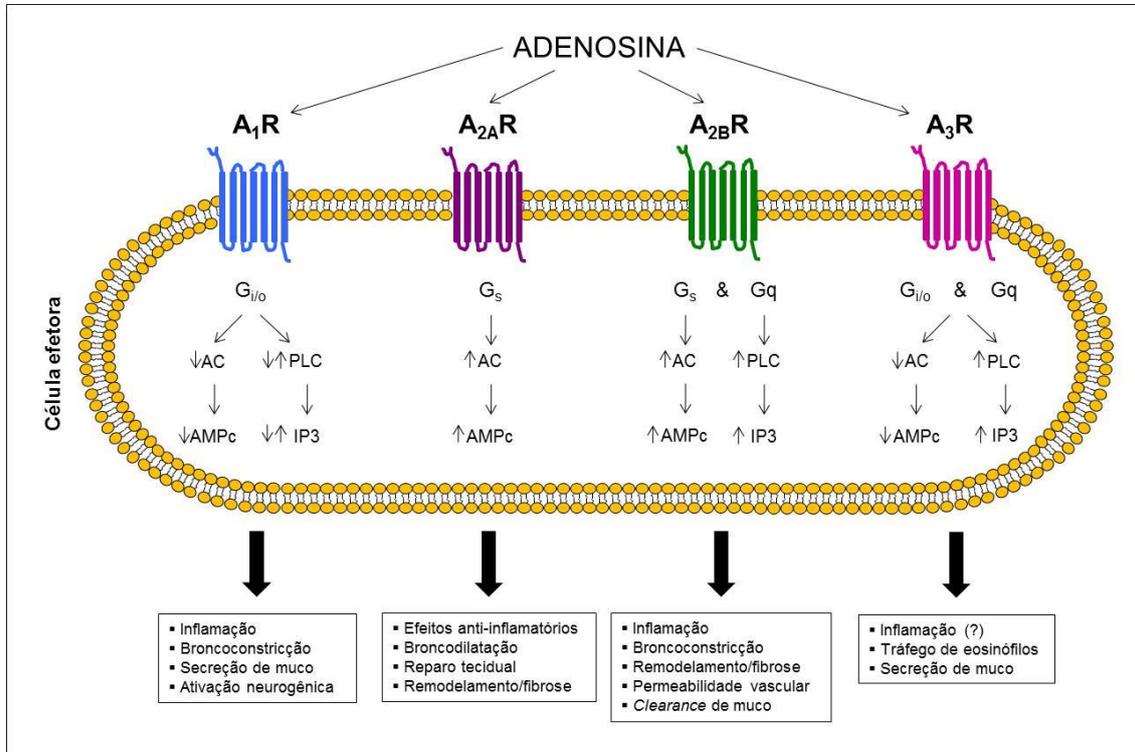


Figura 1.1. Vias de sinalização após ativação de receptores de adenosina.
Adaptado de (Polosa & Blackburn, 2009).

Diversas evidências sugerem que a sinalização via adenosina tem papel relevante na regulação da inflamação e injúria em doenças pulmonares crônicas (Fredholm e cols., 2001, Polosa, 2002, Spicuzza e cols., 2003, Fozard, 2003, Grunig, 2003). Cushley e colaboradores demonstraram que a adenosina quando inalada por pacientes asmáticos promove uma potente broncoconstrição, fenômeno esse não observado em indivíduos saudáveis (Cushley e cols., 2004). Além disso, asmáticos apresentam níveis elevados de adenosina no lavado broncoalveolar (Driver e cols., 1993). Consonante a essas constatações, camundongos deficientes na enzima adenosina deaminase (ADA^{-/-}) desenvolvem um quadro de inflamação pulmonar severa e remodelamento adverso das vias aéreas, refletindo as consequências dos altos níveis de adenosina nos pulmões desses animais, que podem alcançar concentrações comparáveis àquelas mensuradas em doenças pulmonares crônicas (Blackburn, 2003, Driver e cols., 1993, Blackburn e cols., 2000). O fenótipo pulmonar resultante da remoção genética de adenosina deaminase em camundongos é marcado por hiper-reatividade brônquica, eosinofilia, ativação de macrófagos, desgranulação de mastócitos, acentuada secreção de muco nas vias aéreas, aumento da expressão de moléculas fibrogênicas, deposição de colágeno e destruição do parênquima pulmonar semelhante a enfisema (Blackburn e cols., 2000, Caruso e cols., 2006, Chunn e cols., 2005, Chunn e cols., 2001, Zhong e cols., 2001). A inflamação progressiva e o remodelamento das vias aéreas são responsáveis pela subsequente falência respiratória e morte prematura desses animais. Muitas das características fisiopatológicas consequentes da deleção de ADA são também notadas em distúrbios pulmonares como asma e DPOC, sugerindo que o aumento crônico de adenosina pode afetar vias de sinalização que medeiam mecanismos patogênicos em doenças pulmonares crônicas (Blackburn, 2003, Blackburn e cols., 2000). Dessa forma, a modulação farmacológica do sistema adenosinérgico mostra-se clinicamente promissora. As oportunidades terapêuticas geradas pelo desenvolvimento de ligantes com alta afinidade e seletividade para os receptores de adenosina são claras e têm sido exploradas pela indústria farmacêutica.

1.6.1. Receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A}AR)

Dentre os quatro diferentes receptores ativados por adenosina, os receptores do subtipo A_{2A} destacam-se por sua importante função no controle da inflamação. Esses receptores encontram-se amplamente distribuídos pelo organismo e são altamente expressos em leucócitos, plaquetas e em algumas áreas do sistema nervoso central, ao passo que uma expressão intermediária tem sido encontrada em órgãos como pulmão e coração (Spicuzza e cols., 2006, Fredholm e cols., 2001, Trevethick e cols., 2008). Embora as vias aéreas não sejam o mais abundante sítio de expressão tecidual do receptor A_{2A}, sabe-se que ele está presente em algumas células estruturais e em todas as principais células imunorregulatórias envolvidas em doenças graves como asma, DPOC e silicose. Assim, a atividade anti-inflamatória e de reparo tecidual associada à ativação do receptor A_{2A} nos pulmões é orquestrada por um amplo espectro de alvos celulares que inclui células musculares lisas, fibroblastos, células epiteliais brônquicas, macrófagos residentes, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos (Hasko & Pacher, 2008, Polosa & Holgate, 2006).

A sinalização decorrente da estimulação do receptor A_{2A} ativa a proteína G_s em tecidos periféricos, elevando os níveis intracelulares de AMPc através da ativação de adenilato ciclase. O aumento dos níveis de AMPc culmina principalmente na ativação da proteína quinase A (PKA), a qual subsequentemente ativa o substrato nuclear CREB, através de fosforilação da serina 133. Posteriormente, CREB se liga ao cofator nuclear CBP e a p300, e esse complexo, por sua vez, regula a expressão de muitos genes. De maneira interessante, CREB compete com o fator de transcrição nuclear-κB (NF-κB) pelo co-ativador CBP, e através desse mecanismo regula negativamente a expressão de muitos genes pró-inflamatórios, suprimindo, conseqüentemente, a expressão de citocinas inflamatórias como TNF-α (Morello e cols., 2009). Vias alternativas à via clássica cAMP-PKA também podem ser ativadas como aquelas que envolvem sinalização através de MAPK (JNK, ERK), PKC e EPAC-1 (Hasko & Pacher, 2008, Fredholm e cols., 2007).

Indícios mais fortes do papel do receptor A_{2A} na regulação da inflamação “*in vivo*” surgem com o estudo com animais deficientes neste receptor (A_{2A}R^{-/-})

publicado por Ohta e Sitkovsky (2001). Esse trabalho mostra que na ausência do receptor A_{2A} , doses extremamente baixas de um estímulo inflamatório, que causam apenas danos teciduais mínimos em animais normais, foram suficientes para induzir extensas lesões teciduais associadas ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e, eventualmente, a morte precoce de animais $A_{2A}R^{-/-}$, confirmando as propriedades de proteção tecidual dessa classe de receptores de adenosina (Ohta & Sitkovsky, 2001). Estudos posteriores confirmaram a importância do receptor A_{2A} em condições de inflamação pulmonar crônica. A deleção genética do receptor A_{2A} acentuou o influxo de células totais, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos no lavado broncoalveolar e aumentou a reatividade das vias aéreas em animais antígenicamente sensibilizados e desafiados. Comparado a animais selvagens submetidos a insultos antigênicos, camundongos $A_{2A}R^{-/-}$ alérgicos apresentam ainda uma diminuição dos níveis de AMPc, aumento da ativação NF- κ B e p-I κ B α , associado a um maior estresse nitrosativo decorrente do aumento da expressão de óxido nítrico sintase (iNOS), formação de 3-nitrotirosina (3-NT) no lavado broncoalveolar e aumento da produção de óxido nítrico (NO) no tecido pulmonar (Nadeem e cols., 2007). De modo semelhante, a remoção genética de $A_{2A}R$ associada ao aumento dos níveis extracelulares de adenosina resultante da deleção conjunta de adenosina deaminase (camundongos duplamente nocautes $ADA^{-/-}/A_{2A}R^{-/-}$) culmina no aumento de inflamação pulmonar, produção de mucina, espessamento da parede dos brônquios devido à hipertrofia de músculo liso, hipertrofia do epitélio brônquico e angiogênese. Além disso, camundongos $ADA^{-/-}/A_{2A}R^{-/-}$ morrem, em média, três dias antes que animais $ADA^{-/-}/A_{2A}R^{+/+}$, demonstrando a importância desse receptor na manutenção da homeostasia tecidual (Mohsenin e cols., 2007).

Dados da literatura sugerem que receptores de adenosina do subtipo A_{2A} funcionem como um “freio fisiológico” do processo inflamatório em condições patológicas, ressaltando a existência de um potencial mecanismo passível de intervenção farmacológica, por meio do desenvolvimento de agonistas seletivos desse receptor (Trevethick e cols., 2008). Em razão disso, diversas patentes de classes específicas de novas substâncias com aplicação como agonistas A_{2A} vêm sendo depositadas em órgãos competentes, assim como, inúmeras investigações pré-clínicas e clínicas estão atualmente em

progresso (Akkari e cols., 2006, Chen e cols., 2013). Além disso, recentemente o uso de um agonista seletivo A_{2A} , denominado regadenoson (Lexican, Astellas Pharma), foi aprovado pela agência reguladora de medicamentos dos Estados Unidos (“*Food and Drug Administration*” - FDA) em testes de cintilografia de perfusão miocárdica (CPM) para diagnóstico de doença arterial coronariana (DAC), com a finalidade de aumentar o fluxo sanguíneo (Chen e cols., 2013, de Lera Ruiz e cols., 2014). Diversos estudos pré-clínicos para avaliação da eficácia farmacológica da ativação do receptor de adenosina A_{2A} mostraram igualmente resultados promissores. O agonista seletivo do receptor A_{2A} , CGS 21680 (Novartis Pharma), reduziu significativamente o influxo de células inflamatórias para os pulmões após desafios com ovoalbumina em ratos (Fozard e cols., 2002). Olivier Bonneau e colaboradores demonstraram que o tratamento com CGS 21680 reduziu o influxo de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos para os pulmões após o desafio com ovoalbumina em camundongos. CGS 21680 demonstrou ainda atividade inibitória sobre a ativação de neutrófilos ante a estimulação com LPS/fMLP (Bonneau e cols., 2006). No entanto, um segundo agonista A_{2A} , GW328267X (GlaxoSmithKline), não foi efetivo em triagens clínicas de Fase II. GW328267X não mostrou nenhuma proteção contra a indução de resposta asmática de fase imediata ou tardia em um estudo duplo cego controlado com pacientes asmáticos atópicos. Uma das possíveis explicações para o fracasso de GW328267X em testes clínicos baseia-se no fato de que foram utilizadas doses subterapêuticas do composto (25 µg, duas vezes ao dia). Essa dose foi escolhida, uma vez que, em triagens clínicas de Fase I, doses mais altas causaram efeitos cardiovasculares, como hipotensão arterial e aumento da frequência cardíaca (Benfatto & Polosa, 2008, Luijk e cols., 2008).

A ampla distribuição dos receptores de adenosina no organismo contribui para os efeitos adversos associados à administração sistêmica de muitos ligantes desses receptores, condição que de fato dificulta sua aplicação na prática clínica. Em face dessas evidências, a modulação farmacológica desses receptores começa a ser enquadrada por um novo ângulo, em que ligantes ortostéricos do receptor são preteridos em favor de uma classe alternativa de agonistas com atividade em sítios alostéricos. Embora ainda pouco explorado, o alosterismo de receptores A_{2A} é promissor, uma vez que

esse tipo de ligante tem potencial para acentuar o efeito da adenosina endógena ao aumentar a afinidade desse nucleosídeo pelo receptor. Assim, os moduladores alostéricos representam uma alternativa interessante, ao direcionar a resposta à adenosina seletivamente para locais de alta produção desse nucleosídeo, que em geral coincidem com sítios inflamatórios, reduzindo assim possíveis efeitos adversos sistêmicos (Antonioli e cols., 2014, Fredholm e cols., 2001, Kimatrai-Salvador e cols., 2013).

1.7. Potencial anti-inflamatório de compostos acilidrazônicos

O Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio[®]) ligado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, tem concentrado esforços no planejamento e síntese de novos compostos de potencial terapêutico, a partir do safrol, um produto natural extraído do óleo de Sassafrás (*Ocotea pretiosa*) (Zapata-Sudo e cols., 2010, Lima e cols., 2000, Silva e cols., 2005). Do ponto de vista químico, a série caracterizada pela presença do grupamento farmacofórico *N*-acilidrazona, considerado uma estrutura privilegiada, que tem atraído interesse farmacológico e clínico, dentre outros aspectos, por estar associado a várias moléculas marcadas pela atividade anti-inflamatória (Fraga & Barreiro, 2006). O composto 3,4-metilenodioxibenzoil-2-tienilidrazona, nomeado LASSBio-294 (Figura 1.2), principal representante da série, destacou-se por possuir importantes ações cardio-protetoras, incluindo atividade inotrópica positiva, vasodilatadora e antifibrótica, que o qualificam como um verdadeiro composto-protótipo de fármaco para o tratamento da insuficiência cardíaca e/ou muscular (Barreiro, 2002). Considerando o interessante perfil farmacológico de LASSBio-294, foram posteriormente sintetizados cerca de 50 novos análogos do LASSBio-294, planejados com base em trocas isostéricas diversas.

Dentre estes análogos, encontra-se o composto LASSBio-897, molécula central na presente tese. Essencialmente, LASSBio-897 resulta de discreta alteração na estrutura do composto protótipo LASSBio-294, com a tienila movendo-se da posição 2 para a 3 do anel lateral (Figura 1.2). LASSBio-897 mostrou-se potente agente vasodilatador em ratos espontaneamente

hipertensos, sendo cerca de 200 vezes mais potente que o composto original, LASSBio-294, em produzir vasodilatação em anéis de aorta de ratos (Zapata-Sudo e cols., 2010). Em adição a esses achados, demonstrou-se que LASSBio-897 apresenta importantes efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos em protocolos experimentais que simulam o infarto do miocárdio em ratos (dados não publicados – Consórcio Pronex/INCT-INOVAR). As atividades anti-inflamatórias e antifibróticas desempenhadas por LASSBio-897 após tratamento por via oral desperta interesse no aprofundamento das investigações acerca da potencialidade desse composto em outras condições patológicas, a exemplo das doenças pulmonares inflamatórias crônicas, como asma e silicose.

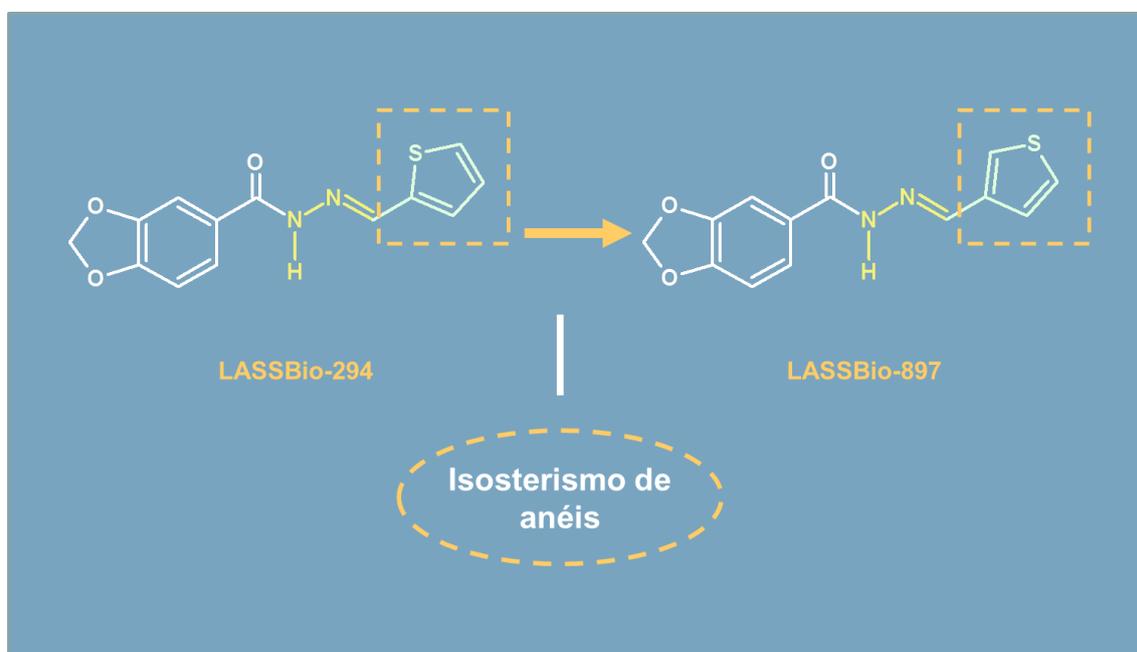


Figura 1.2. LASSBio-897 resulta de um isosterismo de anéis. Uma discreta alteração da localização da tioenila que muda da posição 2, como no protótipo LASSBio-294, para a posição 3 do anel ligado ao grupamento acilidrazona.

Em estudo realizado com a finalidade de definir-se possíveis alvos moleculares responsáveis pelas propriedades farmacológicas de LASSBio-897 realizou-se uma bateria de testes contratados junto à empresa francesa CEREP. Observou-se que dos 100 alvos testados, LASSBio-897 mostrou possuir apenas afinidade de ligação ao receptor de adenosina do subtipo A_{2A} .

Verificou-se que a uma concentração de 10 μM , LASSBio-897 foi capaz de inibir em 72% a associação do radioligante específico, [^3H]CGS 21680, ao receptor A_{2A} em células humanas da linhagem HEK 293 (dados não publicados - Consórcio Pronex/INCT-INOVAR). Investigações adicionais foram realizadas a fim de elucidar os possíveis mecanismos de interação farmacológica do composto LASSBio-897 ao receptor A_{2A} expresso em células da linhagem HEK 293 transfectadas com uma luciferase ativada por AMP_c (HEKGlo). Observou-se que LASSBio-897 não é um agonista deste receptor, uma vez que não foi capaz de induzir aumento dos níveis intracelulares de AMP_c . No entanto, investigações posteriores revelaram que LASSBio-897 foi capaz de potenciar o efeito agonista da adenosina em um mecanismo dependente do receptor A_{2A} , visto que o antagonista seletivo desse receptor, SCH 58621, impediu o efeito potencializador de LASSBio-897 sobre o aumento dos níveis intracelulares de AMP_c induzido pela adenosina (Carvalho, V. F.; dados não publicados – Laboratório de Inflamação / Consórcio Pronex/INCT-INOVAR). De acordo com esses achados, LASSBio-897 atuaria como um modulador positivo do sítio alostérico do receptor A_{2A} .

As importantes ações anti-inflamatórias e antifibróticas desempenhadas por LASSBio-897 em associação às evidências de sua modulação alostérica sobre receptores de adenosina A_{2A} , propriedades farmacológicas de interesse para o controle de doenças inflamatórias crônicas, fundamentam uma investigação mais aprofundada da ação desse composto em modelos experimentais de inflamação e injúria pulmonar em resposta a alérgeno, LPS e partículas de sílica, visando definir sua potencial aplicação terapêutica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O estudo visa avaliar o potencial anti-inflamatório e antifibrótico do composto *N*-acilhidrazônico, LASSBio-897, em distintos modelos experimentais de doenças inflamatórias pulmonares com o propósito primordial de priorizar potenciais oportunidades de aplicação clínica.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar a eficácia do tratamento oral profilático com LASSBio-897 com base em modelo murino de resposta asmática aguda induzida por provocação alérgica;

2.2.2. Avaliar a eficácia do tratamento com LASSBio-897, “*in vitro*”, sobre a desgranulação anafilática de mastócitos;

2.2.3. Avaliar a eficácia do tratamento com LASSBio-897, “*in vitro*”, sobre a proliferação e sobrevivência de células T;

2.2.4. Avaliar a eficácia dos tratamentos terapêutico e profilático com LASSBio-897 com base em modelo murino de resposta asmática crônica induzida por provocação alérgica;

2.2.5. Avaliar a eficácia do tratamento com LASSBio-897 com base em modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS;

2.2.6. Avaliar a eficácia do tratamento terapêutico com LASSBio-897 com base em modelo murino de silicose;

2.2.7. Avaliar a eficácia de LASSBio-897 sobre a ativação de mastócitos, células epiteliais, macrófagos e fibroblastos estimulados com sílica “*in vitro*”.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos das cepas A/J e Swiss-Webster, machos e fêmeas, com peso corporal entre 18 e 20 gramas, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram acondicionados em grupos de no máximo cinco animais por caixa, com livre acesso a ração e água, e mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($21 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 10\%$, respectivamente). Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados dentro das normas preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ), segundo as licenças LW-23/10 (A/J) e L-034/09 (Swiss-Webster).

3.2. LASSBio-897

O composto LASSBio-897 foi fornecido pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Biotivas (LASSBio[®]). Em ensaios “*in vivo*”, o composto foi solubilizado em Tween 80 a 0,2% e salina estéril. Para a realização de ensaios “*in vitro*” envolvendo cultura de células, LASSBio-897 foi solubilizado em DMSO (Sigma Chemical Co), sendo mantidas concentrações finais máximas de 0,1% do veículo. Em ambos os casos, as soluções foram preparadas sempre imediatamente antes do uso.

3.3. Modelos experimentais

3.3.1. Protocolo de sensibilização e desafio antigênico com ovoalbumina

Utilizamos dois diferentes protocolos envolvendo sensibilização à ovoalbumina (Sigma Chemical Co). O primeiro modelo experimental de asma empregado no estudo reproduz um quadro de inflamação pulmonar aguda induzida por ovoalbumina, onde camundongos A/J machos foram ativamente

sensibilizados nos dias 0 e 14 através da injeção subcutânea dorsal de 200 μ L de uma suspensão contendo 50 μ g ovoalbumina e 5 mg de gel de hidróxido de alumínio em salina 0.9% estéril. No 19° e 20° dia, os animais foram anestesiados por meio da aerossolização de halotano (Tanohalo, Cristália) e submetidos ao desafio antigênico através de instilação de 25 μ L de uma solução salina contendo 25 μ g de ovoalbumina por via intranasal. O tratamento com LASSBio-897 foi realizado, por via oral, 1 h antes de cada provocação antigênica (Figura 3.1).

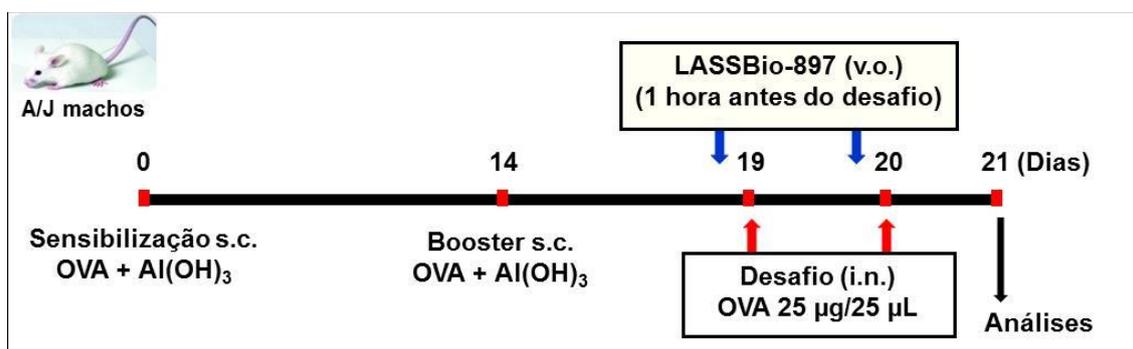


Figura 3.1. Esquema do modelo experimental de inflamação pulmonar aguda induzida por ovoalbumina.

O segundo protocolo experimental de asma empregado buscou mimetizar o quadro de inflamação pulmonar crônica desencadeado pela exposição a alérgeno. Para tanto, os animais foram ativamente sensibilizados nos dias 0 e 7, e desafiados com 25 μ L de uma solução salina contendo 50 μ g de ovoalbumina, por via intranasal, 1 vez por semana durante 4 semanas consecutivas. O tratamento terapêutico foi realizado na condição de um quadro inflamatório já instalando, onde LASSBio-897 foi administrado apenas nas duas últimas semanas de desafios (Figura 3.2 A). Enquanto, o tratamento profilático foi realizado da primeira a quarta semana, 1 h antes de cada desafio antigênico (Figura 3.2 B).

Em ambas as condições experimentais, o grupo controle foi representado por animais ativamente sensibilizados e desafiados com salina estéril e as análises foram realizadas 24 h após o último desafio.

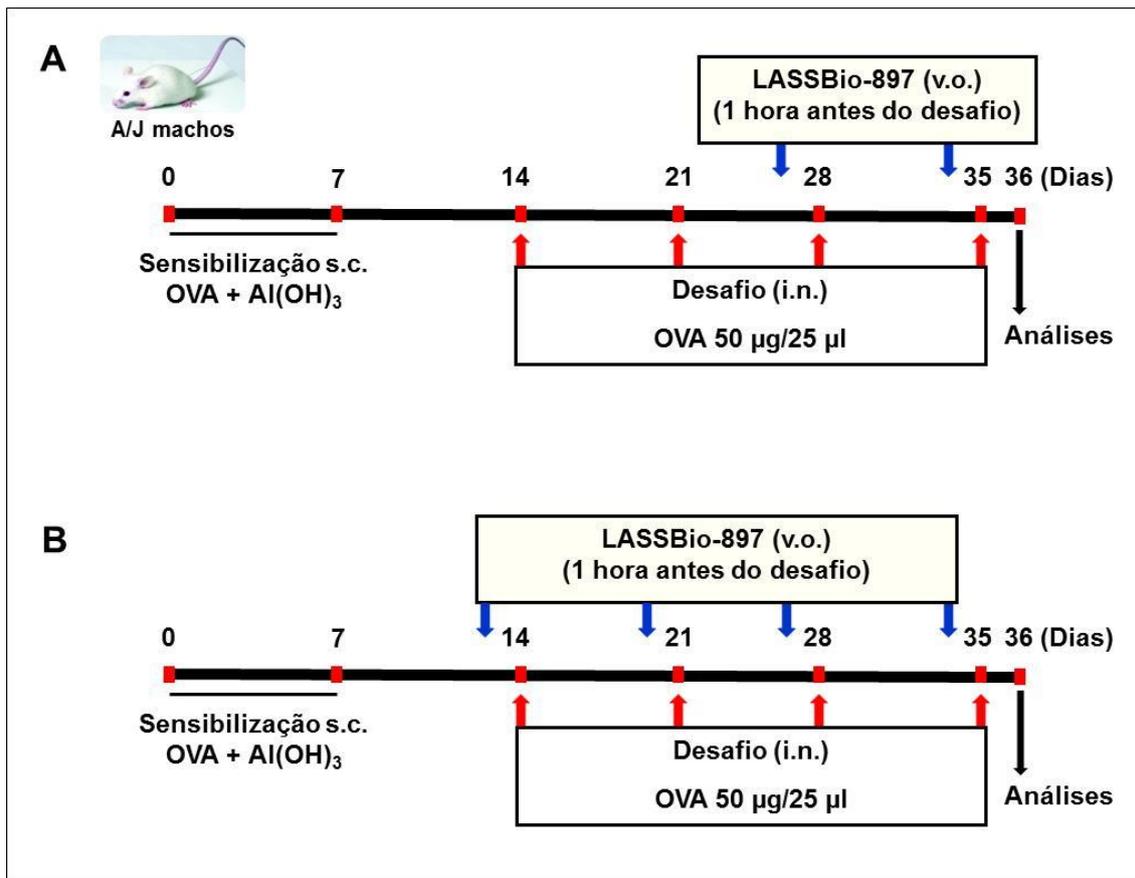


Figura 3.2. Esquema do modelo experimental de inflamação pulmonar crônica induzida por ovoalbumina. As figuras A e B ilustram a administração terapêutica e profilática de LASSBio-897, respectivamente.

3.3.2. Protocolo de indução de inflamação pulmonar desencadeada pelo desafio com LPS

Camundongos A/J fêmeas foram previamente tratados com LASSBio-897 e, após 1 h, submetidos à anestesia por halotano e desafiados por via intranasal com uma solução salina contendo 25 µg de LPS (Sigma Chemical Co) em um volume final de 25 µL. O grupo controle foi representado por animais desafiados com mesmo volume de salina estéril. As análises foram realizadas 24 h após o desafio.

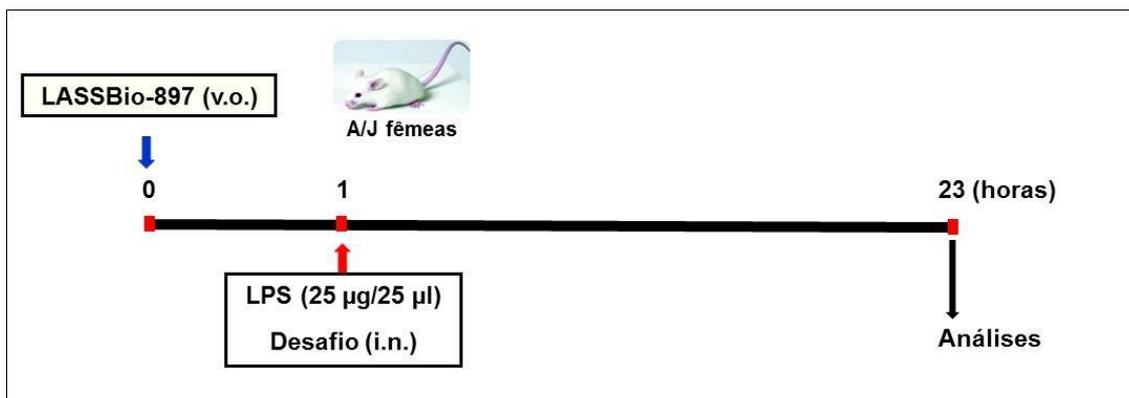


Figura 3.3. Esquema do modelo experimental de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS.

3.3.3. Protocolo de indução de silicose experimental

Camundongos Swiss-Webster machos foram anestesiados mediante aerossolização com halotano e desafiados por via intranasal com uma solução salina contendo 10 mg de sílica (SiO_2 – partículas com tamanho entre 0,5 e 10 μm – Sigma Chemical Co) em um volume final de 50 μL de salina estéril. O tratamento terapêutico com LASSBio-897, por via oral, foi realizado diariamente num período compreendido entre os dias 21 e 27 após o desafio com sílica. As análises foram realizadas decorridas 24 h do último tratamento com LASSBio-897.

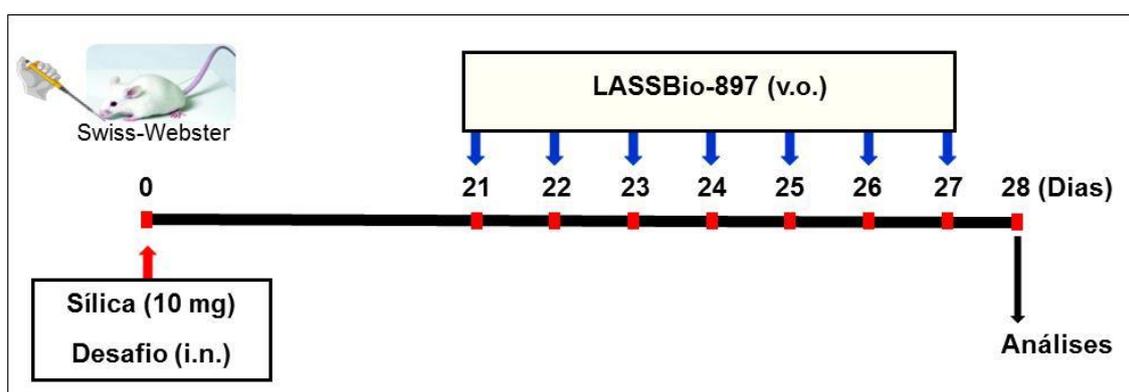


Figura 3.4. Esquema do protocolo de indução de silicose experimental.

3.4. Avaliação de hiper-reatividade das vias aéreas e função pulmonar

A avaliação da função pulmonar foi realizada através de pletismografia de corpo inteiro invasiva (Buxco). Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com 60 mg/kg de nembutal e curarizados com 1 mg/kg de brometo de pancurônio (Pavulon®). Após traqueostomia para a inserção de uma cânula, os animais foram acomodados em uma cama aquecida para manutenção da temperatura corporal. Em seguida, a cânula endotraqueal foi conectada a um ventilador mecânico com a finalidade de manter os parâmetros de fluxo e volume constantes. Concomitantemente, um cateter preenchido com água foi inserido por via oral para detecção da pressão esofágiana. A detecção do fluxo respiratório foi realizada através de um pneumotacógrafo acoplado à câmara do pletismógrafo. Os valores de pressão esofágiana e pressão resultante do fluxo respiratório foram registrados e transferidos a um computador através de um transdutor ligado a câmara do pletismógrafo. Os parâmetros de resistência (cmH₂O.s/mL) e elastância (cmH₂O/mL) pulmonares foram determinados a partir processamento dos valores de fluxo e pressão através do *software* ByoSystem XA.

A avaliação da hiper-reatividade das vias aéreas foi realizada mediante aerossolização de concentrações crescentes (3, 9 e 27 mg/mL) de metacolina, onde a resposta a cada dose do agente broncoconstrictor foi registrada durante 5 minutos.

3.5. Lavado broncoalveolar

Após a análise de função pulmonar, os camundongos foram sacrificados através de anestesia terminal com 500 mg/kg tiopental (Thiopentax, Cristália) por via intraperitoneal, e em seguida, a traqueia foi dissecada e canulada. O lavado broncoalveolar (BAL) foi obtido através de três lavagens consecutivas com 0,5 mL de salina tamponada (PBS) contendo EDTA (10 mM). As amostras foram centrifugadas 110 x g durante 10 min, e ao “*pellet*” resultante foi adicionado 250 µL de PBS/EDTA 10 mM. Alíquotas das amostras foram diluídas em Türk (ácido acético glacial 2% e azul de metileno) a uma proporção de 1:10 e a contagem de células totais foi realizada em câmara de

Neubauer em microscópio de luz. A contagem diferencial de células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos foi realizada em amostras citocentrifugadas a uma rotação de 47 x g, por 5 min (Incibrás) e corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio ótico com objetiva de imersão em óleo (objetiva 100x).

3.6. Obtenção de tecido pulmonar

Após a realização do lavado broncoalveolar, os pulmões foram perfundidos, com o auxílio de uma cânula intracardíaca, com salina contendo 10 mM de EDTA, seguido da remoção dos pulmões. O lobo direito do pulmão foi fragmentado, pesado, congelado em nitrogênio líquido e conservado a -80°C para análises posteriores. O lobo esquerdo foi infundido com formol tamponado a 10% e conservado na mesma solução até o processamento histológico.

3.7. Análise histológica

O processamento do tecido pulmonar para análise histopatológica incluiu as etapas de desidratação em gradientes crescentes de etanol, clarificação em xilol, e inclusão em parafina. Cortes histológicos com espessura de 4 µm foram obtidos das amostras de tecido pulmonar, e submetidos à coloração com Hematoxilina & Eosina (HE), picro-sirius ou destinados às análises por imunohistoquímica. As análises foram realizadas em microscópio de luz (Olympus U-TV1X) e as imagens foram obtidas através de uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio (Olympus Q Color 3 – 0044C-194). A aquisição das imagens digitais foi realizada mediante utilização de um *software* de análise (Q capture - versão 3.1).

3.8. Análise morfométrica

Para determinar a área ocupada por granuloma no pulmão, utilizou-se a técnica de contagem de pontos (Cruz-Orive & Weibel, 1990, Sakae e cols., 1994). Para tanto, um retículo, contendo um sistema de 100 linhas e 50

segmentos de reta paralelos, foi afixado a ocular do microscópio. Foram avaliados 10 campos aleatórios e não coincidentes por lâmina em aumento de 200x. O número total de pontos que interceptaram granulomas foi dividido pelo número total de pontos do retículo, a fim de determinar a fração de área do tecido pulmonar ocupada por granuloma. Os valores encontrados foram expressos sob a forma percentual (%).

3.9. Imunohistoquímica

Para identificação do perfil das populações de macrófagos e fibroblastos no tecido pulmonar, verificou-se a expressão das proteínas F4/80 e α -SMA, respectivamente, através da técnica de imunohistoquímica. Para tanto, cortes do tecido pulmonar foram fixados em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma Chemical Co.) e submetidos ao processo de desparafinização com xilol e hidratação com banhos de concentrações crescentes de etanol. Em seguida, foi realizada a etapa de recuperação antigênica, onde os cortes foram incubados com ureia 3 M durante 15 min. Após esse tempo, foram realizadas 3 lavagem sucessivas com TBS (Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,5 M, pH 7,6), seguidas da incubação com H₂O₂ 3% em metanol durante 15 min para inativação de peroxidase endógena. Após lavagem com TBS, foi realizado o bloqueio de sítios de ligação inespecífica com BSA 5% em Tris-HCL 0,05 M durante 1 h. Posteriormente, foi realizada a incubação com anticorpo primário anti-F4/80 (1:100, Serotec) ou anti- α -SMA (1:800, Sigma) durante 12 h a 4°C. As lâminas foram novamente lavadas com solução de TBS e foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-IgG conjugado a HRP para F4/80 (1:80; anti-IgG de camundongo, Serotec) e para α -SMA (1:80; anti-IgG de cabra, R&D) durante 2 h em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com TBS e foi realizada a revelação da atividade da peroxidase através da incubação com 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) entre 10 a 20 min. Após lavagem com água destilada, os cortes de tecido pulmonar foram contra-corados com hematoxilina de Mayer durante 1 min. Em seguida, as lâminas foram montadas em meio aquoso contendo gelatina. As análises foram realizadas em microscópio de luz (Olympus U-TV1X) e as imagens foram obtidas através de uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio (Olympus Q Color 3 – 0044C-

194). A aquisição das imagens digitais foi realizada mediante utilização de um *software* de análise (Q capture - versão 3.1). As análises quantitativas foram realizadas através do software Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics) e os resultados expressos em pixel/ μm^2 .

3.10. Microscopia de polarização

A presença de partículas de sílica e a densidade de fibras de colágeno no tecido pulmonar foram avaliadas através de microscopia de polarização em cortes corados com picro-sírius. As imagens foram obtidas através de uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio (Olympus Q Color 3 – 0044C-194). A aquisição das imagens digitais foi realizada mediante utilização de um *software* de análise (Q capture - versão 3.1).

3.11. Quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA

O tecido pulmonar foi homogeneizado em uma solução de PBS contendo 0,1% de Triton X-100 (Armsham Biosciences) e um coquetel de inibidores de proteases (Complete – Roche). O homogenato resultante foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C.

A produção de mediadores inflamatórios foi mensurada através do ensaio “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*” (ELISA). Para a realização do ensaio, placas de 96 poços foram utilizadas, e a cada poço foi adicionado 100 μL do anticorpo capturador, o qual foi mantido em incubação por um período de 18 h à temperatura ambiente. Após esse tempo, as placas foram lavadas e foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com 250 μL de PBS/BSA 1% por poço durante 1 h. As amostras e os padrões foram diluídos em tampão de ensaio contendo soro fetal bovino 2%, e em seguida, adicionadas aos poços, permanecendo incubados durante 18 h a 4°C. Após a lavagem da placa com tampão de ensaio, o anticorpo de detecção biotilado foi aplicado aos poços. Decorrida 1 h, outra lavagem foi realizada e adicionou-se a enzima neutravidina conjugada a HRP. Após a lavagem das placas, o substrato (K-Blue®) foi adicionado. Decorrida a reação colorimétrica (5 – 30 min), a mesma foi

interrompida com a adição de H_2SO_4 (0,19 M). A leitura de densidade óptica (DO) foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em mg de tecido pulmonar ou pg/mL nas amostras de sobrenadante de cultura.

3.12. Quantificação de colágeno por Sircol

A quantificação do conteúdo de colágeno presente no pulmão ou no sobrenadante da cultura foi realizada através da técnica de Sircol (Biocolor). O processamento do tecido pulmonar foi realizado em uma solução de Tris 0,05 M + NaCl 1 M. O macerado resultante foi mantido a 4°C durante 18 h. Passado o período de incubação, o macerado foi centrifugado a 10.000 x g durante 1 h a 4°C. Alíquotas de 20 μL do macerado do tecido pulmonar ou do sobrenadante da cultura de fibroblastos pulmonares foram incubadas com 1 mL do reagente Sirius Red durante 30 min em temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o precipitado resultante foi solubilizado em reagente Alkaline, permanecendo sob incubação durante 10 min. A quantificação foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590 nm.

3.13. Western Blotting

A expressão do fator de transcrição nuclear NF- κB foi avaliada no tecido pulmonar através da técnica de Western Blotting. Para tanto, fragmentos do tecido pulmonar foram macerados em solução de PBS contendo coquetel de inibidores de proteases (Complete – Roche). O homogenato resultante foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado, e em seguida, foi realizada a quantificação de proteínas através de um método de detecção colorimétrica utilizando-se ácido bichinoninico (BCA). Após adição de tampão de amostra SDS-PAGE (Tris 0,1 M pH 6,8, SDS 4%, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,2% e glicerol 2%) a alíquotas do sobrenadante contendo 100 μg de proteína, foi realizado aquecimento a 95°C durante 5 min. As amostras foram submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (10%), contendo SDS, a uma diferença de potencial de 120 V.

Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. O bloqueio de sítios de ligação inespecíficos foi realizado através da incubação das membranas com BSA 5% durante 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a incubação “*overnight*” com anticorpo primário (NF-κB p65, Santa Cruz) a 4°C sob agitação. Após 3 lavagens consecutivas com TBS-T, foi realizada a incubação com anticorpo secundário conjugado a peroxidase durante 1 h. Em seguida, outra etapa de lavagem com TBS-T foi realizada e a detecção das bandas foi realizada através da adição do substrato ECL (GE Healthcare).

3.14. Avaliação de células alvo “*in vitro*”

3.14.1. Linfócitos

Camundongos DO11.1 (TCR Tg) foram sacrificados em câmara de CO₂ e os linfonodos cervicais, axilares e inguinais foram removidos. Em seguida, os linfonodos foram macerados em 1 mL de meio DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium, Sigma Chemical Co.) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SBF, Gibco), aminoácidos não essenciais 0,1 mM (Gibco), aminoácidos essenciais 1x (Gibco), vitaminas 1x (Gibco), L-glutamina 2 M (Sigma Chemical Co.), β-mercaptoetanol 55 μM (Gibco), penicilina 1x10⁶ U/mL (Gibco), estreptomicina 0,2 g/mL (Gibco). O macerado resultante foi centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C e o precipitado foi ressuspensionado em meio. As células foram diluídas em Azul de Tripán 0,2% e contadas em câmara de Neubauer em microscópio de luz. Na sequência, as células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 1 x 10⁶ células/poço e incubadas com 0,5 mg/mL de ovoalbumina e diferentes concentrações de LASSBio-897 (10⁻⁶ a 10⁻⁴ M) ou 50 μg/mL de dexametasona (Sigma Chemical Co.) durante 72 h em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após esse período de tempo, as células foram recolhidas e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min a 4°C. O precipitado resultante foi ressuspensionado em 300 μL de iodeto de propídeo (Sigma Chemical Co.) e, em seguida, transferidos para tubos de citometria, permanecendo incubados durante 15 min, ao abrigo da luz,

a 8°C. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences) no canal FL3.

3.14.2. Mastócitos

Para quantificação de desgranulação anafilática, foram utilizadas células da linhagem RBL-2H3. As células foram cultivadas em meio DEMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Sigma Chemical Co.) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Cultilab), penicilina (1×10^6 U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL) e mantidas em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C.

Para a quantificação de desgranulação induzida por sílica, foram utilizadas mastócitos diferenciados da medula óssea de camundongos Balb/c. Para tanto, os animais foram sacrificados e as tíbias e fêmures removidos. Em seguida, cada cavidade óssea foi lavada com 5 mL de meio RPMI suplementado com 20% de SBF. O conteúdo removido da cavidade óssea foi homogeneizado e centrifugado a 277 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 40 mL de meio RPMI suplementado com 30% de meio condicionado de WEHI. Após a quarta passagem, a população celular foi caracterizada através de coloração com Giemsa e azul de toluidina, onde 95% das células foram identificados como mastócitos.

A avaliação da desgranulação de mastócitos foi realizada através da quantificação da taxa de liberação de β -hexosaminidase (β -hex) no sobrenadante da cultura, conforme anteriormente descrito (Han e cols., 2009). Para realização do ensaio, células em confluência foram tripsinizadas com uma solução de tripsina 0,125% (Gibco BRL) e EDTA 0,02% (Sigma Chemical Co.), centrifugadas a 1000 rpm por 5 min e $1,25 \times 10^5$ células/poço foram semeadas em placas de 48 poços. Para avaliação de desgranulação anafilática, as células foram sensibilizadas com IgE anti-DNP (1 μ g/mL, Sigma Chemical Co.) e incubadas por 20 h. Em seguida, as células foram incubadas com LASSBio-897 (10^{-7} a 10^{-4} M) ou veículo (DMSO 0,1%) durante 1 h. Após esse período, as células foram estimuladas com DNP-BSA (10 ng/mL, Sigma Chemical Co.) em meio tyrode durante 45 min. Quando avaliou-se a desgranulação induzida por sílica, as células foram incubadas com LASSBio-897 (10^{-7} a 10^{-4} M) ou veículo

(DMSO 0,1%) durante 1 h e, em seguida, estimuladas com 300 µg/mL de sílica durante 90 min. Em ambas as condições, o sobrenadante foi recolhido e as células foram lisadas com 20 µL de Triton X-100 1%. Em seguida, 10 µL do sobrenadante da cultura ou do lisado celular foi incubado com 40 µL do substrato (p-nitrofenil-B-D.2-acetamido-2-deoxi-glicopiranosídeo 4 mM em tampão de citrato de sódio, pH 4,5). A reação foi interrompida com a adição de 150 µL de glicina 0,2 M. A secreção de β-hexosaminidase foi mensurada através de um espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm. A liberação de β-hexosaminidase foi expressa como uma porcentagem da β-hexosaminidase total presente na célula.

3.14.3. Células epiteliais humanas

Foram utilizadas células de uma linhagem de pneumócitos tipo II derivados de adenocarcinoma pulmonar humano, A549, fornecida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ/UFRJ. As células foram cultivadas em meio DEMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Sigma Chemical Co.) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Cultilab), penicilina (1×10^6 U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL) e mantidas em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. Para realização do ensaio, foram utilizadas placas de 24 poços e as células foram semeadas a uma densidade de $0,5 \times 10^5$ células/poço. Após 18 h, as células foram incubadas com LASSBio-897 (10^{-6} a 10^{-4} M) durante 1 h. Em seguida, foi realizada a estimulação das células com partículas de sílica (300 µg/mL) durante 24 h sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse tempo, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C para posterior quantificação de IL-8.

3.14.4. Macrófagos alveolares

Foram utilizadas células de uma linhagem de macrófagos alveolares murinos, AMJ2C11, fornecida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ/UFRJ. As células foram cultivadas em meio DEMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Sigma Chemical Co.) suplementado com 5% soro

fetal bovino (Cultilab), penicilina (1×10^6 U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL) e mantidas em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. Para realização do ensaio, foram utilizadas placas de 24 poços e as células foram semeadas a uma densidade de 5×10^5 /poço. Após 18 h, as células foram incubadas com LASSBio-897 (10^{-6} a 10^{-3} M) durante 1 h. Em seguida, foi realizada a estimulação das células com partículas de sílica (300 µg/mL) durante 6 h sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse tempo, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C para posterior quantificação de TNF- α .

3.14.5. Cultura primária de fibroblastos pulmonares

Os camundongos Swiss Webster foram sacrificados 7 dias após o desafio com sílica ou salina. Após toracotomia, em condições assépticas, os pulmões foram perfundidos através do coração com 20 mL de PBS (Sigma Chemical Co.) estéril. Os pulmões foram, então, removidos e cortados em pequenos pedaços e passaram por duas etapas de digestão enzimática/mecânica. Cada etapa de digestão enzimática/mecânica consistiu na incubação dos fragmentos de tecidos pulmonar com colagenase tipo 1A (1 mg/mL; Gibco BRL), sob agitação, durante 1 h a 37°C. O digerido resultante foi filtrado através de uma malha de nylon e centrifugado a 504 x g durante 10 min a 4°C. O precipitado foi ressuspensionado em meio DEMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Sigma Chemical Co.) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (0,1 mg/mL) e adicionado a garrafas de cultura de 75 cm² (Corning Costar Corporation). As células foram mantidas em cultura de monocamadas até a confluência e tripsinizadas com uma solução de tripsina 0,125% (Gibco BRL) e EDTA 0,02% (Sigma Chemical Co.). A população celular foi caracterizada, após a terceira tripsinização, pela expressão de α -actina de músculo liso através de imunocitoquímica.

3.14.6. Ensaio de proliferação de fibroblastos pulmonares

Para avaliação da proliferação de fibroblastos, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $12,5 \times 10^3$ células/poço. Após 24 h, as células foram incubadas com LASSBio-897 (10^{-9} a 10^{-5} M) durante 1 h e, em seguida, foram estimuladas com IL-13 (40 ng/mL). Após incubação por um período de 20 h, 0,5 μ Ci de timidina⁺³H (Metil-³H-Timidina, Amersham) foi adicionado a cada poço. Decorrido o período de 4 h de incubação com timidina⁺³H, a emissão de radioatividade foi mensurada em um contador de partículas beta (Beckman, Série LS-6500).

3.15. Análise estatística

Os resultados foram representados como Média \pm Erro Padrão da Média. As diferenças entre as variáveis foram estatisticamente analisadas através de análise de variância ANOVA e, posteriormente, foi realizado o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student. Comparações entre dois grupos experimentais foram atestadas através da aplicação do teste 't' de Student para amostras não pareadas. Os parâmetros de área de granuloma foram representados em forma percentual (%). Com a finalidade de permitir a utilização dos testes de variância descritos acima, os valores foram previamente submetidos à transformação arco-seno para tornar sua distribuição próxima à normal. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Efeito do tratamento profilático com LASSBio-897 sobre a resposta pulmonar aguda induzida por ovoalbumina em camundongos

A asma apresenta bastante heterogeneidade clínica quanto à severidade da doença. Assim, iniciamos o estudo sobre os efeitos do composto LASSBio-897 em um modelo experimental de asma que reproduz um quadro de inflamação pulmonar aguda. Avaliamos inicialmente a ação de LASSBio-897 sobre a função pulmonar e a hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Verificamos que animais submetidos ao desafio antigênico apresentaram níveis basais de resistência pulmonar aumentados em relação aos seus respectivos controles. Mediante a aerossolização de concentrações crescentes (3 – 27 mg/mL) do agente colinérgico broncoconstrictor, metacolina, observou-se a intensificação da resposta de resistência pulmonar de maneira concentração-dependente, tanto nos animais controle como nos animais desafiados com OVA, sendo esses últimos nitidamente mais reativos à estimulação. A administração profilática da maior dose de LASSBio-897 (5 mg/kg) mostrou efeito inibitório sobre a resposta de resistência pulmonar produzida pelas concentrações de 9 e 27 mg/mL de metacolina nos animais antígenicamente desafiados, enquanto a dose de 2 mg/kg de LASSBio-897 foi efetiva apenas em resposta à estimulação com a maior concentração de metacolina (Figura 4.1 A). Observamos um perfil semelhante no que concerne ao parâmetro de elastância pulmonar, onde verificou-se a presença de níveis basais mais elevados nos animais expostos ao alérgeno, quando comparado ao grupo controle. Evidenciou-se ainda uma resposta acentuada quando esses animais foram submetidos à estimulação com metacolina, tornando-se notória a presença de hiper-reatividade no quadro asmático. Nessas condições, o pré-tratamento com o composto LASSBio-897 nas concentrações de 2 e 5 mg/kg inibiu as alterações de elastância pulmonar, comparado ao grupo controle ovoalbumina (Figura 4.1 B).

O estabelecimento do quadro inflamatório é crucial na evolução da patologia da asma, assim, avaliamos o desempenho do tratamento com LASSBio-897 sobre o infiltrado de leucócitos no lavado broncoalveolar de

animais desafiados com ovoalbumina. As análises revelaram alterações no perfil de células inflamatórias, recuperadas no espaço broncoalveolar, desencadeadas pela exposição ao antígeno, onde observamos uma elevação do número de leucócitos totais (Figura 4.2 A) que foi acompanhado pelo expressivo aumento de células mononucleares (Figura 4.2 B), eosinófilos (Figura 4.2 C) e neutrófilos (Figura 4.2 D). O tratamento com LASSBio-897, em ambas as doses testadas, reduziu o número de leucócitos totais infiltrantes nos pulmões dos animais sensibilizados e provocados antigenicamente quando comparado ao grupo salina. LASSBio-897 também foi eficaz em promover a inibição do influxo de células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos para os pulmões ante a estimulação alérgica em todas as concentrações testadas (Figura 4.2).

A secreção de citocinas e quimiocinas por células inflamatórias é fundamental para a progressão e perpetuação do processo inflamatório na asma. Avaliamos o impacto do pré-tratamento com LASSBio-897 sobre o aumento dos níveis teciduais de mediadores inflamatórios suscitado pela exposição à ovoalbumina. Observamos que as citocinas IL-4 (Figura 4.3 A), IL-5 (Figura 4.3 B), IL-13 (Figura 4.3 C), IFN- γ (Figura 4.3 D) e a quimiocina eotaxina-1 (Figura 4.3 E) mostraram-se em níveis teciduais aumentados em animais antígenicamente desafiados, comparados àqueles apresentados por animais controle. O composto LASSBio-897 foi capaz de bloquear a geração das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ e reduzir significativamente o teor da quimiocina eotaxina-1 no tecido pulmonar de camundongos desafiados com ovoalbumina (Figura 4.3).

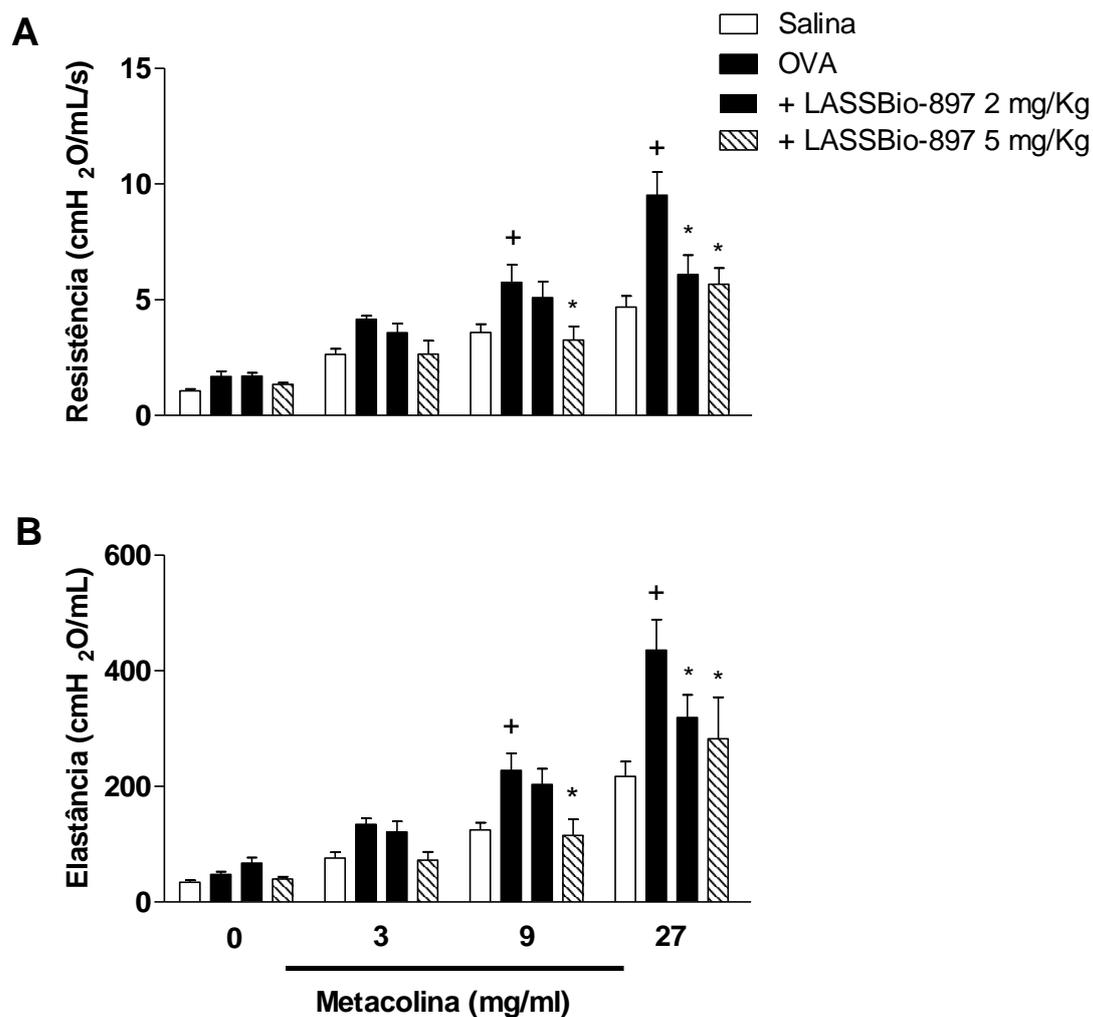


Figura 4.1. Efeito do tratamento com LASSBio-897 sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos ativamente sensibilizados, nos dias 0 e 14, e desafiados com ovoalbumina nos dias 19 e 20 após a sensibilização. O tratamento com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 h antes de cada desafio antigênico. Os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonares foram analisados perante aerosolização de PBS ou metacolina (3 – 27 mg/mL), 24 h após a última instilação intranasal de OVA, com ajuda de metodologia baseada na técnica de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasiva. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=6). $^+P<0.05$ comparado ao grupo desafiado com salina; $^*P<0.05$ comparado ao grupo desafiado com OVA.

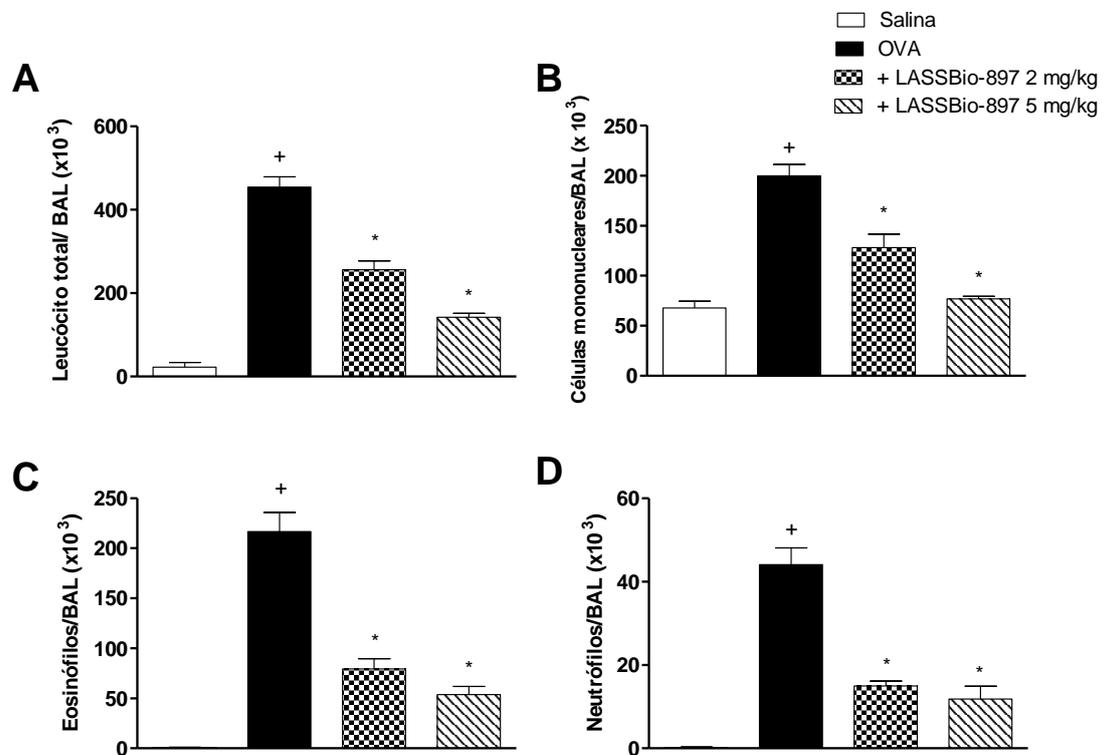


Figura 4.2. Efeito do tratamento com LASSBio-897 sobre o infiltrado de células inflamatórias nos pulmões de camundongos ativamente sensibilizados nos dias 0 e 14 e desafiados com ovoalbumina (OVA) nos dias 19 e 20 após a sensibilização. O tratamento com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 hora antes de cada desafio antigênico. Leucócitos totais (A), células mononucleares (B), eosinófilos (C) e neutrófilos (D) foram diferenciados em amostras de lavado broncoalveolar citocentrifugadas e coradas pelo método de May-Günwald-Giemsa. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=4). ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo desafiado com salina; ^{*} $P < 0.05$ comparado ao grupo desafiado com OVA.

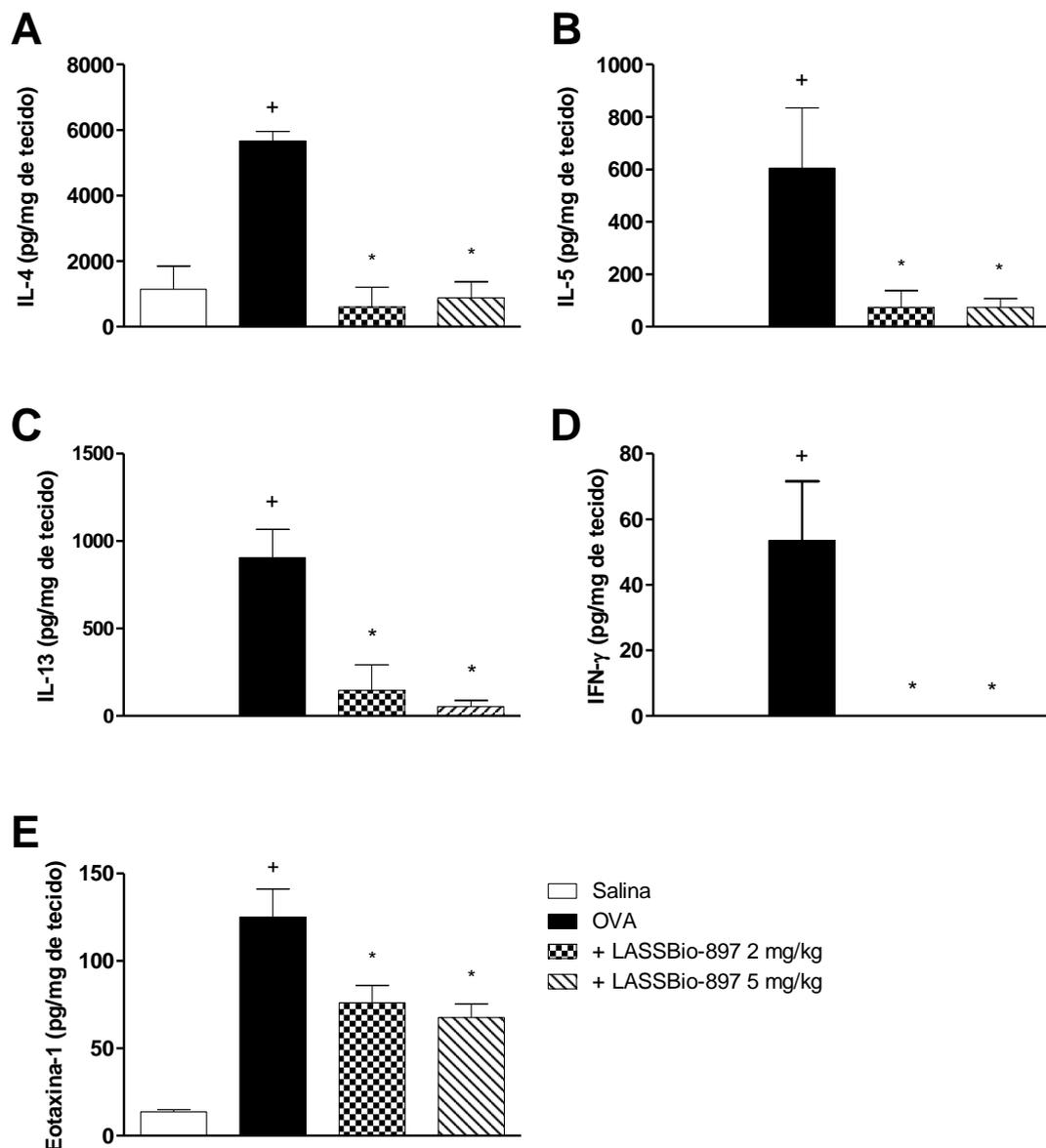


Figura 4.3. Efeito do tratamento com LASSBio-897 sobre a geração de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos ativamente sensibilizados nos dias 0 e 14 e desafiados com OVA nos dias 19 e 20 após a sensibilização. O tratamento com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 hora antes de cada desafio antigênico. Foram quantificados os níveis teciduais de IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C), IFN- γ (D) e eotaxina-1 (E), através do método de ELISA. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n= 6). ⁺ P <0.05 comparado ao grupo desafiado com salina; * P <0.05 comparado ao grupo desafiado com OVA.

4.2. Efeito do composto LASSBio-897 “*in vitro*” sobre potenciais células alvos envolvidas na asma

Os linfócitos T são importantes células-alvo em condições de asma, portanto, investigamos o efeito do composto LASSBio-897 sobre a sobrevivência e a proliferação de linfócitos ativados provenientes dos linfonodos cervicais, axilares e inguinais de camundongos DO11.10 (TCR Tg), os quais expressam receptores de células T que reconhecem apenas ovoalbumina. Verificamos que a estimulação direta dessas células com OVA culmina em um aumento percentual de células na fase S (síntese de DNA) + G2 (replicação celular) – fases proliferativas – e reduz o percentual de células na fase sub-G0 – em apoptose. Conforme esperado, o agente glicocorticoide clássico dexametasona promoveu um aumento de apoptose e uma redução da proliferação, comparado às células estimuladas com OVA. Por outro lado, o composto LASSBio-897 foi ineficaz em promover uma redução das taxas de proliferação de linfócitos estimulados. O tratamento foi também incapaz de interferir no percentual de células em apoptose quando antigenicamente estimuladas (Figura 4.4).

Avaliamos o efeito de LASSBio-897 em uma linhagem de mastócitos, RBL-2H3. Observamos que células sensibilizadas com IgE anti-DNP-BSA foram responsivas ao desafio com DNP-BSA, uma vez que a taxa de liberação de β -hexosaminidase no sobrenadante elevou-se de aproximadamente 8% para 60% em resposta à estimulação. O tratamento com LASSBio-897 em diferentes concentrações foi incapaz de impedir a desgranulação passiva de mastócitos induzida pelo desafio antigênico (Figura 4.5).

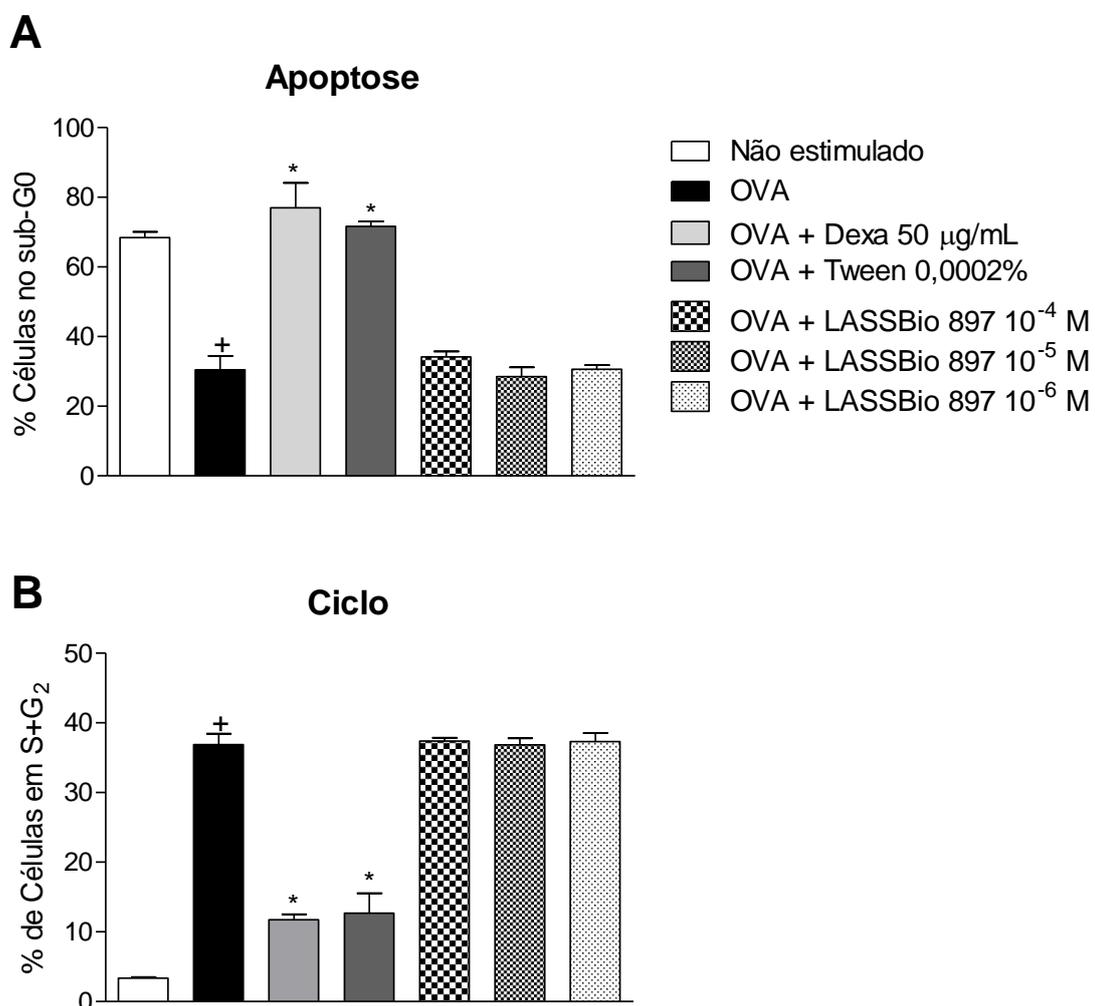


Figura 4.4. Efeito do composto LASSBio-897 sobre a proliferação e a sobrevivência de linfócitos provenientes de linfonodos cervicais, axilares e inguinais de camundongos DO11.10 (TCR Tg). Os resultados representam média \pm Erro Padrão da Média (n= 4). $^+P < 0.05$ comparado ao grupo não estimulado. $^*P < 0.05$ comparado ao grupo estimulado com OVA.

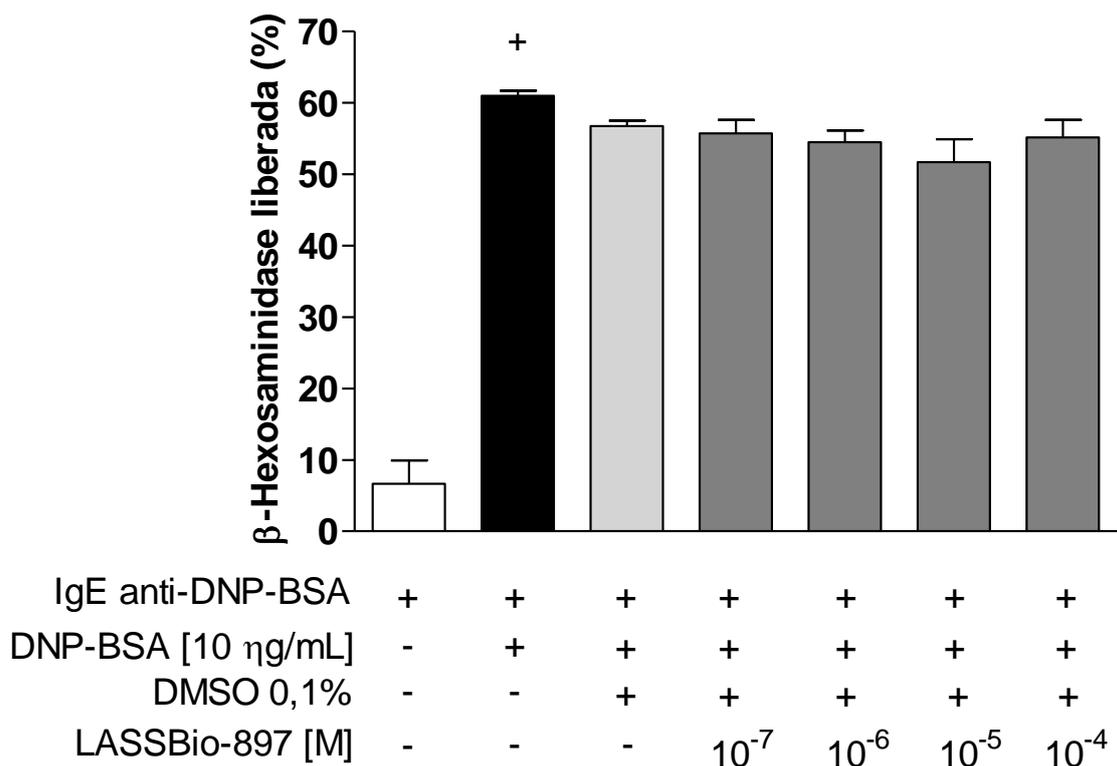


Figura 4.5. Efeito do tratamento com o composto LASSBio-897 sobre desgranulação anafilática de mastócitos. Células da linhagem RBL-2H3 foram sensibilizadas com IgE anti-DNP-BSA e tratadas com diferentes concentrações de LASSBio-897 durante 1 h. Os resultados representam a média ± Erro Padrão da Média de 3 replicatas por grupo.⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo não estimulado.

4.3. Efeito do tratamento terapêutico com LASSBio-897 sobre a resposta pulmonar crônica induzida por ovoalbumina em camundongos

Realizamos, em seguida, um estudo acerca dos efeitos do composto LASSBio-897 sobre a resposta asmática crônica. Os camundongos foram submetidos a provocações antigênicas por quatro semanas consecutivas e a administração de LASSBio-897 foi realizada terapêuticamente, nas duas últimas semanas, ou seja, o tratamento foi realizado na presença de um quadro inflamatório já instalado.

Os resultados de mecânica ventilatória revelaram que as repetidas exposições ao alérgeno produziram alterações nos níveis de resistência e elastância pulmonares. Observou-se que em termos de resistência pulmonar, o pós-tratamento com LASSBio-897 falhou em inibir o quadro de hiperreatividade revelado pela exposição à metacolina (Figura 4.6 A). De forma semelhante, vimos que a resposta de exarcebação dos níveis de elastância decorrente da exposição à metacolina no grupo OVA não foi sensível ao tratamento com LASSBio-897 em nenhuma das doses testadas (Figura 4.6 B).

A análise da produção de mediadores da inflamação mostrou uma acentuada geração de eotaxina-1 (Figura 4.7 A), eotaxina-2 (Figura 4.7 B), MIP-1 α (Figura 4.7 C), IL-5 (Figura 4.7 D), IL-13 (Figura 4.7 E) e IFN- γ (Figura 4.7 F) nos pulmões de camundongos desafiados com OVA, comparado aos animais instilados apenas com salina. O composto LASSBio-897 quando administrado terapêuticamente não inibiu a produção de eotaxina-1, eotaxina-2, MIP-1 α , IL-5, IL-13, entretanto, foi observado uma redução significativa de IFN- γ no tecido pulmonar (Figura 4.7).

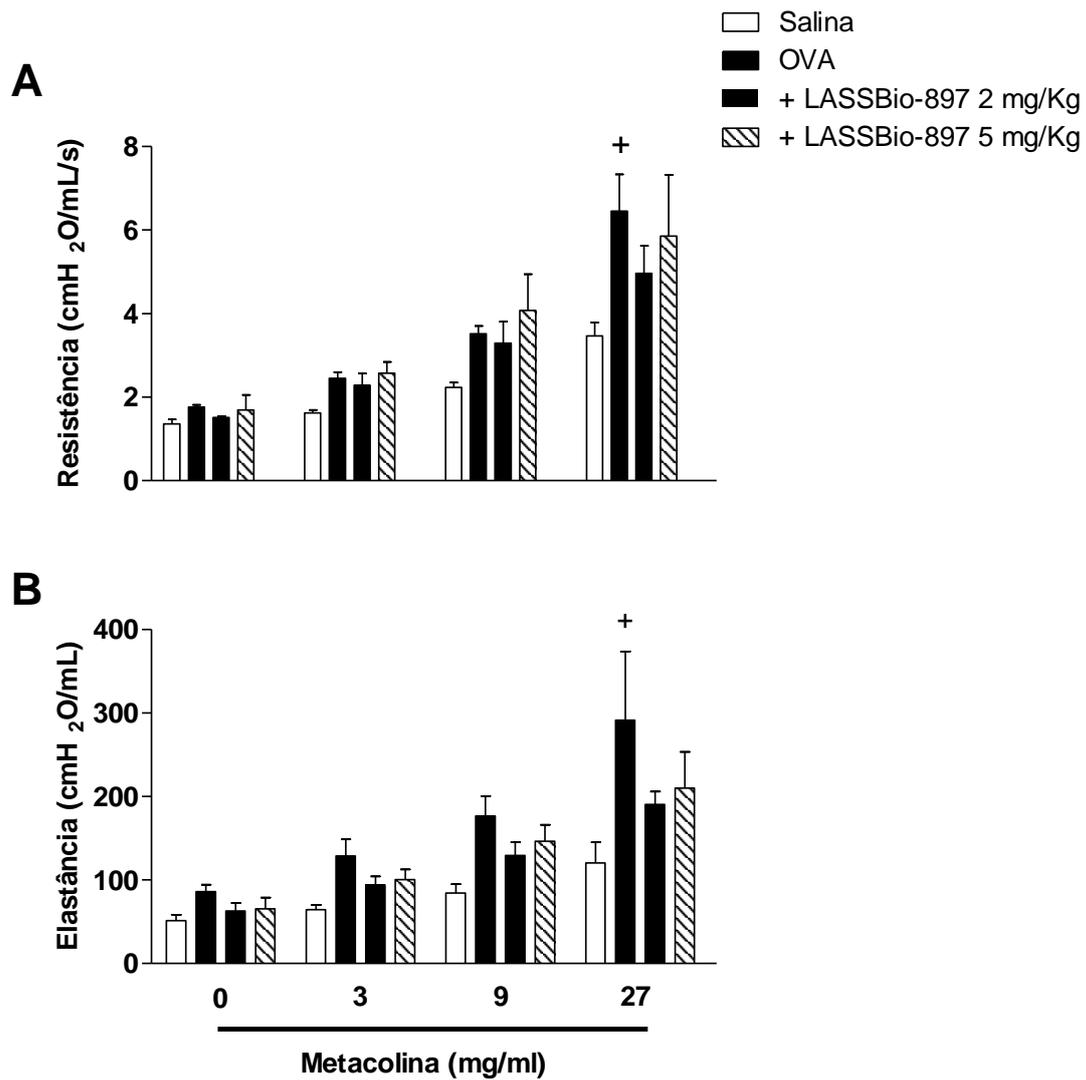


Figura 4.6. Falta de efeito do tratamento terapêutico com o composto LASSBio-897 sobre a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas com base no modelo de asma crônica. Os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonares foram analisados 24 h após a última instilação intranasal de OVA. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=6). ⁺P<0.05 comparado ao grupo desafiado com salina.

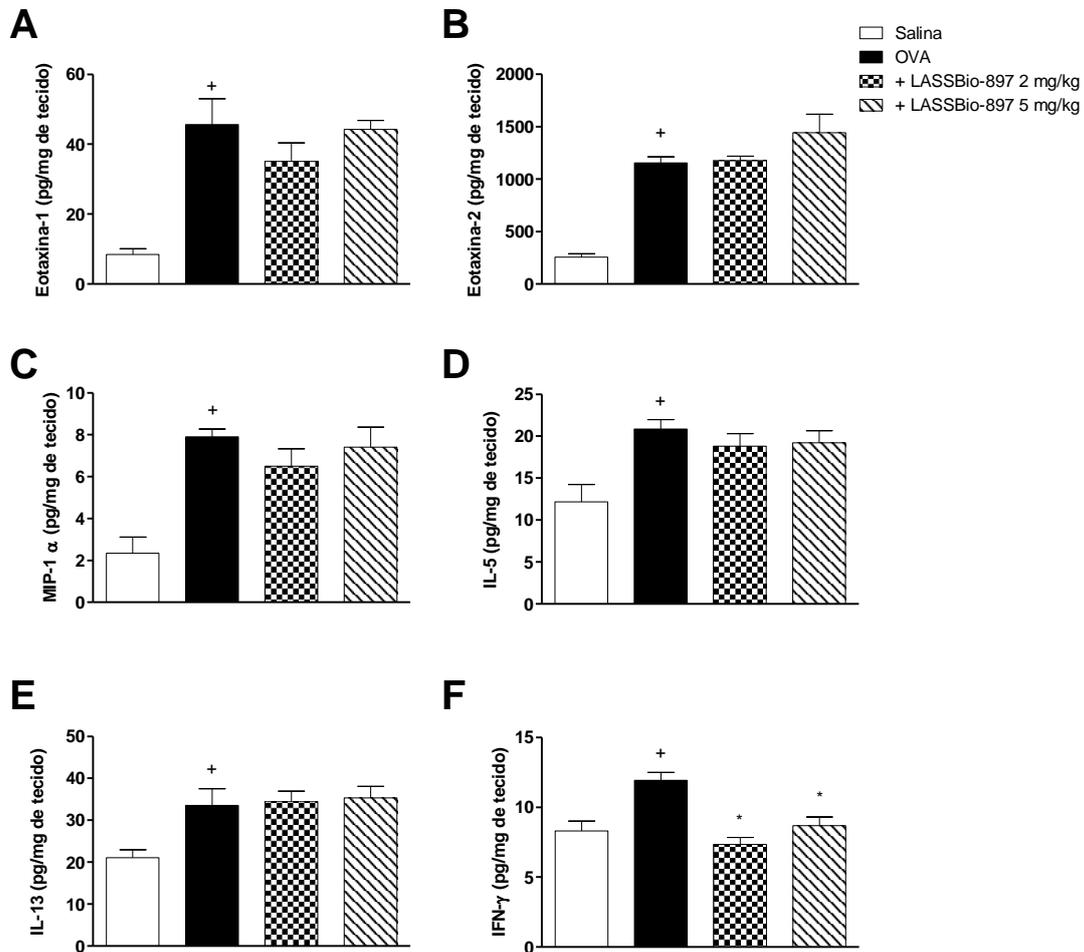


Figura 4.7. Efeito do tratamento terapêutico com LASSBio-897 sobre a geração de citocinas e quimiocinas em amostras de tecido pulmonar de camundongos submetidos a provocação crônica com OVA. 24 h após a última provocação antigênica foram quantificados eotaxina-1 (A), eotaxina-2 (B), MIP-1α (C), IL-5 (D), IL-13 (E) e IFN-γ (F) através do método de ELISA. Os resultados representam a média ± Erro Padrão da Média (n= 6). ⁺P<0.05 comparado ao grupo desafiado com salina. ^{*}P<0.05 comparado ao grupo desafiado com OVA.

A cronicidade da inflamação observada na asma leva ao remodelamento das vias aéreas, alterando a composição do arcabouço de proteínas de matriz extracelular (MEC), como o colágeno, no parênquima pulmonar. Desse modo, analisamos os níveis de colágeno através do método bioquímico Sircol e verificamos que na condição de estimulação alérgica, os animais apresentaram um aumento da produção de colágeno nos pulmões, comparado ao grupo controle. Constatamos que o tratamento terapêutico com LASSBio-897 foi também incapaz de inibir significativamente o aumento no teor de colágeno no tecido pulmonar dos animais desafiados com ovoalbumina (Figura 4.8).

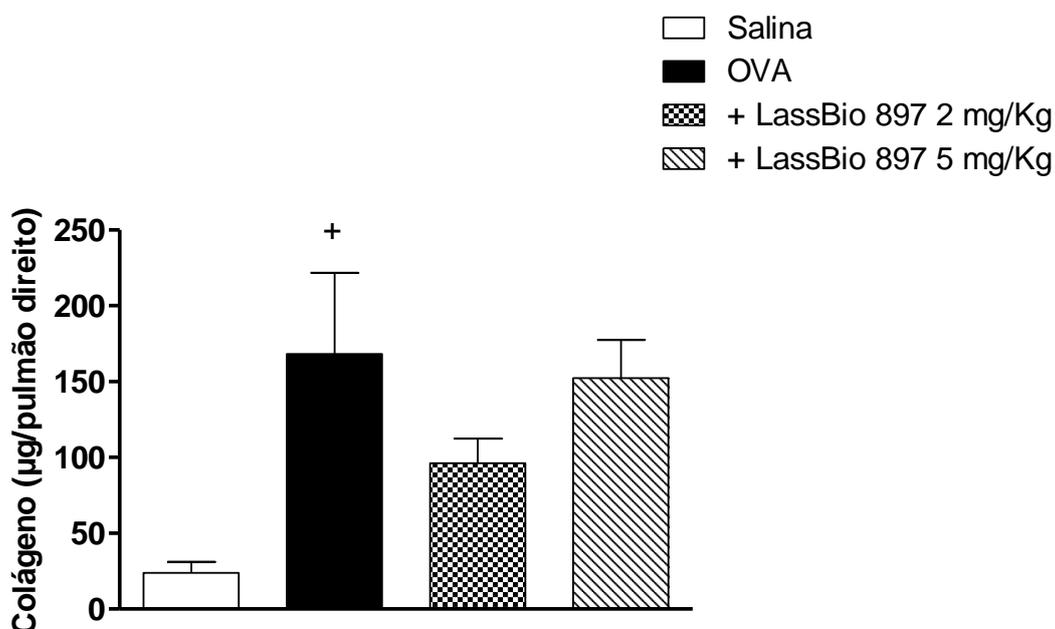


Figura 4.8. Falta de efeito do tratamento terapêutico com o composto LASSBio-897 sobre o acúmulo de colágeno em pulmões de camundongos submetidos a provocação crônica com OVA. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=6). ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo desafiado com salina.

4.4. Efeito do tratamento profilático com LASSBio-897 sobre a resposta pulmonar crônica induzida por ovoalbumina em camundongos

O passo seguinte foi a investigação, ainda com base no modelo de asma crônica, do efeito do composto LASSBio-897 administrado de forma preventiva. LASSBio-897 foi administrado por via oral, profilaticamente, 1 h antes de cada provocação com ovoalbumina. Em consonância ao observado quando o tratamento foi realizado em uma condição inflamatória já estabelecida (terapeuticamente), LASSBio-897 administrado preventivamente novamente foi incapaz de prevenir o aumento de resistência pulmonar associada a hiperreatividade brônquica perante a estimulação com metacolina em camundongos provocados com OVA (Figura 4.9 A). Resultados semelhantes foram obtidos quando analisaram-se as alterações de elastância pulmonar (Figura 4.9 B).

Ademais, o tratamento profilático com LASSBio-897 igualmente falhou em proteger contra o aumento dos níveis teciduais das quimiocinas eotaxina-1 e eotaxina-2 induzido pelas repetidas exposições à ovoalbumina (Figuras 4.10 A e B, respectivamente). As exceções foram as elevações nos teores de MIP-1 α e IL-5, que mostraram-se sensíveis ao LASSBio-897 administrado profilaticamente (Figura 4.10 C e D, respectivamente).

Vale notar que também a resposta fibrogênica induzida por provocação alérgica crônica pode ser inibida quando o tratamento ocorreu de forma preventiva (Figura 4.11).

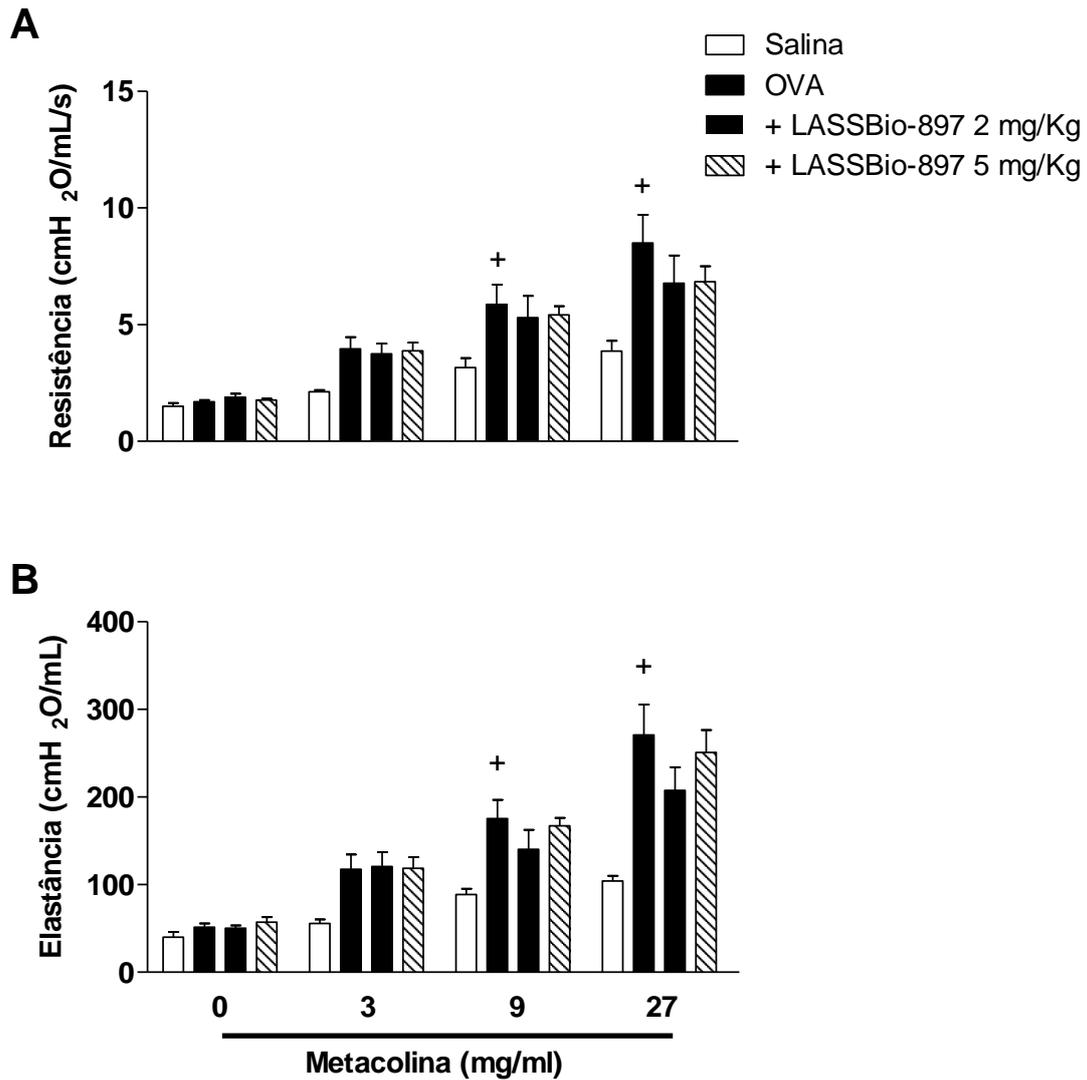


Figura 4.9. Falta de efeito do tratamento profilático com o composto LASSBio-897 sobre a hiper-reatividade de vias aéreas de camundongos submetidos a provocação alérgica crônica. O tratamento com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 h antes de cada desafio antigênico, a partir da 1^o até a 4^o semana de desafios. Os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonares foram analisados perante aerossolização de PBS ou metacolina (3 – 27 mg/mL), 24 h após a última instilação intranasal de OVA. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=6). ⁺P<0.05 comparado ao grupo desafiado com salina.

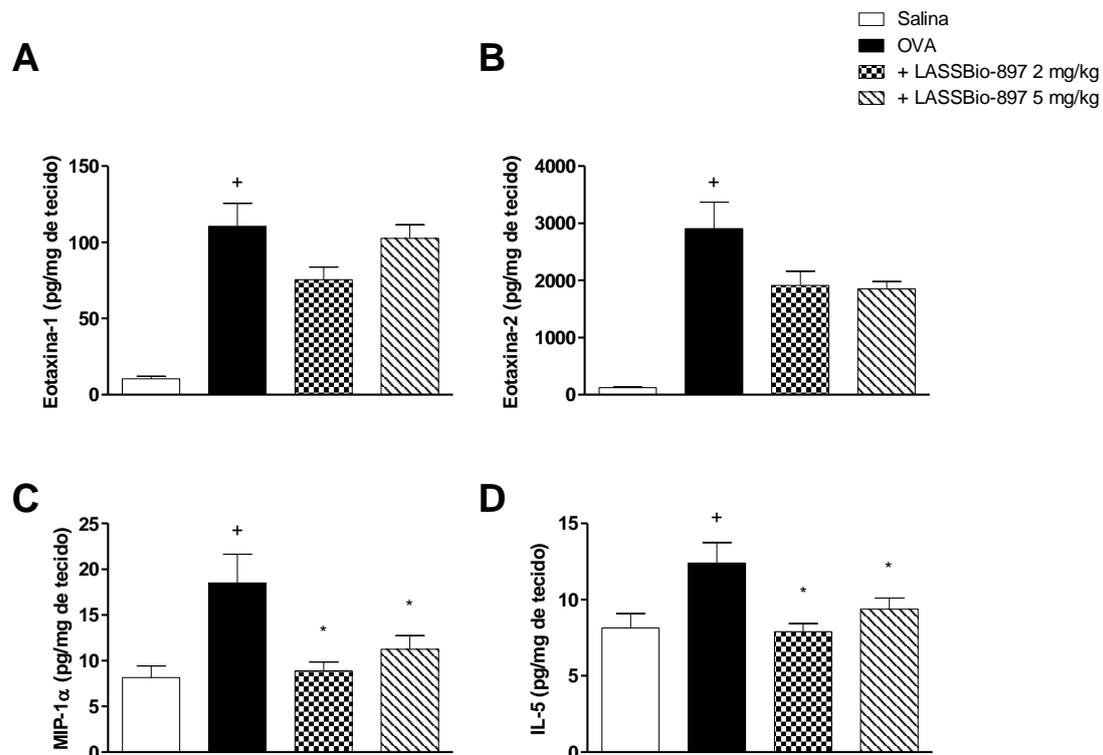


Figura 4.10. Efeito do tratamento profilático com o composto LASSBio-897 sobre a geração de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos submetidos à provocação alérgica crônica. O tratamento com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 h antes de cada desafio antigênico, a partir da 1^o até a 4^o semana de desafios. Foram quantificados eotaxina-1 (A), eotaxina-2 (B), MIP-1α (C) e IL-5 (D) através do método de ELISA. Os resultados representam a média ± Erro Padrão da Média (n= 6). ⁺P<0.05 comparado ao grupo desafiado com salina; ^{*}P<0.05 comparado ao grupo desafiado com OVA.

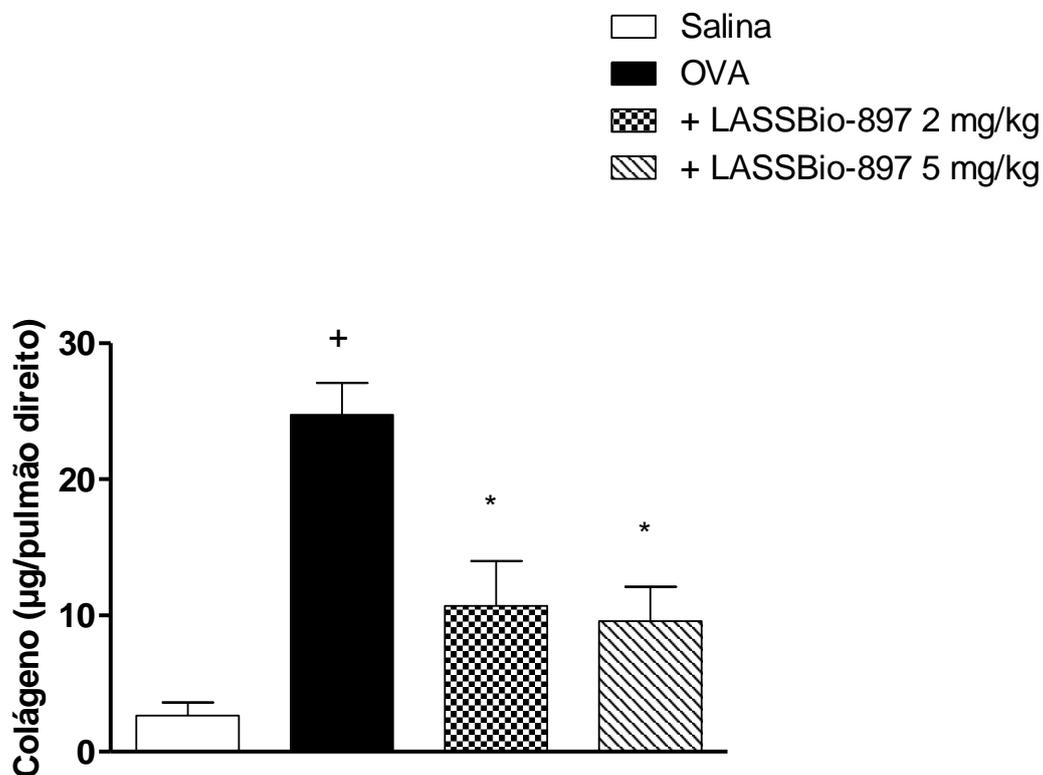


Figura 4.11. Efeito do tratamento profilático com o composto LASSBio-897 sobre o acúmulo de colágeno em pulmões de camundongos submetidos a provocação alérgica crônica. O tratamento com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 h antes de cada desafio antigênico, a partir da 1^o até a 4^o semana de desafios. O conteúdo de colágeno nos pulmões foi quantificado através do método de Sircol. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=6). ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo desafiado com salina; ^{*} $P < 0.05$ comparado ao grupo desafiado com OVA.

4.5. Efeito do tratamento com LASSBio-897 sobre a resposta pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos

A atividade do composto LASSBio-897 foi avaliada sobre a resposta pulmonar induzida por LPS. Os resultados de mecânica ventilatória mostraram que a provocação intranasal com LPS produziu um estado de hiper-reatividade de vias aéreas, revelado pela exposição à metacolina. O pré-tratamento oral com LASSBio-897 (5 mg/kg) 1 h antes do LPS inibiu a hiper-reatividade brônquica relacionada ao aumento de resistência e elastância pulmonar (Figura 4.12 A e B, respectivamente).

Na sequência, avaliamos o infiltrado leucocitário presente no lavado broncoalveolar de camundongos desafiados com LPS. Observamos que a exposição ao LPS resulta no aumento do influxo de leucócitos totais para os pulmões, elevando conseqüentemente número de eosinófilos e, principalmente, neutrófilos no espaço broncoalveolar, comparado aos animais controles. O tratamento oral com LASSBio-897 (5 mg/kg) 1 h antes do LPS reduziu o acúmulo de células inflamatórias totais no espaço broncoalveolar (Figura 4.13 A), fenômeno esse que refletiu em uma diminuição significativa do número de eosinófilos e neutrófilos recuperados no lavado bronchoalveolar (Figura 4.13 C e D, respectivamente).

A avaliação dos níveis de mediadores inflamatórios nos pulmões de animais exposto a LPS, através do método de ELISA, revelou um expressivo aumento dos níveis de MIP-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ . A administração de LASSBio-897 foi capaz prevenir o aumento níveis teciduais MIP-2 (Figura 4.14 A), IL-6 (Figura 4.14 B), TNF- α (Figura 4.14 C) e IFN- γ (Figura 4.14 D) em camundongos desafiados com LPS.

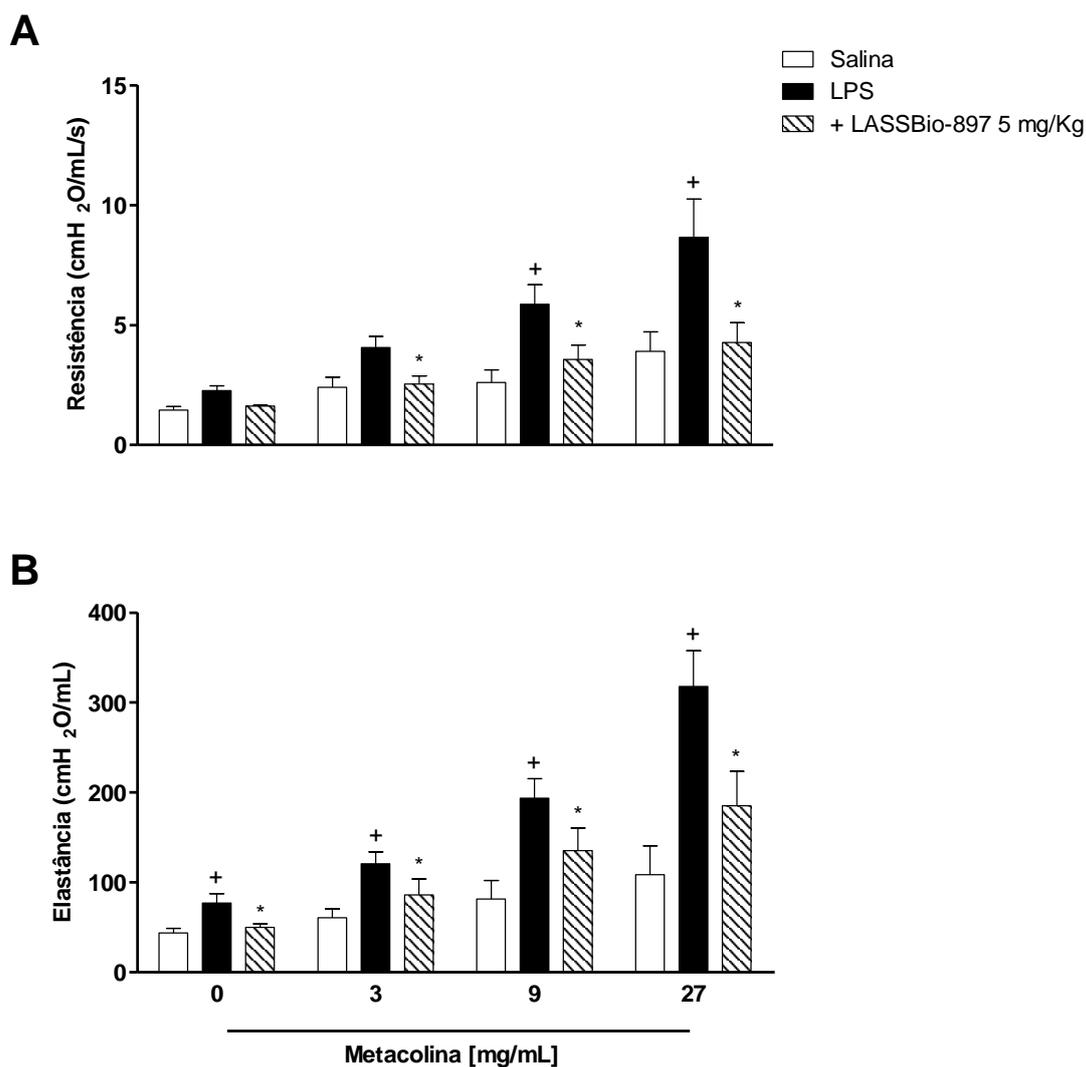


Figura 4.12. Efeito do tratamento com o composto LASSBio-897 sobre a hiper-reatividade e a função pulmonar de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25 µL). O tratamento com LASSBio-897 (5 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 h antes do desafio com LPS. Os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonares foram analisados após aerossolização de PBS ou metacolina (3 – 27 mg/mL), 24 h após o desafio com LPS. Os resultados representam a média ± Erro Padrão da Média (n=6). ⁺P<0.05 comparado ao grupo desafiado com salina; ^{*}P<0.05 comparado ao grupo desafiado com LPS.

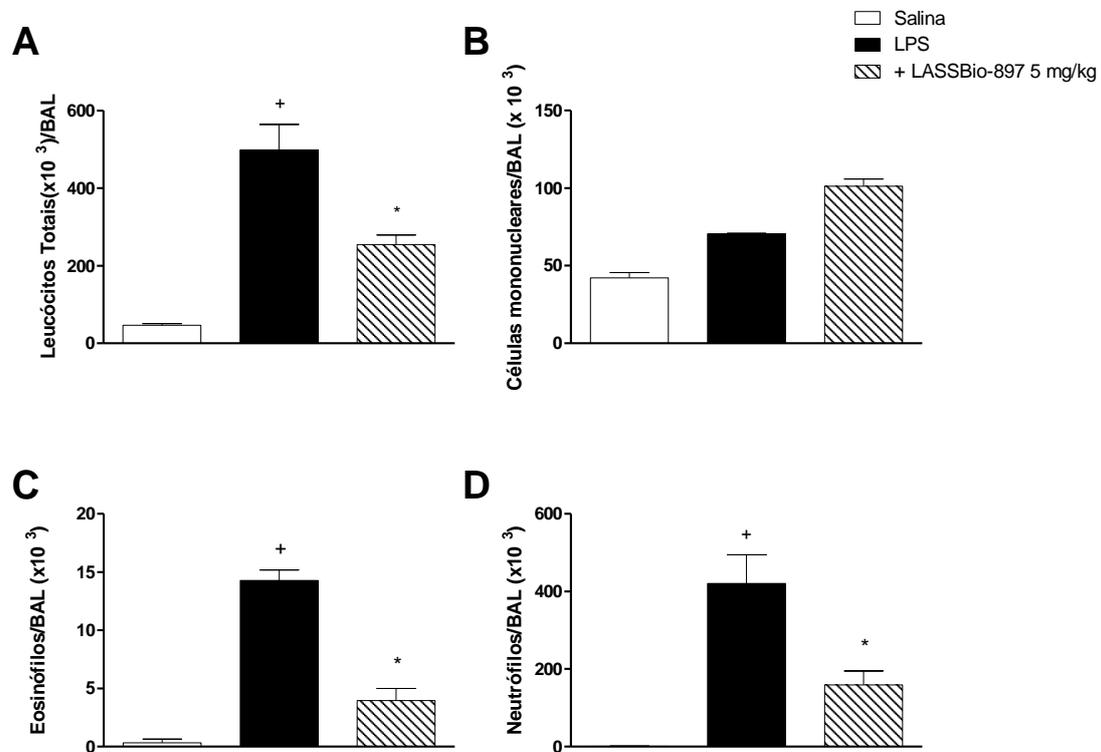


Figura 4.13. Efeito do tratamento com LASSBio-897 sobre o infiltrado de células inflamatórias nos pulmões de camundongos desafiados com LPS (25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$). O tratamento com LASSBio-897 (5 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 h antes do desafio com LPS. Leucócitos totais (A), células mononucleares (B), eosinófilos (C) e neutrófilos (D). Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=4). ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo desafiado com salina; ^{*} $P < 0.05$ comparado ao grupo desafiado com LPS.

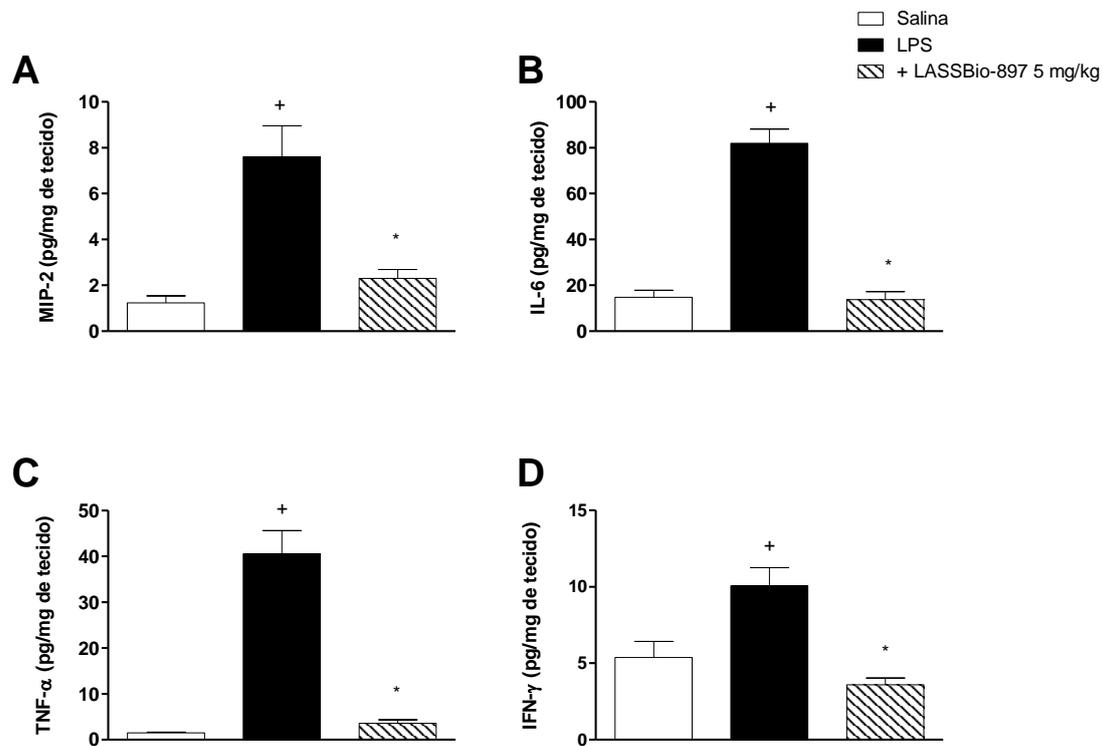


Figura 4.14. Efeito do tratamento profilático com o composto LASSBio-897 sobre a geração de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos desafiados com LPS (25 μ g/25 μ L) . O tratamento com LASSBio-897 (5 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 h antes do desafio com LPS. Foram quantificados MIP-2 (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e IFN- γ (D) através do método de ELISA. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n= 6). $^+P<0.05$ comparado ao grupo desafiado com salina; $*P<0.05$ comparado ao grupo desafiado com LPS.

4.6. Efeito do tratamento terapêutico com LASSBio-897 sobre a resposta de hiper-reatividade brônquica em camundongos silicóticos

Observamos que animais submetidos à instilação de sílica por via intranasal apresentaram, após 28 dias, níveis basais de resistência (Figura 4.15 A) e elastância (Figura 4.15 B) pulmonares elevados, quando comparado aos animais desafiados apenas com salina. Assim como anteriormente mostrado no modelo murino de asma, a aerossolização de concentrações crescentes de metacolina levou a uma exacerbação da resposta de resistência e elastância pulmonares nos camundongos que receberam estimulação intranasal com partículas de sílica (10 mg/50 µL) em comparação ao grupo controle (estimulados com salina) (Figuras 4.15 A e B, respectivamente).

O tratamento oral com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) por 7 dias, iniciado 21 dias após a exposição à partículas de sílica, inibiu significativamente a exacerbação dos valores de resistência (Figura 4.15 A) e elastância pulmonar (Figura 4.15 B) exibida pelos animais silicóticos.

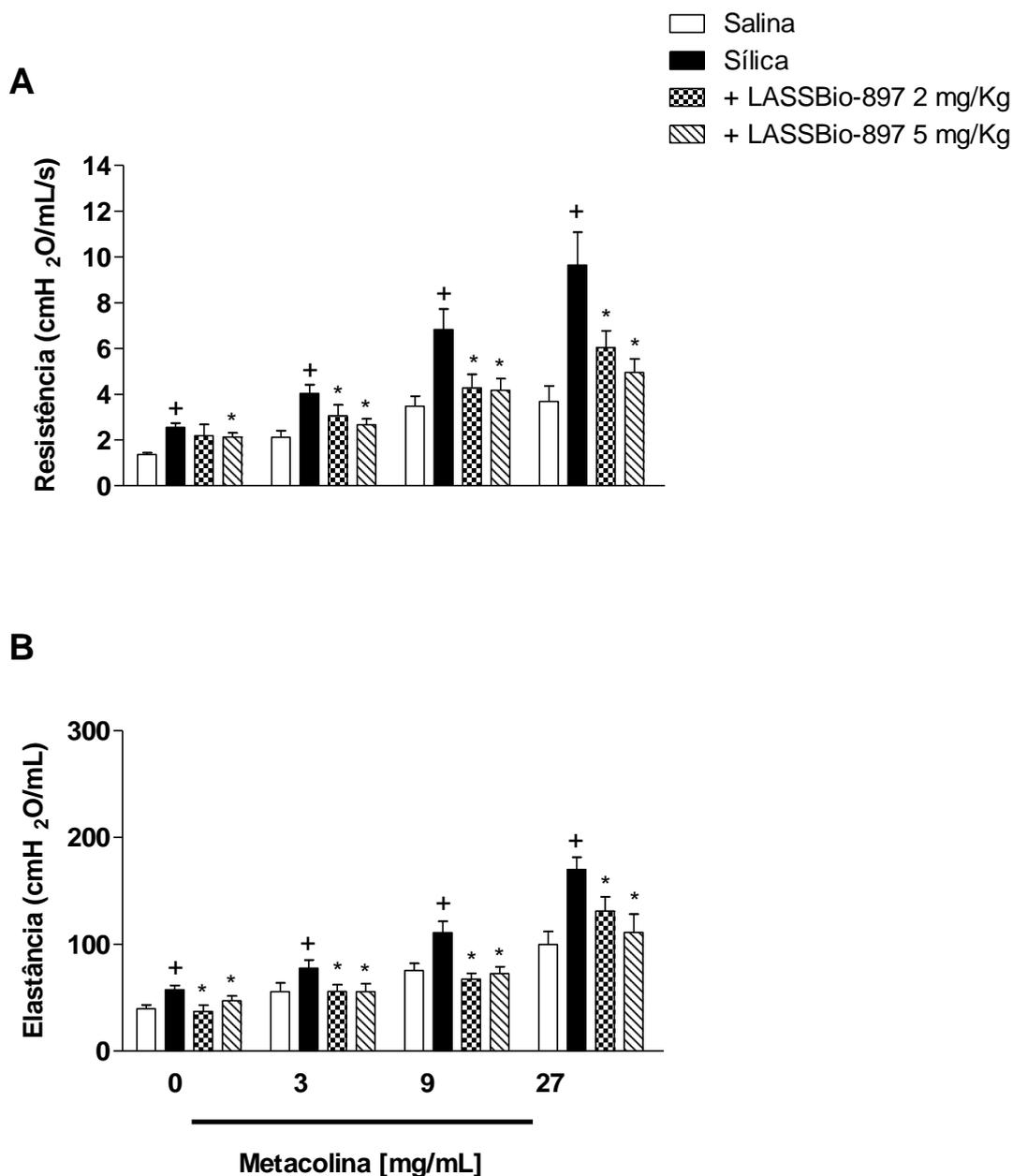


Figura 4.15. Efeito do tratamento terapêutico de LASSBio-897 sobre a hiperreatividade de vias aéreas de camundongos desafiados com sílica. O tratamento oral com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, 21 dias após a instilação de sílica, durante 7 dias consecutivos. Os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonares foram analisados após aerossolização de PBS ou metacolina (3 – 27 mg/mL), 28 dias após a estimulação intranasal com sílica. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=6). ⁺*P* <0.05 comparado ao grupo salina; ^{*}*P* <0.05 comparado ao grupo sílica.

4.7. Efeito de LASSBio-897 sobre a resposta fibro-granulomatosa induzida por partículas de sílica em camundongos

Avaliamos o efeito de LASSBio-897 sobre as modificações estruturais decorrentes da exposição à sílica. As análises histopatológicas de secções de tecido pulmonar coradas com hematoxilina-eosina, mostraram que os pulmões de animais do grupo controle apresentaram uma estrutura de parênquima com aspecto morfológico normal e bem preservada, onde se observou a presença de septos alveolares bem definidos e com espessura normal; e ausência de infiltrado inflamatório nos espaços alveolares (Figura 4.16 A). Na condição de silicose, é notória a alteração difusa do parênquima, com intensa resposta inflamatória e fibrótica marcada pela presença de granulomas densos e, muitas vezes, coalescentes (Figura 4.16 B). O tratamento com LASSBio-897 resultou na redução do processo inflamatório, do número e tamanho dos nódulos silicóticos, os quais apresentaram estrutura mais frouxa e menos densa (Figuras 4.16 C e D). Reforçando essa constatação, dados quantitativos revelam que, nos animais silicóticos, cerca de 40% da área de parênquima pulmonar é ocupada por granulomas. O tratamento com LASSBio-897 reduziu significativamente esse quadro (Figura 4.16 E).

Em seguida, investigamos o depósito de colágeno no tecido pulmonar que é uma característica marcante do processo fibrótico ocorrido na silicose. Através da coloração picro-sirius, notamos que pulmões de animais controle apresentaram uma deposição basal de fibras colágenas (Figura 4.17 A). Enquanto nos animais silicóticos, foram encontradas densas fibras de colágeno nas regiões peribrônquica, perivascular e predominantemente nas áreas de formação de granuloma (Figura 4.17 B). Na condição de tratamento com LASSBio-897, foi detectada apenas uma discreta marcação de fibras colágenas no tecido pulmonar em relação ao observado em animais silicóticos não tratados, que se equipara à deposição basal de colágeno observada no grupo controle (Figura 4.17 C e D). Em paralelo, essas observações foram atestadas através da análise quantitativa de colágeno pelo método de Sircol, confirmando que de fato ocorre uma acentuada redução da geração de colágeno no tecido pulmonar de animais tratados com LASSBio-897, numa proporção que foi significativamente menor que aquela detectada em camundongos silicóticos (Figura 4.17 E).

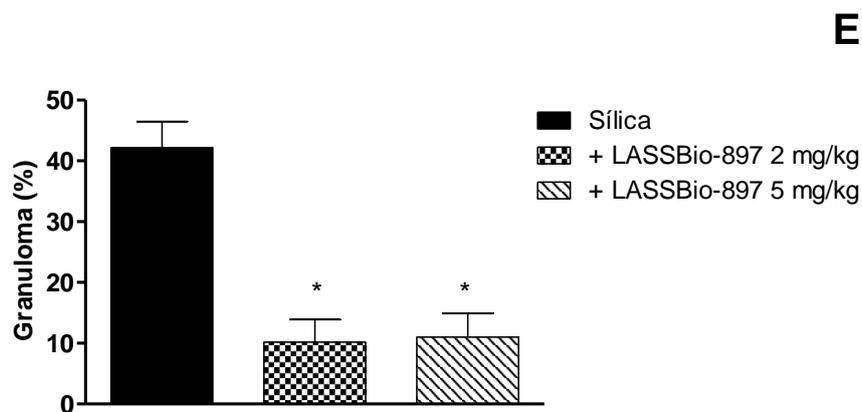
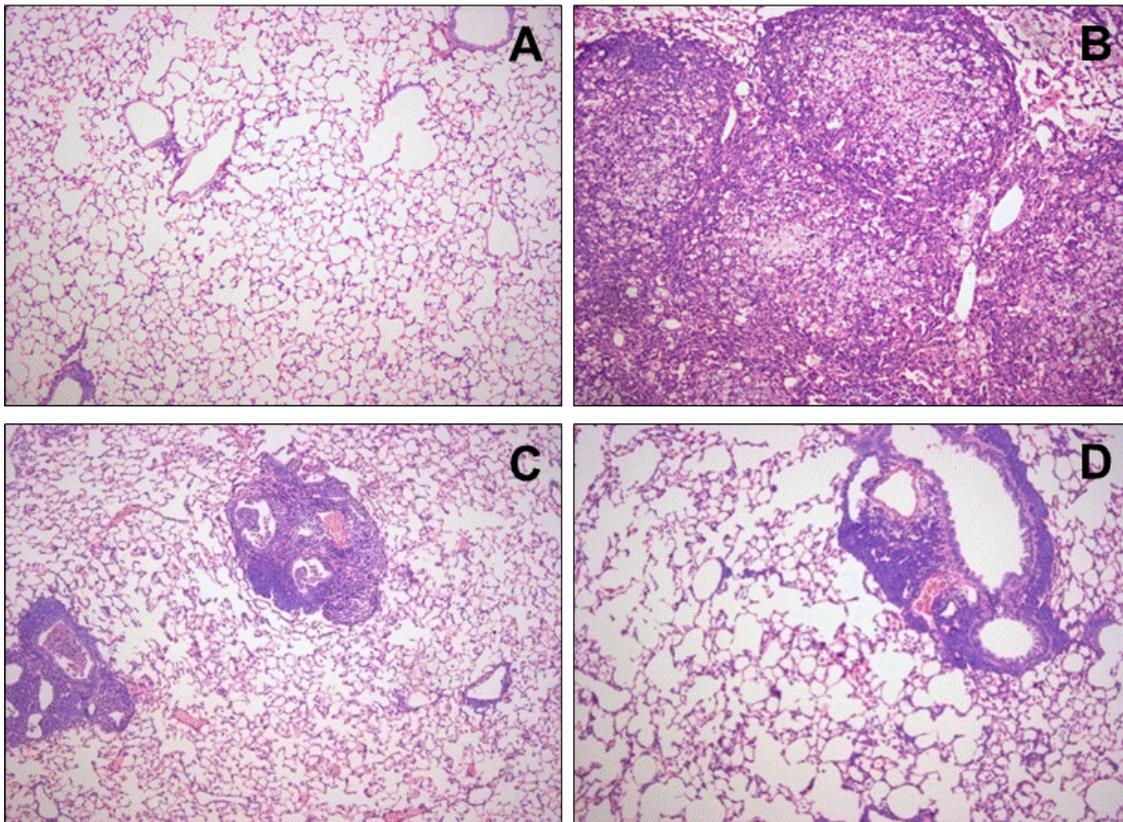


Figura 4.16. Efeito de LASSBio-897 sobre as alterações morfológicas do parênquima pulmonar em camundongos expostos à sílica. Imagens representativas de secções do tecido pulmonar de camundongos desafiados com salina estéril (A), sílica (B), desafiados com sílica e tratados durante 7 dias com LASSBio-897 2 mg/kg (C) e LASSBio-897 5 mg/kg (D). As análises quantitativas da área de pulmão ocupada por granulomas foram realizadas através de morfometria (E). Os cortes histológicos foram processados e corados com hematoxilina e eosina e as imagens foram capturadas e analisadas em microscópio de luz. Aumento 200 X. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=6). * $P < 0.05$ comparado ao grupo sílica.

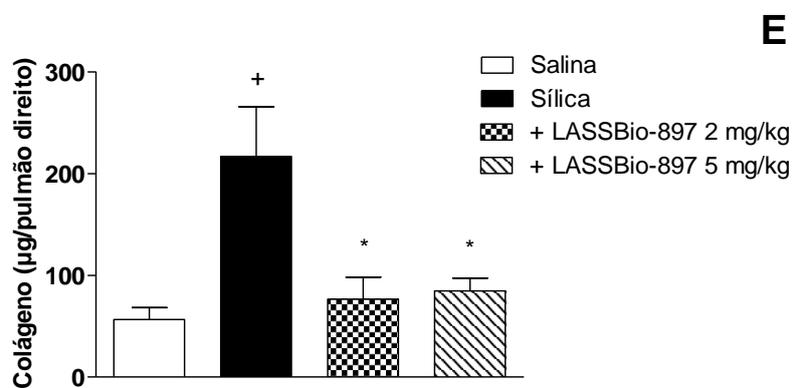
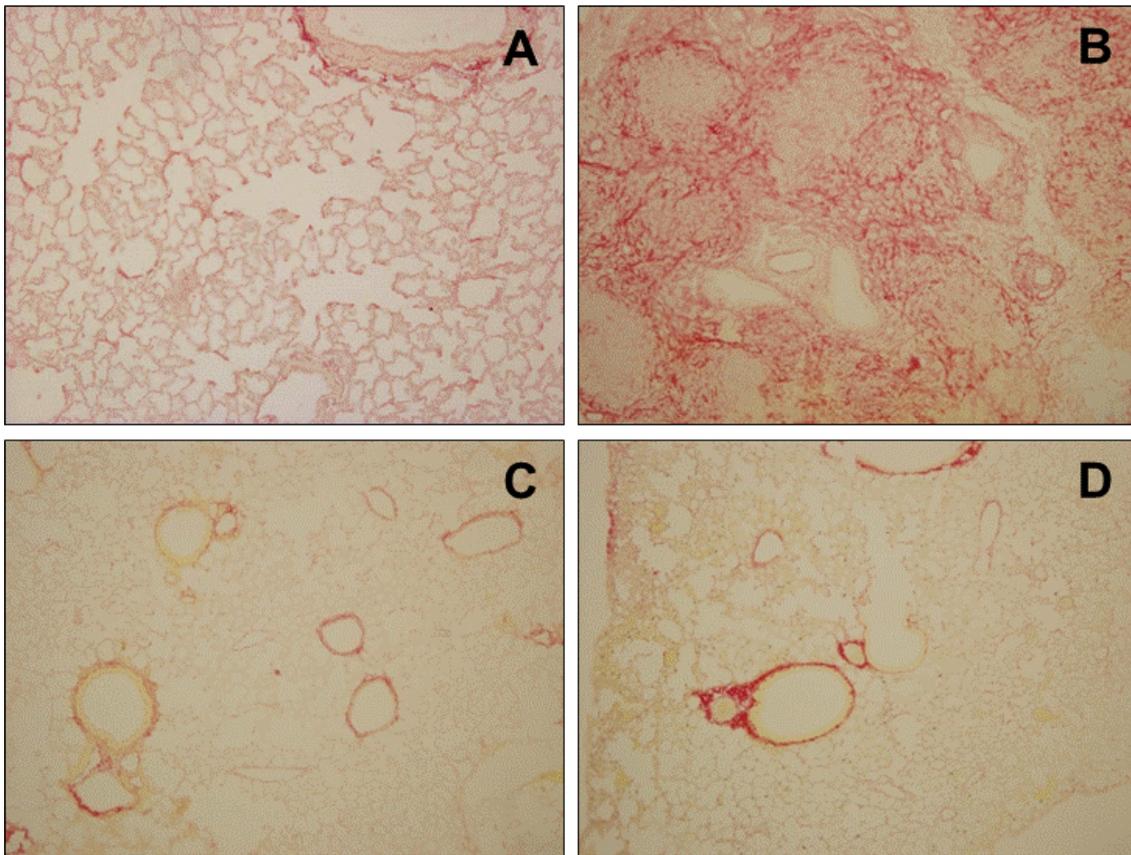


Figura 4.17. Efeito de LASSBio-897 sobre a deposição de colágeno em pulmões de camundongos expostos à sílica. Os cortes histológicos foram processados e corados com picro-sirius e as imagens foram capturadas e analisadas em microscópio de luz. Aumento 200 X. Imagens representativas de secções do tecido pulmonar de camundongos desafiados com salina estéril (A), sílica (B), desafiados com sílica e tratados durante 7 dias com LASSBio-897 2 mg/kg (C) e LASSBio-897 5 mg/kg (D). O conteúdo de colágeno presente no tecido pulmonar foi bioquimicamente quantificado pelo método de Sircol (E). Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=6). ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo salina; ^{*} $P < 0.05$ comparado ao grupo sílica.

4.8. Efeito de LASSBio-897 sobre a permanência de partículas de sílica no tecido pulmonar de animais silicóticos

Ainda que a exposição à sílica tenha cessado, a permanência de partículas residuais, que não foram eficientemente removidas do tecido pulmonar resulta na persistência da inflamação, conduzindo assim a um ciclo de injúria tecidual, e conseqüentemente, à intensa reação fibrótica observada na silicose (Greenberg e cols., 2007).

Considerada a propriedade de birrefringência das partículas de sílica sob luz polarizada, examinamos o efeito de LASSBio-897 sobre o conteúdo de partículas de sílica em cortes de tecido pulmonar corados com picro-sírius. Verificamos que animais do grupo controle apresentaram uma marcação basal de fibras colágenas, coradas em vermelho, ao redor das vias aéreas e vasos sanguíneos (Figura 4.18 A). No grupo de animais silicóticos, observamos um aumento da deposição de colágeno e a presença de muitas partículas de sílica, identificadas pela marcação em azul brilhante, concentradas no interior dos granulomas. Além disso, visualizamos uma grande quantidade de partículas livres, e potencialmente reativas, dispersas ao longo do parênquima pulmonar desses animais (Figura 4.18 B). Ao tratamos os camundongos com LASSBio-897, notamos uma redução da marcação de partículas de sílica no tecido pulmonar e nas regiões de granulomas, assim como diminuição da deposição de colágeno (Figuras 4.18 C e D).

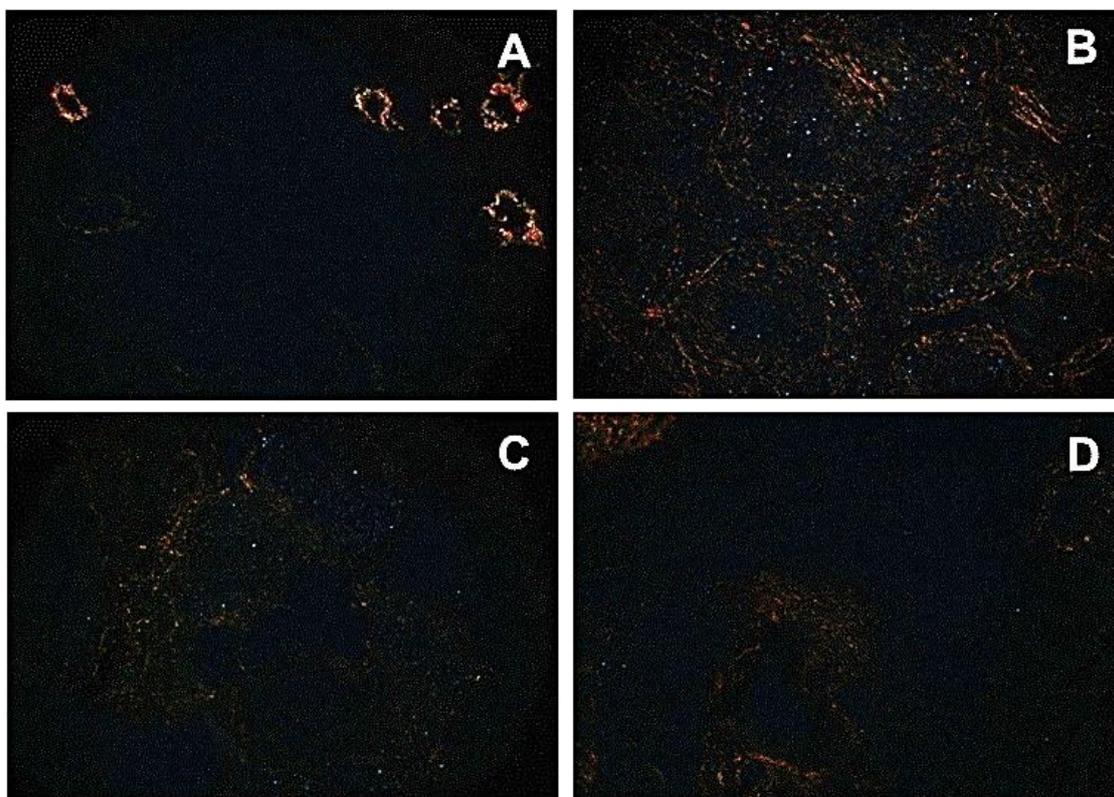


Figura 4.18. Efeito de LASSBio-897 sobre o conteúdo de partículas de sílica presentes nas vias aéreas de camundongos silicóticos. O tratamento oral com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, 21 dias após a instilação de sílica, durante 7 dias consecutivos. Imagens representativas de secções do tecido pulmonar de camundongos desafiados com salina estéril (A), sílica (B), desafiados com sílica e tratados durante 7 dias com LASSBio-897 2 mg/kg (C) e LASSBio-897 5 mg/kg (D). Os cortes histológicos foram processados e corados com picro-sirius e as imagens foram capturadas e analisadas em microscópio acoplado a um polarizador e condensador de luz. Aumento 200 X.

4.9. Efeito de LASSBio-897 sobre a geração de mediadores inflamatórios nos pulmões de camundongos silicóticos

Ao avaliarmos a produção de mediadores inflamatórios em amostras de tecido pulmonar de animais silicóticos, constatou-se um significativo aumento dos níveis das quimiocinas KC e MIP-2 (Figura 4.19 A e B), bem como das citocinas, IL-6 e TNF- α (Figura 4.19 C e D), quando comparado à condição controle. Camundongos tratados durante 7 dias com LASSBio-897 apresentaram uma redução da geração de KC, MIP-2, IL-6 e TNF- α , em uma proporção que foi significativa menor que àquela observada no grupo silicótico (Figura 4.19).

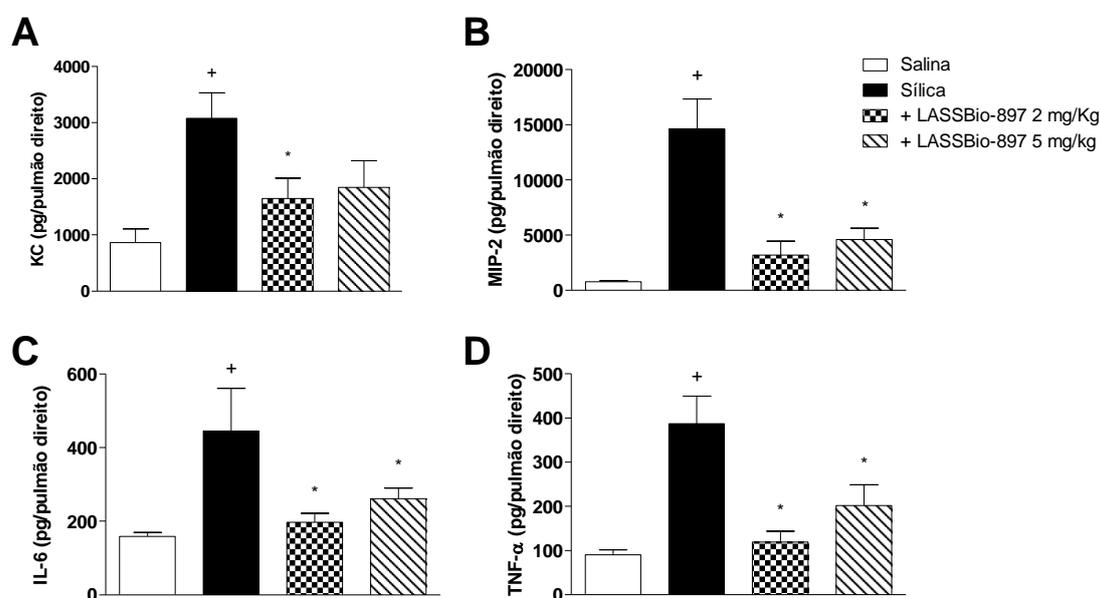


Figura 4.19. Efeito do tratamento com o composto LASSBio-897 sobre a geração de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos desafiados com sílica. O tratamento oral com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, 21 dias após a instilação de sílica, durante 7 dias consecutivos. Foram quantificados KC (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e MIP-2 (D) através do método de ELISA. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n= 6). ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo desafiado com salina; * $P < 0.05$ comparado ao grupo silicótico.

4.10. Efeito do composto LASSBio-897 sobre as principais células alvos presentes no tecido pulmonar envolvidas na silicose

Macrófagos e fibroblastos são células primordiais em processos que culminam na inflamação crônica e na fibrose observadas na silicose, os primeiros exercem um papel fundamental no disparo do processo inflamatório a partir da fagocitose de partículas de sílica (Sato e cols., 2008). Os últimos, devido à intensa reação inflamatória, são ativados e diferenciam-se em miofibroblastos, os quais passam a expressar a proteína α -actina de músculo liso (α -SMA) (Hinz, 2007). Dessa forma, avaliamos a expressão de F4/80 e α -SMA para a identificação de macrófagos ativados e miofibroblastos, respectivamente, no tecido pulmonar de animais silicóticos.

As análises da expressão de F4/80, através de imunohistoquímica, revelam que comparados ao controle, animais tornados silicóticos, mediante instilação de sílica, apresentaram uma acentuada marcação para o antígeno no parênquima pulmonar, especialmente em regiões granulomatosas e em áreas contíguas, em que se observa um marcado infiltrado inflamatório (Figuras 4.20 A e B, respectivamente). Os grupos de animais tratados com LASSBio-897, tanto na concentração de 2 mg/kg quanto na de 5 mg/kg, apresentaram uma redução significativa da expressão de F4/80 em relação aos animais doentes (Figuras 4.20 C e D, respectivamente). Conforme mostrado na figura 4.20 E, a análise quantitativa da expressão de F4/80 confirmou os achados supracitados, os quais indicam que LASSBio-897 foi capaz de diminuir a ativação de macrófagos em animais desafiados com sílica.

Observamos uma intensa marcação para α -SMA nos pulmões de camundongos silicóticos (Figura 4.21 A) quando comparado ao controle (Figura 4.21 B), que permitiu identificar a presença de miofibroblastos predominantemente nas áreas de formação de granulomas. Quando camundongos silicóticos foram tratados com LASSBio-897, verificou-se uma notória redução da marcação de α -SMA no tecido pulmonar (Figuras 4.21 C e D). Os achados qualitativos mencionados acima foram ratificados através da quantificação de pixels das regiões que apresentaram marcação para α -SMA (Figura 4.21 E).

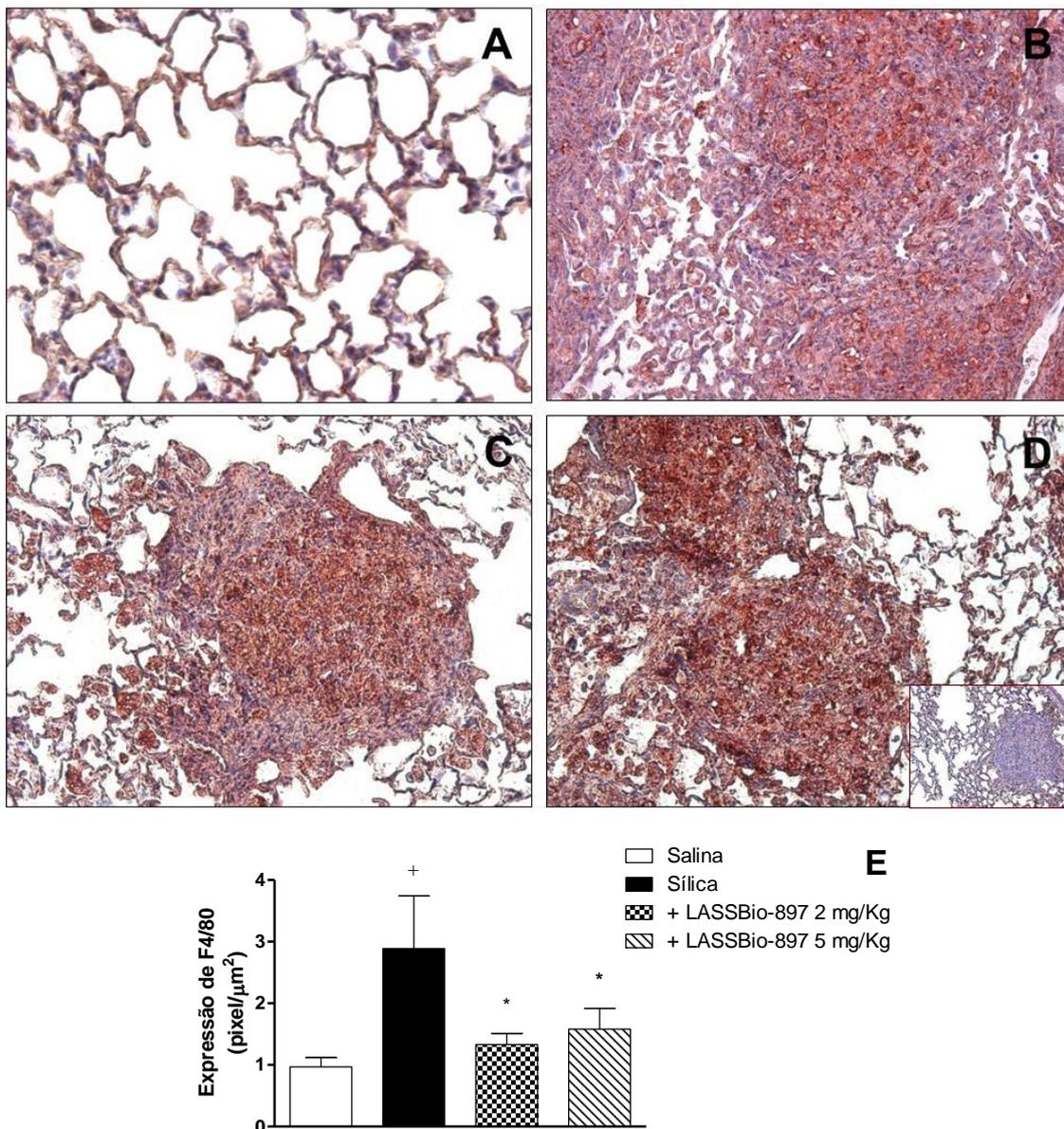


Figura 4.20. Efeito do composto LASSBio-897 sobre a expressão de F4/80 em pulmões de camundongos desafiados com sílica. O tratamento oral com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, 21 dias após a instilação de sílica, durante 7 dias consecutivos. Fotomicrografias representativas de secções do tecido pulmonar de camundongos desafiados com salina estéril (A), sílica (B), desafiados com sílica e tratados durante 7 dias com LASSBio-897 2 mg/kg (C) e LASSBio-897 5 mg/kg (D). As análises quantitativas foram realizadas através do software Image Pro Plus 4.0 (E). As figuras inseridas representam o controle negativo do anticorpo. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n= 6). $^+P < 0.05$ comparado ao grupo salina; $^*P < 0.05$ comparado ao grupo sílica.

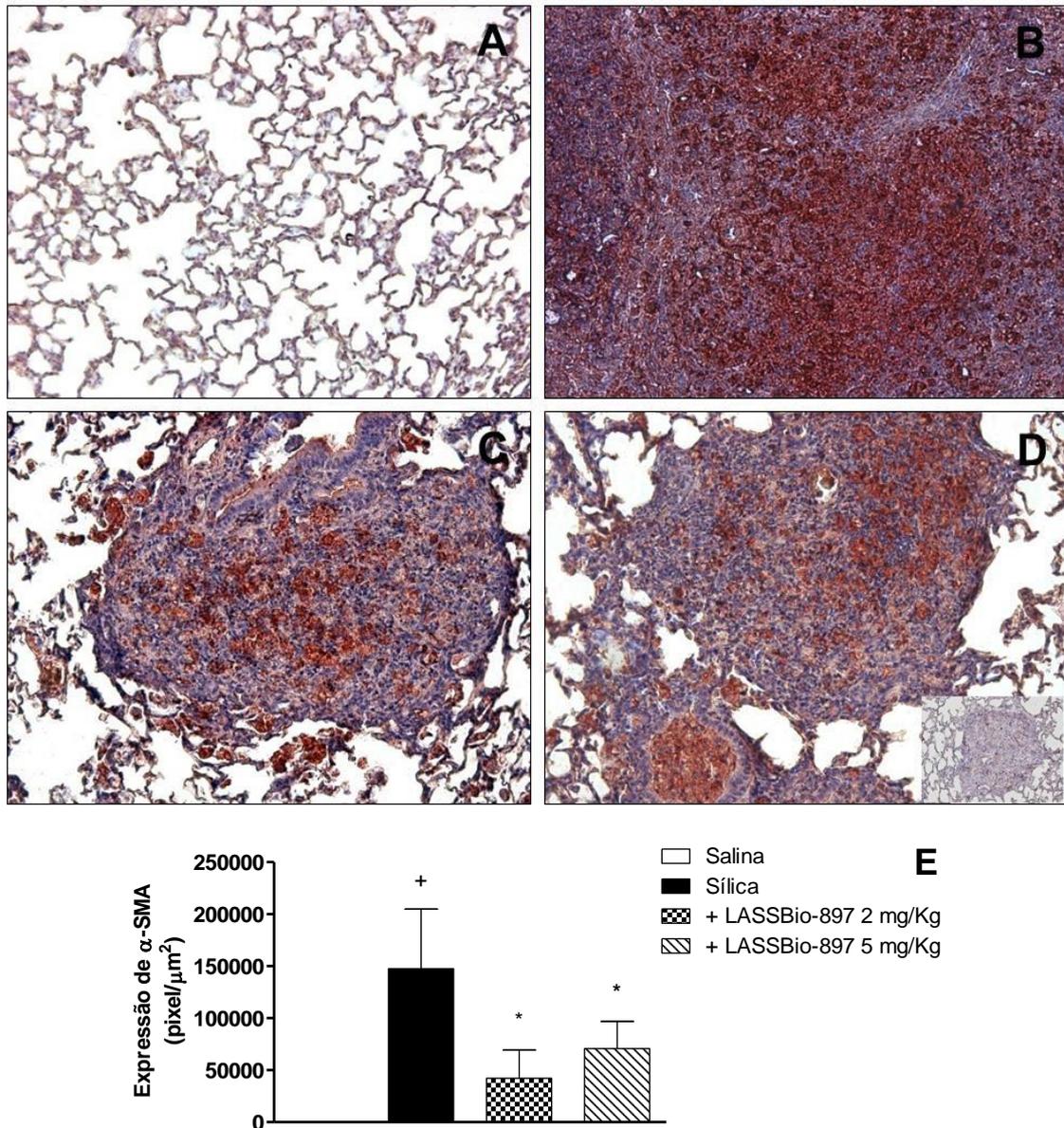


Figura 4.21. Efeito do composto LASSBio-897 sobre a expressão de α -actina de músculo liso em pulmões de camundongos desafiados com sílica. O tratamento oral com LASSBio-897 (2 e 5 mg/kg) foi realizado, 21 dias após a instilação de sílica, durante 7 dias consecutivos. Fotomicrografias representativas de secções do tecido pulmonar de camundongos desafiados com salina estéril (A), sílica (B), desafiados com sílica e tratados durante 7 dias com LASSBio-897 2 mg/kg (C) e LASSBio-897 5 mg/kg (D). As análises quantitativas foram realizadas através do software Image Pro Plus 4.0 (E). As figuras inseridas representam o controle negativo do anticorpo. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n= 6). $^+P < 0.05$ comparado ao grupo salina; $^*P < 0.05$ comparado ao grupo sílica.

4.11. Efeito do composto LASSBio-897 “*in vitro*” sobre as principais células alvos envolvidas na silicose

Visando compreender os potenciais alvos celulares envolvidos nos mecanismos pelos quais LASSBio-897 exerce seus efeitos na silicose, avaliamos o desempenho do referido composto em mastócitos, células epiteliais, macrófagos e fibroblastos “*in vitro*”.

Dados da literatura mostram que animais deficientes em mastócitos não desenvolvem silicose após serem expostos à sílica, reforçando a importância dessas células na patogênese da doença (Brown e cols., 2007, Suzuki e cols., 1993). Utilizando mastócitos derivados de medula óssea de camundongos, verificamos que a estimulação dessas células com partículas de sílica levou a um aumento na liberação da enzima β -hexosaminidase no sobrenadante da cultura em comparação a células cultivadas apenas em meio. LASSBio-897 não foi capaz de impedir a desgranulação de mastócitos estimulados com sílica em nenhuma das concentrações testadas (Figura 4.22).

Assim como os macrófagos, as células epiteliais alveolares estão envolvidas nos processos iniciais da patogênese da silicose e contribuem para a regulação da inflamação através liberação de diversos mediadores inflamatórios. Resolvemos então, investigar o efeito de LASSBio-897 em uma linhagem de pneumócitos tipo II humanos, A549. Observamos uma produção basal baixa de IL-8 após 24 h de cultivo em células não estimuladas. Por outro lado, quando cultivadas na presença de partículas de sílica, detectamos um acentuado aumento da referida citocina liberada no sobrenadante da cultura. O pré-tratamento com LASSBio-897 não foi capaz de interferir com a secreção de IL-8 induzida por sílica em nenhuma das concentrações testadas (Figura 4.23).

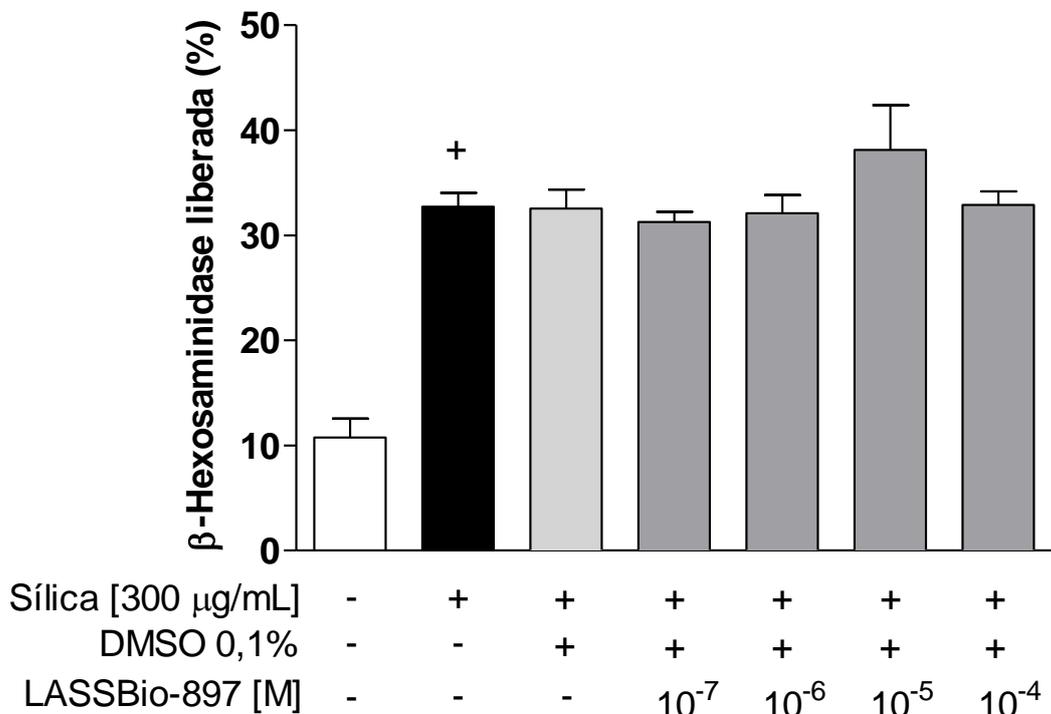


Figura 4.22. Efeito do tratamento com o composto LASSBio-897 sobre a desgranulação de mastócitos induzida por partículas de sílica. Células derivadas da medula óssea foram tratadas com LASSBio-897 durante 1 hora. Em seguida, foram estimuladas com sílica durante 40 minutos. A quantificação de β-hexosaminidase liberada no sobrenadante da cultura foi realizada através de espectrofotometria no comprimento de onda de 405 nm. Os resultados representam a média ± Erro Padrão da Média de três replicatas por grupo. ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo não estimulado.

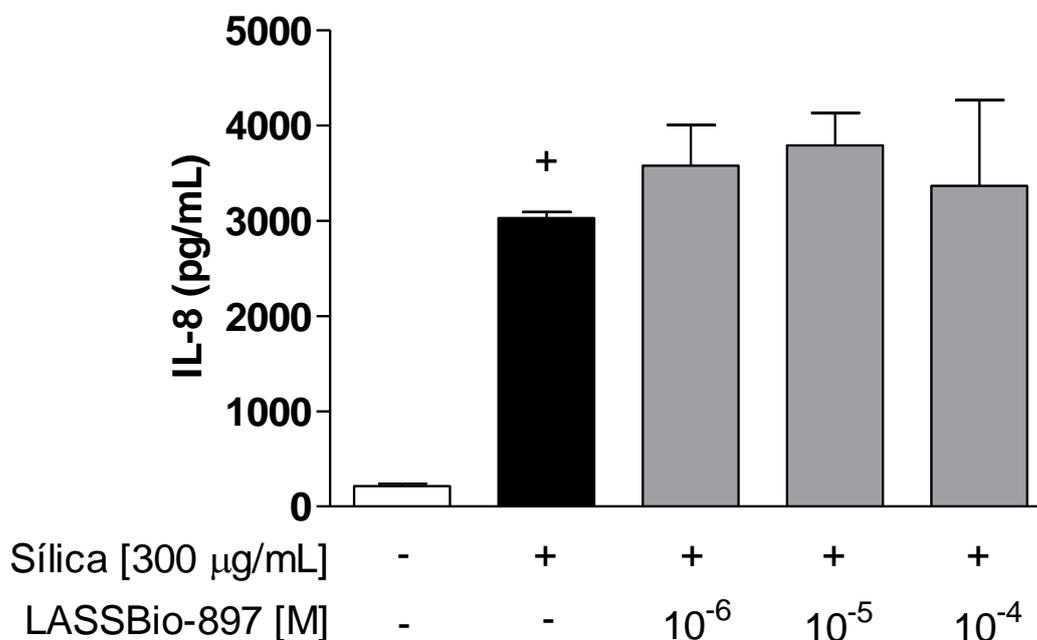


Figura 4.23. Efeito de LASSBio-897 sobre células epiteliais humanas estimuladas com sílica “*in vitro*”. Células da linhagem A549 foram tratadas com diferentes concentrações de LASSBio-897 durante 1 hora e, em seguida, estimuladas com partículas de sílica durante 24 horas. A produção de IL-8 foi quantificada no sobrenadante da cultura através do método de ELISA. Os resultados representam a média ± Erro Padrão da Média de três replicatas por grupo. ⁺*P*<0.05 comparado ao grupo não estimulado.

Analizamos o desempenho de LASSBio-897 sobre a produção da citocina inflamatória TNF- α em uma linhagem de macrófagos alveolares, AMJ2C11. Vimos que a estimulação direta de macrófagos alveolares com sílica culmina no aumento da liberação de TNF- α no sobrenadante da cultura em comparação às células não estimuladas. Quando os macrófagos foram tratados com LASSBio-897, observamos uma redução do TNF- α gerado, perante a estimulação com sílica, apenas em uma concentração muito alta (10^{-3} M) do composto (Figura 4.24).

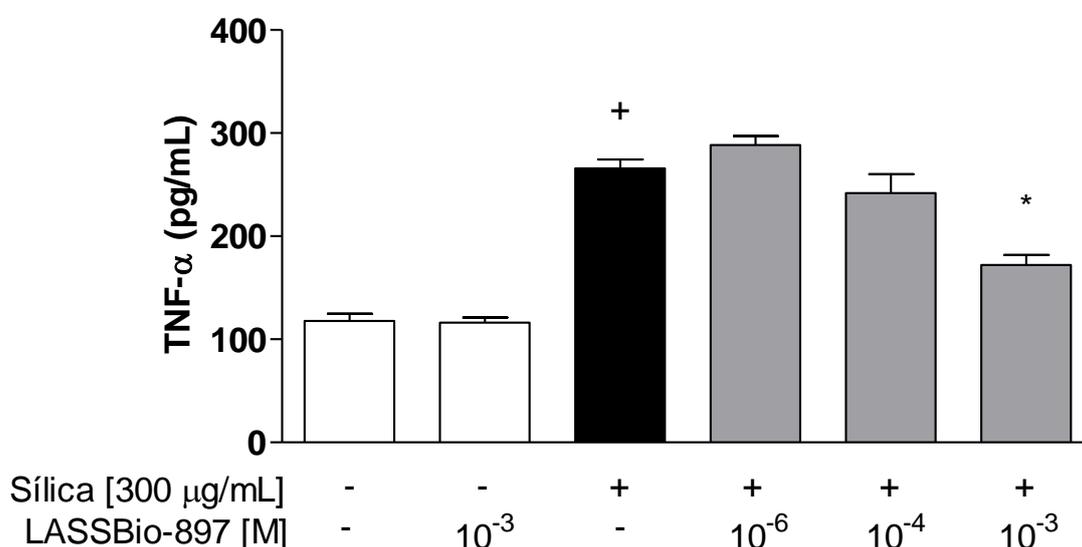


Figura 4.24. Efeito de LASSBio-897 sobre macrófagos alveolares estimulados com sílica “*in vitro*”. Células da linhagem AMJ2C11 foram tratadas com diferentes concentrações de LASSBio-897 durante 1 hora e, em seguida, estimuladas com sílica por um período de 6 horas. A produção de TNF- α foi quantificada no sobrenadante da cultura através do método de ELISA. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média de três replicatas por grupo. ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo não estimulado; ^{*} $P < 0.05$ comparado ao grupo estimulado com sílica.

Avaliamos o efeito de LASSBio-897 sobre a proliferação de fibroblastos pulmonares em um sistema de cultura primária em monocamada, através da incorporação de timidina tritiada. Verificou-se que a exposição à citocina pró-fibrótica IL-13 modificou significativamente o padrão de proliferação tanto de células provenientes de pulmões de camundongos desafiados com salina (Figura 4.25 A), assim como daqueles que foram instilados com sílica (Figura 4.25 B). Células oriundas de um tecido pulmonar hígido, cultivadas na presença de IL-13, não foram sensíveis ao tratamento com LASSBio-897 (Figura 4.25 A). Em contrapartida, fibroblastos originados de uma condição silicótica apresentaram uma redução significativa da proliferação, decorrente da estimulação com IL-13, quando tratadas com LASSBio-897 (10^{-7} e 10^{-5} M) (Figura 4.25 B).

Conforme mostrado na figura 4.26, o cultivo de fibroblastos na presença de IL-13 leva a um significativo aumento do conteúdo de colágeno, quantificado bioquimicamente pelo método de Sircol, no sobrenadante da cultura. O tratamento com LASSBio-897 foi capaz de reduzir o teor de colágeno secretado por células provenientes tanto de uma condição controle (Figura 4.26 A) como de animais silicóticos (Figura 4.26 B), em todas as concentrações testadas.

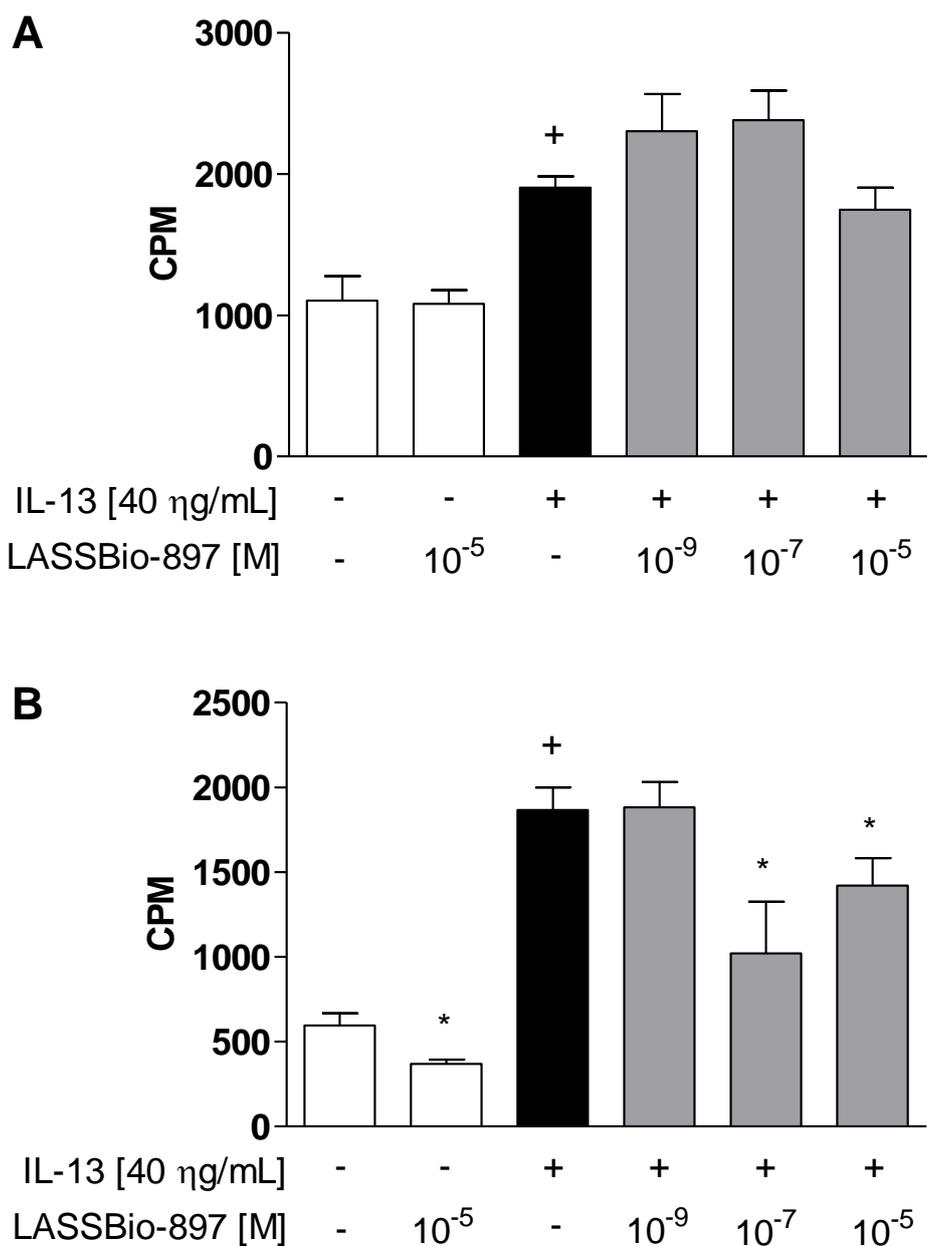


Figura 4.25. Efeito de LASSBio-897 sobre a proliferação de fibroblastos pulmonares estimulados com IL-13 *in vitro*. A proliferação de fibroblastos oriundos do tecido pulmonar de animais saudáveis (A) ou silicóticos (B) foi mensurada através da incorporação de timidina tritiada (0.5 µCi), 20 horas após o plaqueamento das células. Os resultados representam a média ± Erro Padrão da Média de quatro replicatas por grupo. ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo não estimulado; * $P < 0.05$ comparado ao grupo estimulado com sílica.

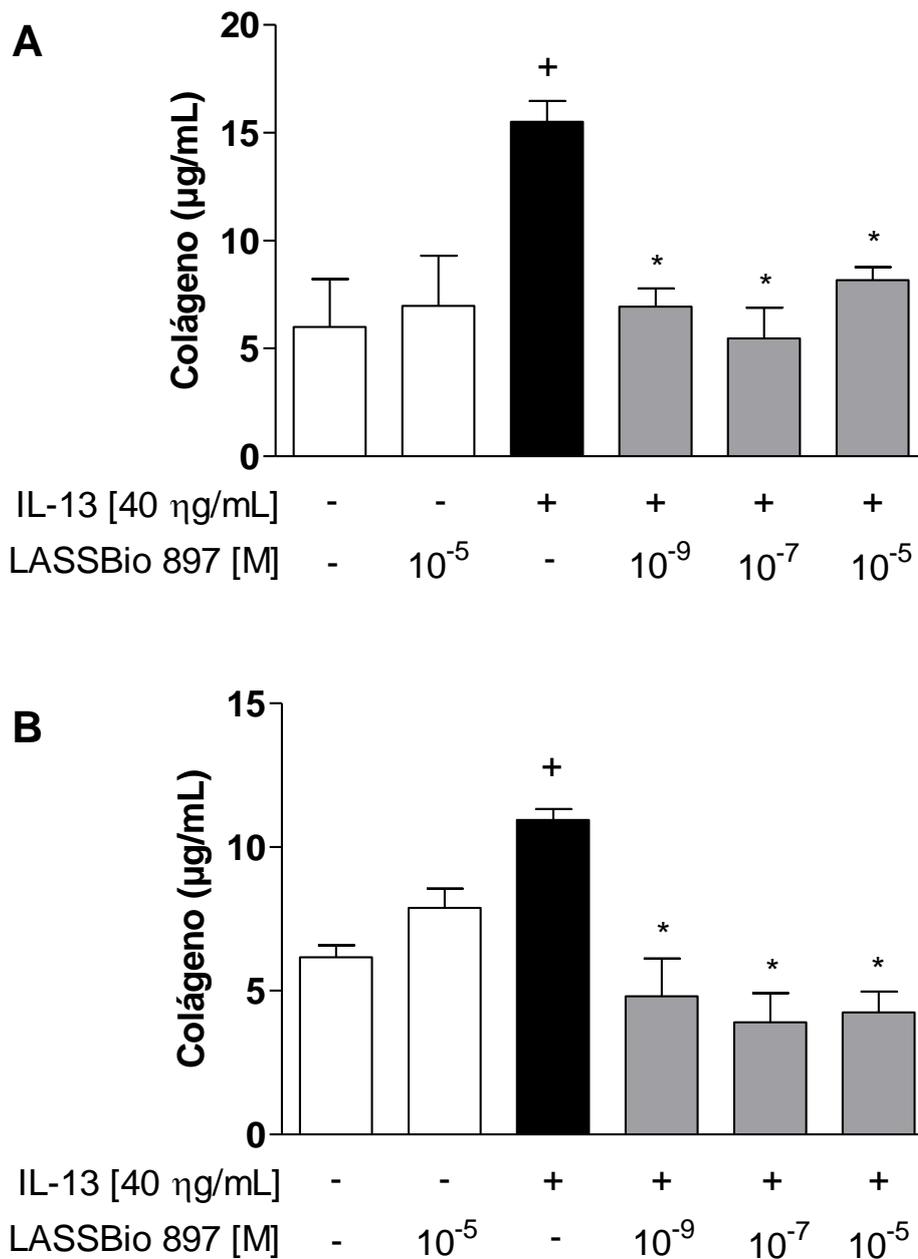


Figura 4.26. Efeito de LASSBio-897 sobre a produção de colágeno por fibroblastos pulmonares estimulados com IL-13 *in vitro*. A produção de colágeno por fibroblastos oriundos do tecido pulmonar de animais saudáveis (A) ou silicóticos (B) foi mensurada, através do método de Sircol, no sobrenadante da cultura. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média de três replicatas por grupo. ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo não estimulado; ^{*} $P < 0.05$ comparado ao grupo estimulado com sílica.

4.12. Efeito de LASSBio-897 sobre a resposta intracelular desencadeada pelo exposição à sílica

Avaliamos, ainda, os níveis teciduais do fator de transcrição nuclear NF- κ B, o qual é ativado durante a inflamação, iniciando a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Verificamos que 28 dias após insulto intranasal com partículas de sílica, ocorre um aumento da expressão tecidual de NF- κ B comparado àquela observada no controle. Ao tratarmos animais silicóticos com LASSBio-897, observamos uma redução significativa da expressão de NF- κ B nos pulmões desses animais (Figura 4.27 A). A análise quantitativa da densidade das bandas confirmou os dados qualitativos citados acima, os quais indicam que LASSBio-897 foi capaz de diminuir a expressão de NF- κ B no tecido pulmonar de animais desafiados com sílica (Figura 4.27 B).

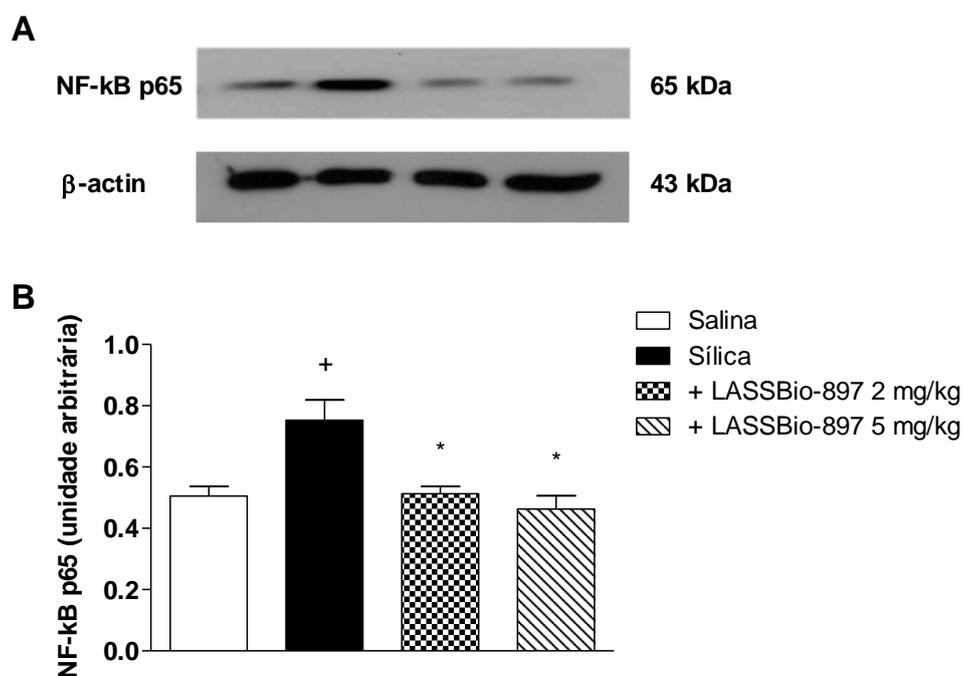


Figura 4.27. Efeito de LASSBio-897 sobre a expressão do fator de transcrição nuclear NF- κ B no tecido pulmonar de camundongos desafiados com sílica. A detecção de NF- κ B foi realizada através da técnica de Western blotting (A). A densidade das bandas foi mensurada através do programa Image J e os resultados expressos em unidades arbitrárias (B). Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média de três replicatas por grupo. ⁺ $P < 0.05$ comparado ao grupo não estimulado; * $P < 0.05$ comparado ao grupo estimulado com sílica.

5. Discussão

As doenças pulmonares crônicas estão entre as doenças mais frequentes e debilitantes que acometem o homem e representam, ainda, um desafio para Medicina em virtude das elevadas taxas de morbidade e mortalidade observadas no mundo. Muitas vezes refletem, também, a carência de tratamento adequado e/ou eficaz.

Nesse contexto, destaca-se a asma, uma doença inflamatória crônica cuja prevalência vem aumentando no mundo. Outra doença que emerge dentro desse contexto é a silicose, doença pulmonar inflamatória crônica e de caráter ocupacional, cuja situação é ainda mais dramática, dada a inexistência de tratamento adequado. Este cenário indica claramente a premência de terapias alternativas para o tratamento seguro e eficaz de doenças pulmonares crônicas. Diante disso, no presente trabalho buscamos caracterizar a eficácia de LASSBio-897, um novo derivado *N*-acilidrazônico, no controle da resposta pulmonar induzida por alérgeno, LPS ou partículas de sílica.

O composto LASSBio-897 foi anteriormente caracterizado como um novo protótipo de medicamento anti-hipertensivo com potente atividade vasodilatadora (Zapata-Sudo e cols., 2010). Estudos do mesmo grupo mostraram importantes efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos após infarto agudo do miocárdio em ratos (dados não publicados – Consórcio Pronex/INCT-INOVAR). Diante das propriedades farmacológicas apresentadas por LASSBio-897, esforços foram concentrados na investigação acerca da potencial aplicação desse agente no controle de doenças inflamatórias pulmonares como a asma e a silicose.

As doenças respiratórias e as disfunções pulmonares são extremamente complexas e variam de acordo com a natureza e intensidade do processo inflamatório e do comprometimento funcional do pulmão (Hakansson e cols., 2012). Modelos animais são ferramentas essenciais para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na patogênese dessas doenças e para determinar a segurança e eficácia de agentes terapêuticos em desenvolvimento (Drazen e cols., 1999, Hall & Agrawal, 2014). Diversas estratégias são empregadas no desenvolvimento de modelos animais que mimetizem características fisiopatológicas das doenças

inflamatórias pulmonares em humanos. As alterações inflamatórias desenvolvidas nesses modelos variam de acordo com o agente etiológico (alérgenos, LPS, sílica), a cepa dos animais, a dose e a rota do desafio (intranasal, intratraqueal) (Hakansson e cols., 2012). No entanto, nenhum modelo animal é capaz de reproduzir fidedignamente todas as características das doenças humanas, devido às diferenças fisiológicas e anatômicas inerentes a cada espécie animal. Portanto, o sucesso dos modelos animais baseia-se em um conjunto de parâmetros pré-determinados que devem ser satisfeitos; e especialmente, modelos pré-clínicos para estudos farmacológicos devem possuir a capacidade de predição do efeito de novas drogas em humanos (Bates e cols., 2009, Lacher e cols., 2010).

A maior parte do conhecimento acerca dos aspectos fisiopatológicos da asma é baseada em estudos em modelos animais, além disso, são fundamentais para investigações pré-clínicas de novas drogas para o tratamento da doença (Bates e cols., 2009). As espécies animais geralmente usadas em modelos de asma (camundongo, rato, cobaia, coelhos), à exceção de gatos e cavalos, não desenvolvem a doença espontaneamente. Os modelos murinos de asma são os mais utilizados em pesquisa, em parte devido a ampla disponibilidade de reagentes, técnicas imunológicas e moleculares e técnicas invasivas e não-invasivas de avaliação da função pulmonar para essa espécie (Hall & Agrawal, 2014, Van der Velden & Snibson, 2011). Assim, para o desenvolvimento de reações imunes correlatas à asma em camundongos são necessários protocolos que envolvam processos de sensibilização sistêmica e desafios com proteínas alergênicas, como a ovoalbumina (Hall & Agrawal, 2014, Holmes e cols., 2011).

Neste trabalho utilizamos dois protocolos baseados na sensibilização sistêmica e desafios com ovoalbumina. Primeiramente, observamos que dois desafios com ovoalbumina, por via intranasal, em dias subsequentes, em camundongos A/J previamente sensibilizados são suficientes para induzir alterações fisiopatológicas relacionadas à asma humana, onde se verificou uma intensa inflamação brônquica associada ao comprometimento da função pulmonar (Serra e cols., 2012). A obstrução intermitente ao fluxo de ar e a hiper-reatividade das vias aéreas são características distintivas da asma humana (Drazen e cols., 1999), as quais são parcialmente reversíveis após a

administração de corticoides inalatórios (Cockcroft & Davis, 2006). Nossos dados mostraram que provocações antigênicas com ovoalbumina causaram ainda alterações na mecânica ventilatória, levando ao aumento dos níveis basais de resistência e elastância pulmonares, evidenciando assim um alto grau de comprometimento dos pulmões de animais “asmáticos”. A aerossolização de metacolina revelou a presença de hiper-reatividade no quadro, ao ser verificada a intensificação da resposta de resistência e elastância pulmonares. A presença de hiper-reatividade frente à estimulação com metacolina converge com relatos da literatura que ressaltam intensas manifestações de constrição das vias aéreas quando pacientes asmáticos são submetidos a provocações com agentes broncoconstrictores como metacolina, carbacol ou adenosina (Cain, 2001). O conhecimento dos mecanismos que controlam a hiper-reatividade das vias aéreas é bastante escasso, no entanto, o fenômeno é amplamente relacionado à inflamação (Jeffery e cols., 1989). Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que a provocação de camundongos sensibilizados com ovoalbumina culmina no aumento do conteúdo de células inflamatórias no espaço broncoalveolar, caracterizado pela presença de grande número de eosinófilos, células mononucleares e neutrófilos. Esse fenômeno foi ainda associado ao aumento nos níveis teciduais de citocinas de perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, e da quimiocina eotaxina-1. Além do aumento da produção da citocina, IFN- γ . Em concordância com nossos dados, estudos prévios mostram que amostras de biópsias das vias aéreas, assim como, do fluido e de células do lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos apresentaram um aumento do RNAm para citocinas de perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13 (Robinson e cols., 1992, Huang e cols., 1995). Interessantemente, há relatos que mostram a ocorrência de aumento da produção de IFN- γ , uma típica citocina de perfil Th1, nas vias aéreas e no soro de pacientes asmáticos, entretanto, a participação desse mediador na patogênese da asma ainda não é muito bem compreendida (Murdoch & Lloyd, 2010, Corrigan & Kay, 1992).

Verificamos que o tratamento com LASSBio-897 foi eficiente na prevenção da inflamação brônquica e da produção de mediadores inflamatórios induzida pela provocação com ovoalbumina. Adicionalmente, o composto foi eficaz em prevenir o aumento da resistência e elastância pulmonares, assim

como, a hiper-reatividade das vias aéreas. Diante disso, pode-se inferir que, em um quadro inflamação pulmonar aguda, o bloqueio da produção de citocinas e quimiocinas verificado na condição de tratamento com LASSBio-897 está associado à melhora da função pulmonar e à redução do influxo de células inflamatórias recuperadas no espaço broncoalveolar.

Com vistas à identificação do potencial alvo celular através do qual LASSBio-897 medeia os efeitos observados frente à provocação aguda com ovoalbumina, a atividade do composto foi avaliada em células T provenientes de linfonodos de camundongos DO11.1. O papel de linfócitos T no controle da inflamação alérgica é inequívoco. Relatos da literatura mostram que essas células encontram-se aumentadas em número na mucosa das vias aéreas de pacientes com asma fatal (Azzawi e cols., 1992), e que após a provocação com alérgeno ocorre um aumento no quantitativo de células T ativadas e citocinas Th2 em biópsias brônquicas de asmáticos (Robinson e cols., 1993). Sabe-se que o tratamento com glicocorticoides é capaz de reduzir o número de linfócitos T, eosinófilos, mastócitos e células dendríticas nas vias aéreas de asmáticos, através da supressão da produção de mediadores quimiotáticos e moléculas de adesão, assim como, por mecanismos de inibição da sobrevivência dessas células (Barnes & Adcock, 2003). Vimos que o tratamento com dexametasona foi eficaz em reduzir a proliferação e aumentar a apoptose de linfócitos T induzida por ovoalbumina. Em contrapartida, o tratamento com LASSBio-897 não interferiu na proliferação e sobrevivência de linfócitos T estimulados com ovoalbumina. No entanto, estudos adicionais acerca do efeito de LASSBio-897 sobre células T precisam ser realizados, pois o composto pode atuar em eventos iniciais como na apresentação de antígenos e sobre a liberação de citocinas.

Mastócitos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de respostas alérgicas (Amin, 2012). Diante da importância dessas células na patogênese da asma, verificamos o efeito de LASSBio-897 sobre a desgranulação anafilática de células da linhagem RBL-2H3. Vimos que a taxa de liberação de β -hexosaminidase induzida pelo desafio com DNP-BSA em células sensibilizadas com IgE anti-DNP-BSA não foi modificada pelo tratamento com LASSBio-897.

A natureza crônica da inflamação na asma apresenta implicações diretas nas alterações estruturais do parênquima pulmonar, e influencia o diagnóstico, a prevenção e o tratamento da doença (Lemanske & Busse, 2003, Al-Muhsen e cols., 2011). A maioria dos modelos crônicos de asma envolve o aumento do número de exposições antigênicas e podem durar semanas e até meses (Lloyd & Robinson, 2007, Hall & Agrawal, 2014, Lloyd, 2007).

Dando continuidade ao nosso estudo, investigamos o efeito de LASSBio-897 em camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina durante quatro semanas consecutivas. Optamos por avaliar inicialmente o efeito terapêutico de LASSBio-897, onde o composto foi administrado, por via oral, apenas nas duas últimas semanas de provocação antigênica. Verificamos que LASSBio-897 não reverteu o comprometimento da mecânica ventilatória causada pela exposição crônica à ovoalbumina, não sendo capaz de modificar as alterações de resistência e elastância pulmonares nesse quadro. Ao avaliarmos a produção de mediadores inflamatórios, vimos que os níveis teciduais das citocinas IL-5, IL-6, IL-13 e IFN- γ encontram-se aumentados no tecido pulmonar de camundongos desafiados com OVA. Além disso, foi ainda observado o aumento do teor tecidual das quimiocinas eotaxina 1, eotaxina 2, as quais são potentes quimioatraentes de eosinófilos (Pease & Williams, 2001), e de MIP-1 α , importante quimiocina implicada no recrutamento de monócitos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos (Maurer & von Stebut, 2004). Verificamos, no entanto, que o tratamento curativo realizado com LASSBio-897, não foi eficaz em inibir o aumento das citocinas e quimiocinas avaliadas, com exceção de IFN- γ . O remodelamento das vias aéreas é um importante componente da asma crônica, o qual inclui a intensa deposição de componentes da matriz extracelular no parênquima pulmonar, como o colágeno (Tattersfield e cols., 2002, Manuyakorn e cols., 2013). O aumento do conteúdo de colágeno no tecido pulmonar de camundongos desafiados com ovoalbumina foi observado através de análise bioquímica (técnica de Sircol), no entanto, essa resposta não foi revertida pelo tratamento terapêutico com LASSBio-897.

Dando prosseguimento à análise do efeito de LASSBio-897 com base no modelo de asma crônica, avaliamos a potencialidade do tratamento profilático com o composto. Dessa forma, LASSBio-897 foi administrado 1 hora antes de cada desafio antigênico. De maneira similar ao observado no tratamento

terapêutico, LASSBio-897 administrado profilaticamente não preveniu o aumento de resistência e elastância das vias aéreas produzido pela exposição à ovoalbumina. A administração preventiva do composto também não foi eficaz em impedir o aumento dos níveis de eotaxina 1 e eotaxina 2 induzida por ovoalbumina. De forma interessante, foi observada uma clara atenuação da produção de IL-5 e MIP-1 α após a exposição crônica a ovoalbumina, quando os animais foram tratados com LASSBio-897 preventivamente. Além disso, o tratamento com o composto resultou na redução da deposição de colágeno no tecido pulmonar de animais asmáticos. Esse efeito parece refletir o bloqueio da geração de IL-5 e MIP-1 α , uma vez que esses mediadores têm sido descritos por participar de processos de fibrogênese no pulmão. Essa suposição encontra suporte na literatura que mostra a função primordial da citocina IL-5 em processos de diferenciação e migração, e no aumento da sobrevivência de eosinófilos, os quais secretam fatores de crescimento pró-fibróticos como TGF- β . Essas células, podem ainda liberar o conteúdo de seus grânulos nas vias aéreas promovendo dano tecidual e, assim, iniciando ciclos de injúria e reparo tecidual (Doherty & Broide, 2007). Ademais, animais deficientes em IL-5 desafiados com OVA apresentam um menor grau de fibrose peribrônquica, devido à redução do conteúdo de colágeno total e colágeno III e V, que comparado a animais selvagens alergicamente desafiados (Cho e cols., 2004). Por sua vez, dados da literatura reforçam o envolvimento de MIP-1 α na gênese da inflamação e fibrose pulmonar. Um estudo recente mostra que a deleção genética ou o bloqueio farmacológico de MIP-1 α e seu receptor, CCR1, previnem a inflamação e a fibrose induzidas por radiação (Yang e cols., 2011).

Dados anteriores de nosso grupo mostraram que as alterações de mecânica ventilatória, a inflamação das vias aéreas e componentes do remodelamento do parênquima pulmonar no modelo de asma crônica utilizado neste trabalho são sensíveis à ação de anti-inflamatórios esteroidais, como a dexametasona, administrados terapêuticamente por via oral (dados não publicados). Assim, podemos considerar que a baixa eficácia do tratamento terapêutico e profilático com LASSBio-897 no modelo de asma crônica possui valor preditivo de que o composto não seria tão eficaz quanto corticoides para o tratamento da asma humana.

Seguindo com nossas análises, investigamos a ação de LASSBio-897 no modelo de injúria pulmonar aguda induzida por LPS. A endotoxina bacteriana, lipopolissacarídeo (LPS), é um complexo glicolípido, comumente encontrado na parede celular de bactérias Gram-negativas (Bryant e cols., 2010, Wallin e cols., 2004). O LPS é amplamente disseminado no meio ambiente e é, muitas vezes, encontrado em concentrações elevadas em poeiras orgânicas e em poluentes do ar. A exposição a poluentes ambientais, incluindo LPS, pode desencadear inflamação pulmonar e desempenhar importante função na gênese e perpetuação de doenças respiratórias crônicas, a exemplo da asma (Kline e cols., 1999, Togbe e cols., 2007). A exposição a baixas doses de LPS produz inflamação devido à ativação de macrófagos e neutrófilos, enquanto que doses mais altas resultam em lesão tecidual (Rojas e cols., 2005). Assim, o LPS é um estímulo bem estabelecido e frequentemente utilizado com a finalidade de reproduzir aspectos da inflamação pulmonar não-alérgica em modelos de doenças como DPOC e síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), entre outros (Hakansson e cols., 2012, Rojas e cols., 2005, Kabir e cols., 2002).

Achados da literatura mostram que a inalação de uma dose única de LPS por indivíduos saudáveis reduz o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e o volume total exalado (ou capacidade vital, CVF ou FVC) em testes de função pulmonar (Thorn & Rylander, 1998, Rylander e cols., 1989). Resultados semelhantes foram reproduzidos em camundongos, onde além da redução de FEV1 e FVC, foi notado um aumento da elastância pulmonar (Hakansson e cols., 2012). Em ensaio destinado à avaliação da mecânica ventilatória, vimos que a exposição a uma dose única de LPS por via intranasal culmina no aumento de resistência e elastância pulmonares. A exposição ao LPS também resulta em aumento da resposta à metacolina, demonstrando a presença de um quadro de hiper-reatividade. Estes achados estão em concordância com estudos prévios de Tigani e colaboradores que demonstraram que a adenosina promove o aumento da broncoconstrição em ratos Brown Norway desafiados com LPS (Tigani e cols., 2002). Verificamos que o tratamento com LASSBio-897 foi capaz de prevenir o declínio da função pulmonar e o aparecimento da hiper-reatividade induzida por LPS.

O LPS é um potente indutor de reações orquestradas por células da imunidade inata, e a exposição aguda a essa endotoxina inicia uma série de eventos do processo inflamatório como o recrutamento de células, aumento da secreção de mediadores químicos e aumento de permeabilidade vascular, culminando em um quadro de edema pulmonar (Hakansson e cols., 2012, Bryant e cols., 2010). Nossos resultados mostraram que camundongos instilados com LPS apresentam um aumento do infiltrado de células inflamatórias no lavado broncoalveolar, o qual é caracterizado pelo predomínio de neutrófilos. O aumento no quantitativo de células totais induzido por LPS foi prevenido pelo tratamento com LASSBio-897, assim como, o aumento do número de neutrófilos e eosinófilos no lavado broncoalveolar. A inflamação neutrofílica induzida por LPS foi anteriormente mostrada em humanos e foi sensível ao tratamento com salmeterol, um agonista β_2 -adrenérgico (Wallin e cols., 2004). O aumento do número de neutrófilos no BAL, induzido por LPS, foi também evidente em camundongos e pode ser revertido pelo tratamento com glicocorticoides (Hakansson e cols., 2012). A ativação de células do sistema imune por LPS contribui para a progressão da reação inflamatória através da liberação de citocinas, quimiocinas, enzimas, eicosanoides e radicais livres (Rojas e cols., 2005, Albaiceta e cols., 2010, Rittirsch e cols., 2008). O aumento tecidual das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina MIP-2 foi detectado nos pulmões de animais desafiados com LPS, sendo essa resposta abolida pelo tratamento com LASSBio-897.

Os resultados obtidos no modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS demonstram a potencialidade do LASSBio-897 em condições inflamatórias não-alérgicas, e nos permitiram aventar a possível atividade do composto em controlar processos inflamatórios pulmonares desencadeadas por estímulos distintos aos que atuam no desenvolvimento de doenças de caráter alérgico como a asma.

Seguindo com a próxima abordagem proposta no presente trabalho, buscamos delinear a atividade de LASSBio-897 em um modelo experimental de silicose murino. A silicose tem sido reproduzida em diferentes modelos animais com base em camundongos, os quais podem desenvolver alterações morfológicas semelhantes às observadas em humanos (Borges e cols., 2001, Perez-Ramos e cols., 1999). Achados prévios de nosso grupo mostraram que

28 dias após insulto intranasal único com partículas de sílica, camundongos Swiss Webster desenvolveram características coincidentes à silicose humana como inflamação granulomatosa crônica e fibrose pulmonar que resultam na redução da capacidade pulmonar (Ferreira e cols., 2013).

Pacientes silicóticos, em estágios avançados da doença, apresentam um declínio na função pulmonar decorrente da restrição à expansibilidade dos pulmões e redução de difusão de monóxido de carbono devido às intensas modificações estruturais das vias aéreas e do parênquima pulmonar. Em alguns casos, testes espirométricos revelam um padrão de deficiência pulmonar misto, obstrutivo e restritivo (Terra Filho & Santos, 2006, Jindal, 2013). Nossos dados foram consistentes com observações anteriores que revelaram o aumento de resistência e elastância pulmonares, 28 dias após o contato inicial com sílica (Ferreira e cols., 2013). Observamos ainda um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas em animais silicóticos através da estimulação com concentrações crescentes de metacolina. A hiper-reatividade é uma característica distintiva da asma, no entanto, sua ocorrência não se restringe apenas a indivíduos asmáticos. A obstrução aguda ao fluxo de ar desencadeada por estímulos inespecíficos também pode ser observada em outras doenças pulmonares crônicas como a fibrose cística e DPOC (Lemanske & Busse, 2003, Blease e cols., 2000, Eggleston e cols., 1988). Em nosso estudo, verificamos que administração durante 7 dias consecutivos do composto LASSBio-897, 21 dias após a estimulação com sílica, foi capaz de reverter as alterações de resistência e elastância pulmonares e a broncoconstrição induzida por metacolina em camundongos silicóticos.

Camundongos, assim como humanos, quando expostos a partículas de sílica cristalina desenvolvem lesões inflamatórias granulomatosa e intensa reação fibrótica no parênquima pulmonar (Perez-Ramos e cols., 1999, Larche e cols., 2003). Em nossos ensaios, vimos que camundongos desafiados com sílica apresentaram intenso processo inflamatório e ocupação de grande área do parênquima pulmonar por nódulos silicóticos. Além disso, análises histológica e bioquímica mostraram que ocorre um acúmulo excessivo de colágeno no tecido pulmonar de animais expostos à sílica. Camundongos silicóticos tratados terapeuticamente com LASSBio-897 apresentaram uma redução do infiltrado inflamatório, acompanhado pela redução em número e

tamanho dos granulomas, além de marcada diminuição da deposição de colágeno no parênquima pulmonar.

A permanência de partículas de sílica no tecido pulmonar perpetua o ciclo de injúria e reparo tecidual ao promover a estimulação continuada de células inflamatórias e estruturais no pulmão, ainda que a exposição à sílica tenha sido abolida (Thakur e cols., 2009). Análises qualitativas de secções do tecido pulmonar, corados com picro-sírius, sob luz polarizada revelaram a presença de partículas de sílica birrefringentes nas vias aéreas de camundongos silicóticos, principalmente em áreas de formação nodular. O tratamento com LASSBio-897, durante 7 dias consecutivos, foi eficaz em reduzir a quantidade de partículas residuais no tecido pulmonar 28 dias após a instilação intranasal de sílica. Os mecanismos de remoção de partículas depositadas no tecido pulmonar incluem o sistema muco-ciliar ascendente, a fagocitose por macrófagos alveolares e a drenagem através do sistema linfático (Thakur e cols., 2009, Fernandez Tena & Casan Clara, 2012, Lippmann e cols., 1980). Substâncias que acentuam o “*clearance*” de partículas no pulmão são fundamentais para o tratamento efetivo da silicose (Fu e cols., 2013). O desempenho do LASSBio-897 nesse quadro reforça sua ação no controle da toxicidade causada pela deposição de sílica no pulmão. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual LASSBio-897 acentua a remoção de partículas do tecido pulmonar.

Inúmeros mediadores inflamatórios estão envolvidos na progressão da silicose. A fagocitose de partículas de sílica que alcançaram os alvéolos pulmonares, por macrófagos residentes, culmina na secreção de citocinas e quimiocinas que regulam o recrutamento de células inflamatórias e o desenvolvimento da reação fibrótica (Vanhee e cols., 1995). Nossas análises revelaram níveis teciduais aumentados das citocinas IL-6 e TNF- α e das quimiocinas KC e MIP-2 em animais tornados silicóticos. Esse padrão de secreção de mediadores inflamatórios foi alterado pela administração terapêutica de LASSBio-897 a camundongos silicóticos, sendo observado assim a redução da produção tecidual de IL-6, TNF- α , KC e MIP-2.

Células da imunidade inata, assim como, células estruturais podem ser diretamente ativadas por partículas de sílica que atingem os alvéolos pulmonares, e são importantes fontes de mediadores inflamatórios que

orquestram a inflamação e o processo fibrótico (Huaux, 2007). Assim, avaliamos o efeito de LASSBio-897 sobre mastócitos, células epiteliais, macrófagos e fibroblastos.

Dados anteriores do nosso grupo mostraram que 28 dias após a exposição à sílica, ocorre um aumento do número de mastócitos ao redor dos brônquios, em áreas de formação nodular, e especialmente, em regiões de fibrose (Farias Filho, 2008). Essas evidências estão em consonância com achados da literatura que enfatizam a participação de mastócitos na patogênese da silicose e mostram o aumento dessas células no pulmão de pacientes silicóticos (Brown e cols., 2007, Suzuki e cols., 1993, Hamada e cols., 2000). Verificamos que as partículas de sílica ativaram de forma direta mastócitos derivados de medula *“in vitro”*, resultando no aumento de desgranulação, através da quantificação de β -hexosaminidase no sobrenadante da cultura, no entanto, essa resposta não foi sensível ao pré-tratamento com LASSBio-897. Avaliações complementares a fim de melhor delinear o efeito de LASSBio-897 sobre o controle do número de mastócitos no parênquima pulmonar após desafio com sílica podem ser realizadas, por exemplo, através da análise de cortes histológicos corados com azul de alcian e safranina.

A citotoxicidade direta de partículas de sílica sobre células epiteliais e macrófagos induz a produção de citocinas e quimiocinas que amplificam a inflamação e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio que promovem dano tecidual. Nesse ambiente inflamatório e oxidativo, células epiteliais e macrófagos passam a secretar fatores de crescimento e mediadores fibrogênicos que ativam mecanismos de fibrose (Castranova, 2004). Ademais, hiperplasia e hipertrofia de células epiteliais do tipo II em consequência da injúria causada ao epitélio após insultos com sílica representam a expressão precoce de fibrogênese (Mossman & Churg, 1998). Nossos resultados mostraram que a estimulação de células epiteliais da linhagem A549 com partículas de sílica resulta no aumento da produção de IL-8, entretanto, o tratamento com LASSBio-897 não modificou a secreção dessa citocina no sobrenadante da cultura.

De acordo com os dados citados acima, mastócitos e células epiteliais parecem não ser alvos diretos da ação de LASSBio-897, a qual culmina na

melhora da função pulmonar e na redução da inflamação granulomatosa e fibrose no parênquima pulmonar.

A formação de nódulos silicóticos no parênquima pulmonar é uma característica patológica distintiva da silicose. As lesões iniciais constituem-se por um conjunto de macrófagos com partículas de sílica concentradas no espaço intracelular. Enquanto granulomas maduros apresentam macrófagos gigantes, e eventualmente, a presença de células multinucleadas é notada (Davis, 1986). A imunomarcagem do antígeno F4/80 em cortes histológicos de pulmão evidenciou o aumento do número de macrófagos no parênquima pulmonar de animais silicóticos, sendo essa marcação mais expressiva nas regiões de formação de granuloma. O tratamento com LASSBio-897 resultou em uma potente redução da marcação de macrófagos ativados no tecido pulmonar. Macrófagos alveolares não são apenas um dos principais constituintes de granulomas, mas também atuam diretamente no desenvolvimento da reação inflamatória através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (Rimal e cols., 2005). Nossas análises revelaram que a estimulação direta de macrófagos alveolares resulta, conforme esperado, no aumento da produção de TNF- α . O tratamento prévio dessas células com LASSBio-897 reduziu a secreção de TNF- α no sobrenadante da cultura apenas na maior concentração testada (10^{-3} M). LASSBio-897 poderia estar atuando ainda em outros processos que resultam da ativação de macrófagos pela sílica, como a ativação de vias de estresse oxidativo, que contribui para os danos teciduais observados na silicose (Sato e cols., 2008). Portanto, investigações adicionais são requeridas para melhor compreensão do efeito de LASSBio-897 sobre a regulação de macrófagos alveolares na silicose.

Os componentes celulares das lesões granulomatosas do parênquima pulmonar na silicose não se restringem apenas a macrófagos. Muitos linfócitos, e ocasionalmente, neutrófilos podem ser observados. Dentre os constituintes dos nódulos silicóticos, destacam-se também os fibroblastos, os quais são diretamente relacionados à fibrogênese no contexto da silicose (Davis, 1986). A ativação de fibroblastos resulta na expressão de α -SMA, e por sua vez, marca o processo de transdiferenciação dessas células a miofibroblastos (Hao e cols., 2013). Vimos que a exposição à sílica resulta no aumento da marcação de α -SMA no tecido pulmonar, com predomínio de expressão nas regiões de

formação de granulomas. Ao tratarmos os animais que foram expostos à sílica com LASSBio-897, verificamos uma marcada redução da expressão de α -SMA no tecido pulmonar. Classicamente, considera-se que o aumento dessas células no pulmão, em condições de fibrose, resulte da ativação e proliferação de populações de fibroblastos residentes. Atualmente, acredita-se que processos de transição epitelial-mesenquimal (EMT) e a migração de células-tronco mesenquimais, denominados fibrócitos, também estejam entre os mecanismos envolvidos na modificação do padrão populacional de células fibroblásticas observado em doenças pulmonares fibróticas (McAnulty, 2007, Hao e cols., 2013).

Em ensaios “*in vitro*”, vimos que o tratamento com LASSBio-897 reduziu a taxa de proliferação de fibroblastos provenientes de pulmão de camundongos silicóticos estimulados com IL-13, no entanto, o mesmo efeito não foi observado quando avaliou-se a atividade do composto em células oriundas de animais saudáveis. Diante disso, pode-se inferir que a redução da proliferação de fibroblastos pelo tratamento com LASSBio-897 tenha uma repercussão direta sobre a diminuição dessas células no tecido pulmonar de animais silicóticos tratados com o composto.

A alteração fenotípica de fibroblastos ativados é acompanhada pela ativação da maquinaria biossintética e essas células passam a produzir citocinas e proteínas de matriz extracelular, como o colágeno, que implicam no desenvolvimento de fibrose e no remodelamento tecidual em doenças fibróticas (Hinz, 2007, Hu e cols., 2014). Verificamos que a estimulação com IL-13 induz aumento da produção de colágeno tanto em células provenientes de uma condição de silicose como de animais controle. Demonstramos que o tratamento com LASSBio-897 promoveu uma expressiva redução da produção de colágeno induzida por IL-13 em ambas condições. Em conjunto, esses dados demonstram que LASSBio-897 é capaz de regular a atividade de fibroblastos pulmonares, reforçando sua ação antifibrótica observada no modelo murino de silicose.

Estudos anteriores mostram que a estimulação com partículas de sílica pode culminar na ativação de NF- κ B em macrófagos (Chen e cols., 1995, Chen e cols., 1995, Rojanasakul e cols., 1999). O NF- κ B é um fator de transcrição nuclear que, quando ativado, promove a expressão gênica de diversas

moléculas pró-inflamatórias como citocinas e quimiocinas, enzimas e moléculas de adesão, as quais estão diretamente envolvidas no recrutamento de leucócitos e progressão da inflamação (Castranova, 2004, Christman e cols., 2000). O tratamento com LASSBio-897 modificou o padrão de expressão tecidual de NF- κ B em animais silicóticos. Esse efeito pode estar diretamente relacionado à inibição da produção de citocinas e quimiocinas produzida pela administração terapêutica de LASSBio-897 em animais silicóticos. No entanto, nossa abordagem sobre a relevância da ativação de NF- κ B no efeito produzido por LASSBio-897 precisa ser melhor investigada. Assim, faz-se necessário avaliar se o composto modula a fosforilação e translocação desse fator do citoplasma para o núcleo celular.

As evidências de que LASSBio-897 apresentou afinidade de ligação apenas ao receptor de adenosina A_{2A} entre 100 possíveis alvos farmacológicos avaliados em um mapeamento realizado pela empresa CEREP, motivou investigações adicionais por parte de nosso grupo. Dessa forma, foi demonstrado que LASSBio-897 parece modular receptores de adenosina do subtipo A_{2A} por meio de mecanismos indiretos, e não através de atividade agonista/antagonista clássica. Assim, LASSBio-897 atuaria potenciando a ação da adenosina através da modulação positiva de sítios alostéricos de receptores A_{2A} (Carvalho, V. F.; dados não publicados). A literatura atual enfatiza que moduladores alostéricos podem apresentar vantagens terapêuticas sobre agonistas ortostéricos, que incluem maior especificidade pelo subtipo do receptor de adenosina e redução de efeitos adversos. Acredita-se que moduladores alostéricos não exerçam atividade por si só, mas que sua ligação ao sítio alostérico altere a conformação do receptor, favorecendo a interação do ligante ortostérico (Chen e cols., 2013, Goblyos & Ijzerman, 2009, Goblyos & Ijzerman, 2011). Pressupõe-se que a ativação do receptor em dois sítios distintos resulte em maior especificidade tecidual, uma vez que agonistas alostéricos necessitam da atividade conjunta do agonista endógeno. Dessa forma, moduladores positivos do sítio alostérico de receptores de adenosina atuariam em conjunto com os níveis aumentados de adenosina em sítios inflamatórios e exerceriam efeitos mais brandos em tecidos saudáveis onde a adenosina é mantida em níveis basais (Chen e cols., 2013).

A possível capacidade de modulação alostérica de receptores de adenosina A_{2A} por LASSBio-897 pode nos ajudar a entender alguns de seus efeitos nos modelos murinos de inflamação pulmonar estudados.

Foi anteriormente demonstrado que a remoção genética de receptores A_{2A} em camundongos leva a um significativo aumento de hiper-reatividade das vias aéreas em resposta a metacolina. Interessantemente, a exacerbação dessa resposta foi percebida quando camundongos $A_{2A}^{-/-}$ foram antigenicamente desafiados (Nadeem e cols., 2007). Em consonância com tal evidência, vimos que LASSBio-897 foi eficaz em melhorar a função pulmonar e prevenir o aparecimento de hiper-reatividade em camundongos após insultos alergênicos, com LPS ou partículas de sílica. Além disso, LASSBio-897 parece desempenhar um efeito inibitório sobre a hiper-reatividade das vias aéreas, após dois desafios repetidos com ovoalbumina, mais potente que aquele apresentado pelo agonista clássico do receptor de adenosina A_{2A} , CGS 21680, uma vez que a administração profilática de CGS 21680, por via intranasal, não foi suficiente para inibir a hiper-reatividade suscitada pela exposição única de camundongos sensibilizados ao aerossol de 5% de ovoalbumina (Bonneau e cols., 2006).

O efeito anti-inflamatório desencadeado pela ativação de receptores de adenosina A_{2A} é amplamente aceito e estudado. Vimos que LASSBio-897 inibiu significativamente o infiltrado inflamatório e a produção de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar ante a exposição à ovoalbumina, LPS e sílica em camundongos. Nossos dados estão de acordo com Fozard e colaboradores que mostraram que CGS 21680 administrado por via intratraqueal reduz de maneira dose dependente o número de leucócitos (eosinófilos, neutrófilos e linfócitos), o conteúdo proteico e atividade de mieloperoxidase (MPO) e da peroxidase eosinofílica (EPO) no lavado broncoalveolar de ratos, 24 h após o desafio com ovoalbumina, sendo essa resposta equiparada ao efeito do glicocorticoide budesonida e revertida pelo antagonista seletivo do receptor A_{2A} , ZM 241385 (Fozard e cols., 2002). O efeito anti-inflamatório de agonismo de receptores A_{2A} foi demonstrado em um modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por carragenina, onde o tratamento com CGS 21680 resultou na redução do infiltrado neutrofílico no tecido pulmonar, acompanhado pela diminuição dos níveis de TNF- α e IL-1 β no exsudato pleural de camundongos.

Além disso, tratamento com CGS 21680 reduziu o aumento da expressão tecidual de iNOS, ICAM-1, P-selectina, MPO e NF- κ B induzido por carragenina (Impellizzeri e cols., 2011).

Efeitos anti-inflamatórios produzidos pela ativação de receptores de A_{2A} em mastócitos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, células epiteliais e neutrófilos são amplamente disseminados na literatura (Spicuzza e cols., 2006, Cicala & Ialenti, 2013, Trevethick e cols., 2008, Brown e cols., 2008). Contudo, o tratamento com LASSBio-897 não produziu nenhum efeito sobre a atividade de células implicadas no desenvolvimento da asma como mastócitos e linfócitos. O mesmo foi observado quando o efeito de LASSBio-897 foi avaliado sobre mastócitos, células epiteliais e macrófagos ativados por partículas de sílica. No entanto, considerada a possível atividade alostérica de LASSBio-897 sobre receptores A_{2A} , a potencialidade do composto pode ter sido subestimada em nossos ensaios. Assim, torna-se coerente a realização de avaliações complementares da ação de LASSBio-897 sobre essas células, na presença de adenosina exógena, uma vez que ativadores alóstericos requerem a presença do ligante ortostérico para exercerem seus efeitos.

Conforme anteriormente mencionado, o tratamento com LASSBio-897 sobrepujou o efeito fibrogênico desencadeado pelo insulto pulmonar com partículas de sílica em camundongos e reduziu significativamente a proliferação e produção de colágeno induzida por IL-13 em fibroblastos oriundos de uma condição de silicose. Consideradas as observações acima, pode-se arrazoar uma importante atividade antifibrótica de LASSBio-897 na silicose. Contudo, a correlação direta entre o efeito apresentado e a atividade do composto sobre receptores de adenosina A_{2A} é complexa, tendo em vista que a associação entre a ativação desses receptores e fibrose é bastante controversa na literatura atual.

Investigações anteriores mostraram que a ativação farmacológica de receptores A_{2A} suprime a fibrose intersticial renal em um modelo murino de obstrução ureteral unilateral (OUU), onde CGS 21680 aboliu a deposição de colágeno tipo I e II, reduziu a expressão de mRNA para TGF- β 1 e inibiu a expressão de α -SMA após OUU. Foi ainda observado que a remoção genética de receptores A_{2A} potencializou a progressão da fibrose intersticial renal induzida por OUU, reforçando a importância desse receptor em prevenir a

fibrose renal (Xiao e cols., 2013, Xiao e cols., 2013). De forma semelhante, a ativação de receptores A_{2A} promoveu uma pronunciada redução da deposição de colágeno I, III e IV e da expressão de α -SMA em um modelo de glomerulonefrite em ratos (Garcia e cols., 2011). No entanto, efeitos opostos foram observados quando utilizou-se ferramentas de bloqueio farmacológico e de deleção genética de receptores A_{2A} em modelos de fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono ou por tioacetamida (Chan e cols., 2006). O bloqueio de receptores A_{2A} foi ainda descrito por prevenir a fibrose peritoneal (Nakav e cols., 2009) e dérmica (Fernandez e cols., 2008). Diante dessas evidências, pode-se conjecturar uma possível regulação órgão ou tecido específico da função de receptores de adenosina A_{2A} no controle da fibrose (Xiao e cols., 2013). Esse cenário reforça que a modulação farmacológica de receptores A_{2A} precisa ser altamente restrita a sítios de injúria tecidual para reduzir possíveis efeitos adversos.

O efeito de LASSBio-897 em modelos de inflamação pulmonar abordados nesse trabalho, coincidem com o efeito produzido por agonistas de receptores A_{2A} mostrados na literatura atual, no entanto, a atividade farmacológica do composto sobre esses receptores precisa ser melhor estudada.

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- O composto LASSBio-897 foi eficaz em inibir as alterações de resistência e elastância pulmonares, assim como o acúmulo de células inflamatórias nos pulmões de camundongos após estimulação aguda com ovoalbumina, atividade que parece não resultar de uma ação direta sobre células T e mastócitos, mas associada ao bloqueio de citocinas e quimiocinas;
- O tratamento, profilático e terapêutico, com LASSBio-897 falhou no controle da inflamação e hiper-reatividade das vias aéreas no modelo de asma crônica;
- A administração de LASSBio-897 foi eficaz em reduzir o aumento do número de células inflamatórias no BAL, assim como, os níveis teciduais de mediadores inflamatórios ante a exposição a LPS em camundongos. Além disso, a administração de LASSBio-897 inibiu o aumento de resistência e elastância pulmonares após a exposição a LPS.
- LASSBio-897 promoveu a melhora da inflamação e da fibrose pulmonar no modelo murino de silicose que parece resultar tanto do aumento do “*clearance*” de partículas de sílica, que culmina na interrupção do ciclo de injúria tecidual, quanto da inibição da secreção de citocinas e quimiocinas, por meio de um mecanismo que envolve a sinalização através de NF- κ B. A redução do processo fibrótico produzida pelo tratamento com LASSBio-897 relaciona-se à inibição da proliferação e produção de colágeno por fibroblastos tratados com o composto. Ademais, o controle da inflamação e a melhora da qualidade do parênquima pulmonar parecem estar associados à restauração da função pulmonar em animais tratados com LASSBio-897.

Conclui-se que o composto LASSBio-897 pode prevenir a instalação do quadro de asma aguda, sem contudo alterar a resposta asmática já instalada. A capacidade do LASSBio-897 de reverter a resposta inflamatória e fibrótica pulmonar induzida por partículas de sílica sugere uma aplicação na silicose, mais do que na asma, seja uma perspectiva verdadeiramente promissora.

7. Referências Bibliográficas

1. Perez-Aso M, Fernandez P, Mediero A, Chan ES, Cronstein BN. Adenosine 2A receptor promotes collagen production by human fibroblasts via pathways involving cyclic AMP and AKT but independent of Smad2/3. *FASEB J*. 2014 Feb;28(2):802-12.
2. Wilson CN. Adenosine receptors and asthma in humans. *Br J Pharmacol*. 2008 Oct;155(4):475-86.
3. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res*. 2010 Aug 7;690(1-2):24-39.
4. Sousa LP, Alessandri AL, Pinho V, Teixeira MM. Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2013 Aug;13(4):625-31.
5. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. 2007 Feb;21(2):325-32.
6. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*. 2013 Jan 11;339(6116):166-72.
7. Weiss U. Inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):427.
8. Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation *Annu Rev Ecol Evol Syst* 2012;43(385-406).
9. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):428-35.
10. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R, Robbins SL. *Robbins basic pathology*. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2007.

11. Antonioli L, Csoka B, Fornai M, Colucci R, Kokai E, Blandizzi C, et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov Today*. 2014 Mar 6.
12. Soriano JB, Campos HS. *Epidemiology of Asthma*. Pulmão RJ 2012. 2012;21(2):3-10.
13. Royce SG, Moodley Y, Samuel CS. Novel therapeutic strategies for lung disorders associated with airway remodelling and fibrosis. *Pharmacol Ther*. 2013 Oct 25.
14. Kim SR, Rhee YK. Overlap Between Asthma and COPD: Where the Two Diseases Converge. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010 Oct;2(4):209-14.
15. West JB. *Fisiopatologia Pulmonar Moderna*. Editora Manole LTDA. 1996;4ª edição.
16. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL. *Robbins pathologic basis of disease*. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 1999.
17. GINA. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2014*
Available from: <http://www.ginasthma.org/> 2014.
18. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008 Jun;38(6):872-97.
19. Miglino N, Roth M, Tamm M, Borger P. Asthma and COPD - The C/EBP Connection. *Open Respir Med J*. 2012;6:1-13.
20. Murphy DM, O'Byrne PM. Recent advances in the pathophysiology of asthma. *Chest*. 2010 Jun;137(6):1417-26.
21. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Front Microbiol*. 2013;4:263.

22. Li Y, Hua S. Mechanisms of pathogenesis in allergic asthma: Role of interleukin-23. *Respirology*. 2014 Apr 30.
23. Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*. 1999 Nov 25;402(6760 Suppl):B5-11.
24. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.
25. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004 May;59(5):469-78.
26. Barrios RJ, Kheradmand F, Batts L, Corry DB. Asthma: pathology and pathophysiology. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Apr;130(4):447-51.
27. Nelson KA, Zorc JJ. Asthma update. *Pediatr Clin North Am*. 2013 Oct;60(5):1035-48.
28. SBPT. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol* 2012;38(1):S1-S46.
29. SBPT. IV Brazilian Guidelines for the management of asthma *J Bras Pneumol*. 2006;32(Suppl 7):S447-74.
30. Cookson WO, Moffatt MF. Alchemy for asthma. *Nat Med*. 1998 May;4(5 Suppl):500-1.
31. Kay AB. Immunomodulation in asthma: mechanisms and possible pitfalls. *Curr Opin Pharmacol*. 2003 Jun;3(3):220-6.
32. Kemeny DM, Urbanek R, Ewan P, McHugh S, Richards D, Patel S, et al. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. *Clin Exp Allergy*. 1989 Sep;19(5):545-9.

33. Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:489-507.
34. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):445-54.
35. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S73-80.
36. Barnes PJ. New therapies for asthma: is there any progress? *Trends Pharmacol Sci.* 2010 Jul;31(7):335-43.
37. Tang ML, Wilson JW, Stewart AG, Royce SG. Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacol Ther.* 2006 Nov;112(2):474-88.
38. Lloyd CM, Robinson DS. Allergen-induced airway remodelling. *Eur Respir J.* 2007 May;29(5):1020-32.
39. Bergeron C, Al-Ramli W, Hamid Q. Remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2009 May 1;6(3):301-5.
40. Grainge CL, Lau LC, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med.* 2011 May 26;364(21):2006-15.
41. Barnes PJ. Biochemical basis of asthma therapy. *J Biol Chem.* 2011 Sep 23;286(38):32899-905.
42. Myers TR, Tomasio L. Asthma: 2015 and beyond. *Respir Care.* 2011 Sep;56(9):1389-407; discussion 407-10.
43. Barnes PJ. New drugs for asthma. *Discov Med.* 2004 Dec;4(24):421-6.

44. Louis R, Schleich F, Barnes PJ. Corticosteroids: still at the frontline in asthma treatment? Clin Chest Med. 2012 Sep;33(3):531-41.
45. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. Lancet. 2002 Oct 26;360(9342):1313-22.
46. Barnes PJ. Glucocorticosteroids: current and future directions. Br J Pharmacol. 2011 May;163(1):29-43.
47. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. Nat Rev Immunol. 2008 Mar;8(3):218-30.
48. Caramori G, Adcock I. Pharmacology of airway inflammation in asthma and COPD. Pulm Pharmacol Ther. 2003;16(5):247-77.
49. Cazzola M, Page CP, Rogliani P, Matera MG. beta2-agonist therapy in lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 2013 Apr 1;187(7):690-6.
50. Cazzola M, Matera MG. Bronchodilators: current and future. Clin Chest Med. 2014 Mar;35(1):191-201.
51. Saúde Md. Pneumoconioses. Available from: http://bvsmssaudegovbr/bvs/publicacoes/protocolo_pneumoconiosespdf. 2006.
52. Lido AV, Kitamura S, Oliveira JI, Lucca SR, Azevedo VAZ, Bagatin E. Occupational exposure and occurrence of pneumoconioses in Campinas, Brazil, 1978-2003. J Bras Pneumol 2008;34(6):367-72.
53. Castro HA, Silva CG, Vicentin G. Estudo das internações hospitalares por pneumoconioses no Brasil, 1984-2003. Rev Bras Epidemiol 2005;8(2):150-60.
54. Ribeiro FSN. O mapa da exposição à sílica no Brasil. Ministério da Saúde/UERJ Available from:

http://bvs.msssaude.gov.br/bvs/publicacoes/mapa_exposicao_silica_brasilpdf.

2010.

55. Capitani EM, Algranti E. Outras pneumoconioses. *J Bras Pneumol*. 2006;32(Suppl 2):S72-S7.

56. Greenberg MI, Waksman J, Curtis J. Silicosis: a review. *Dis Mon*. 2007 Aug;53(8):394-416.

57. Leung CC, Yu IT, Chen W. Silicosis. *Lancet*. 2012 May 26;379(9830):2008-18.

58. Rimal B, Greenberg AK, Rom WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr Opin Pulm Med*. 2005 Mar;11(2):169-73.

59. Martinez C, Prieto A, Garcia L, Quero A, Gonzalez S, Casan P. Silicosis: a disease with an active present. *Arch Bronconeumol*. 2010 Feb;46(2):97-100.

60. Capitani EM. A silicose (ainda) entre nós. *J Bras Pneumol*. 2006;32(6):33-5.

61. Costantini LM, Gilberti RM, Knecht DA. The phagocytosis and toxicity of amorphous silica. *PLoS One*. 2011;6(2):e14647.

62. Terra Filho M, Santos UP. [Silicosis]. *J Bras Pneumol*. 2006;32 Suppl 2:S41-7.

63. Castranova V, Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ Health Perspect*. 2000 Aug;108 Suppl 4:675-84.

64. Brown T. Silica exposure, smoking, silicosis and lung cancer--complex interactions. *Occup Med (Lond)*. 2009 Mar;59(2):89-95.

65. Hobson J. To die for? The health and safety of fast fashion. *Occup Med (Lond)*. 2013 Jul;63(5):317-9.

66. Carneiro APS, Barreto SM, Siqueira AL, La Rocca PF. Silica exposure index in gold mining. *Rev Saúde Pública*. 2006;40(1):83-91.
67. Santos C, Norte A, Fradinho F, Catarino A, Ferreira AJ, Loureiro M, et al. Silicose - Breve revisão e experiência de um serviço de pneumologia. *Rev Port Pneumol*. 2010;XVI(1):99-115.
68. Davis GS. The pathogenesis of silicosis. State of the art. *Chest*. 1986 Mar;89(3 Suppl):166S-9S.
69. Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;7(2):168-73.
70. Hamilton RF, Jr., Thakur SA, Holian A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2008 Apr 1;44(7):1246-58.
71. Sato T, Shimosato T, Alvord WG, Klinman DM. Suppressing oligodeoxynucleotides inhibit silica-induced pulmonary inflammation. *J Immunol*. 2008 Jun 1;180(11):7648-54.
72. Ferreira AS, Moreira VB, Ricardo HMV, Coutinho R, Gabetto JM, Marchiori E. Fibrose maciça progressiva em trabalhadores expostos à sílica. Achados na tomografia computadorizada de alta resolução. *J Bras Pneumol* 2006;32(6):523-8.
73. Barboza CEG, Winter DH, Seiscento M, Santos UP, Filho MT. Tuberculosis and silicosis: epidemiology, diagnosis and chemoprophylaxis. *J Bras Pneumol*. 2008;34(11):959-66.
74. Vass G, Horvath I. Adenosine and adenosine receptors in the pathomechanism and treatment of respiratory diseases. *Curr Med Chem*. 2008;15(9):917-22.
75. Spicuzza L, Di Maria G, Polosa R. Adenosine in the airways: implications and applications. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar 8;533(1-3):77-88.

76. Arch JR, Newsholme EA. The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays Biochem.* 1978;14:82-123.
77. Zhou Y, Schneider DJ, Blackburn MR. Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease. *Pharmacol Ther.* 2009 Jul;123(1):105-16.
78. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 2007 Jul;14(7):1315-23.
79. Cicala C, Ialenti A. Adenosine signaling in airways: toward a promising antiasthmatic approach. *Eur J Pharmacol.* 2013 Aug 15;714(1-3):522-5.
80. Blackburn MR. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Feb;24(2):66-70.
81. Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:775-87.
82. Driver AG, Kukoly CA, Ali S, Mustafa SJ. Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Jul;148(1):91-7.
83. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001 Dec;53(4):527-52.
84. Polosa R, Blackburn MR. Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Oct;30(10):528-35.
85. Polosa R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2002 Aug;20(2):488-96.

86. Spicuzza L, Bonfiglio C, Polosa R. Research applications and implications of adenosine in diseased airways. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Aug;24(8):409-13.
87. Fozard JR. The case for a role for adenosine in asthma: almost convincing? *Curr Opin Pharmacol.* 2003 Jun;3(3):264-9.
88. Grunig G. IL-13 and adenosine: partners in a molecular dance? *J Clin Invest.* 2003 Aug;112(3):329-31.
89. Cushley MJ, Tattersfield AE, Holgate ST. Inhaled adenosine and guanosine on airway resistance in normal and asthmatic subjects. 1983. *Br J Clin Pharmacol.* 2004 Dec;58(7):S751-5; discussion S6-8.
90. Blackburn MR, Volmer JB, Thrasher JL, Zhong H, Crosby JR, Lee JJ, et al. Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation, and airway obstruction. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):159-70.
91. Caruso M, Holgate ST, Polosa R. Adenosine signalling in airways. *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Jun;6(3):251-6.
92. Chunn JL, Molina JG, Mi T, Xia Y, Kellems RE, Blackburn MR. Adenosine-dependent pulmonary fibrosis in adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol.* 2005 Aug 1;175(3):1937-46.
93. Chunn JL, Young HW, Banerjee SK, Colasurdo GN, Blackburn MR. Adenosine-dependent airway inflammation and hyperresponsiveness in partially adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol.* 2001 Oct 15;167(8):4676-85.
94. Zhong H, Chunn JL, Volmer JB, Fozard JR, Blackburn MR. Adenosine-mediated mast cell degranulation in adenosine deaminase-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Aug;298(2):433-40.

95. Trevethick MA, Mantell SJ, Stuart EF, Barnard A, Wright KN, Yeadon M. Treating lung inflammation with agonists of the adenosine A2A receptor: promises, problems and potential solutions. *Br J Pharmacol*. 2008 Oct;155(4):463-74.
96. Hasko G, Pacher P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol*. 2008 Mar;83(3):447-55.
97. Polosa R, Holgate ST. Adenosine receptors as promising therapeutic targets for drug development in chronic airway inflammation. *Curr Drug Targets*. 2006 Jun;7(6):699-706.
98. Morello S, Sorrentino R, Pinto A. Adenosine A2a receptor agonists as regulators of inflammation: pharmacology and therapeutic opportunities. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*. 2009;2:11-7.
99. Fredholm BB, Chern Y, Franco R, Sitkovsky M. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog Neurobiol*. 2007 Dec;83(5):263-76.
100. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*. 2001 Dec 20-27;414(6866):916-20.
101. Nadeem A, Fan M, Ansari HR, Ledent C, Jamal Mustafa S. Enhanced airway reactivity and inflammation in A2A adenosine receptor-deficient allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Jun;292(6):L1335-44.
102. Mohsenin A, Mi T, Xia Y, Kellems RE, Chen JF, Blackburn MR. Genetic removal of the A2A adenosine receptor enhances pulmonary inflammation, mucin production, and angiogenesis in adenosine deaminase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Sep;293(3):L753-61.
103. Akkari R, Burbiel JC, Hockemeyer J, Muller CE. Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. *Curr Top Med Chem*. 2006;6(13):1375-99.

104. Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Apr;12(4):265-86.
105. de Lera Ruiz M, Lim YH, Zheng J. Adenosine A2A Receptor as a Drug Discovery Target. *J Med Chem*. 2014 May 8;57(9):3623-50.
106. Fozard JR, Ellis KM, Villela Dantas MF, Tigani B, Mazzoni L. Effects of CGS 21680, a selective adenosine A2A receptor agonist, on allergic airways inflammation in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2002 Mar 8;438(3):183-8.
107. Bonneau O, Wyss D, Ferretti S, Blaydon C, Stevenson CS, Trifilieff A. Effect of adenosine A2A receptor activation in murine models of respiratory disorders. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 May;290(5):L1036-43.
108. Benfatto GT, Polosa R. A2A adenosine receptor agonists for the treatment of asthma? *Allergy*. 2008 Aug;63(8):1086.
109. Luijk B, van den Berge M, Kerstjens HA, Postma DS, Cass L, Sabin A, et al. Effect of an inhaled adenosine A2A agonist on the allergen-induced late asthmatic response. *Allergy*. 2008 Jan;63(1):75-80.
110. Kimatrai-Salvador M, Baraldi PG, Romagnoli R. Allosteric modulation of A1-adenosine receptor: a review. *Drug Discov Today Technol*. 2013 Summer;10(2):e285-96.
111. Zapata-Sudo G, Pereira SL, Beiral HJ, Kummerle AE, Raimundo JM, Antunes F, et al. Pharmacological characterization of (3-thienylidene)-3,4-methylenedioxybenzoylhydrazide: a novel muscarinic agonist with antihypertensive profile. *Am J Hypertens*. 2010 Feb;23(2):135-41.
112. Lima PC, Lima LM, da Silva KC, Leda PH, de Miranda AL, Fraga CA, et al. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. *Eur J Med Chem*. 2000 Feb;35(2):187-203.

113. Silva AG, Zapata-Sudo G, Kummerle AE, Fraga CA, Barreiro EJ, Sudo RT. Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. *Bioorg Med Chem*. 2005 May 16;13(10):3431-7.
114. Fraga CA, Barreiro EJ. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. *Curr Med Chem*. 2006;13(2):167-98.
115. Barreiro EJ. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. . *Quim Nova*. 2002;25(6B):1172-80.
116. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol*. 1990 Apr;258(4 Pt 1):L148-56.
117. Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, do Patrocínio M, Warth TN, et al. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. *Am J Physiol*. 1994 Jan;266(1 Pt 1):L23-9.
118. Han EH, Park JH, Kim JY, Chung YC, Jeong HG. Inhibitory mechanism of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response in mast cells. *Food Chem Toxicol*. 2009 Jun;47(6):1069-75.
119. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*. 2007 Mar;127(3):526-37.
120. Brown JM, Swindle EJ, Kushnir-Sukhov NM, Holian A, Metcalfe DD. Silica-directed mast cell activation is enhanced by scavenger receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Jan;36(1):43-52.
121. Suzuki N, Horiuchi T, Ohta K, Yamaguchi M, Ueda T, Takizawa H, et al. Mast cells are essential for the full development of silica-induced pulmonary

inflammation: a study with mast cell-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993 Nov;9(5):475-83.

122. Hakansson HF, Smailagic A, Brunmark C, Miller-Larsson A, Lal H. Altered lung function relates to inflammation in an acute LPS mouse model. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012 Oct;25(5):399-406.

123. Drazen JM, Finn PW, De Sanctis GT. Mouse models of airway responsiveness: physiological basis of observed outcomes and analysis of selected examples using these outcome indicators. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:593-625.

124. Hall S, Agrawal DK. Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2014 Jun 13.

125. Bates JH, Rincon M, Irvin CG. Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Sep;297(3):L401-10.

126. Lacher SE, Johnson C, Jessop F, Holian A, Migliaccio CT. Murine pulmonary inflammation model: a comparative study of anesthesia and instillation methods. *Inhal Toxicol*. 2010 Jan;22(1):77-83.

127. Van der Velden J, Snibson KJ. Airway disease: the use of large animal models for drug discovery. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011 Oct;24(5):525-32.

128. Holmes AM, Solari R, Holgate ST. Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. *Drug Discov Today*. 2011 Aug;16(15-16):659-70.

129. Serra MF, Anjos-Valotta EA, Olsen PC, Couto GC, Jurgilas PB, Cotias AC, et al. Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. *Anesthesiology*. 2012 Sep;117(3):580-91.

130. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Sep;118(3):551-9; quiz 60-1.
131. Cain H. Bronchoprovocation testing. *Clin Chest Med*. 2001 Dec;22(4):651-9.
132. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Dec;140(6):1745-53.
133. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992 Jan 30;326(5):298-304.
134. Huang SK, Xiao HQ, Kleine-Tebbe J, Paciotti G, Marsh DG, Lichtenstein LM, et al. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J Immunol*. 1995 Sep 1;155(5):2688-94.
135. Corrigan CJ, Kay AB. Asthma. Role of T-lymphocytes and lymphokines. *Br Med Bull*. 1992 Jan;48(1):72-84.
136. Azzawi M, Johnston PW, Majumdar S, Kay AB, Jeffery PK. T lymphocytes and activated eosinophils in airway mucosa in fatal asthma and cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Jun;145(6):1477-82.
137. Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1993 Aug;92(2):313-24.
138. Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med*. 2003 Sep 2;139(5 Pt 1):359-70.

139. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med.* 2012 Jan;106(1):9-14.
140. Lemanske RF, Jr., Busse WW. 6. Asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Feb;111(2 Suppl):S502-19.
141. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Sep;128(3):451-62; quiz 63-4.
142. Lloyd CM. Building better mouse models of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2007 Jun;7(3):231-6.
143. Pease JE, Williams TJ. Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 2001 Jun;1(3):248-53.
144. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Oct;36(10):1882-6.
145. Manuyakorn W, Howarth PH, Holgate ST. Airway remodelling in asthma and novel therapy. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2013 Mar;31(1):3-10.
146. Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol.* 2007 Dec;19(6):676-80.
147. Cho JY, Miller M, Baek KJ, Han JW, Nayar J, Lee SY, et al. Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004 Feb;113(4):551-60.
148. Yang X, Walton W, Cook DN, Hua X, Tilley S, Haskell CA, et al. The chemokine, CCL3, and its receptor, CCR1, mediate thoracic radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 Jul;45(1):127-35.
149. Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jan;8(1):8-14.

150. Wallin A, Pourazar J, Sandstrom T. LPS-induced bronchoalveolar neutrophilia; effects of salmeterol treatment. *Respir Med.* 2004 Nov;98(11):1087-92.
151. Kline JN, Cowden JD, Hunninghake GW, Schutte BC, Watt JL, Wohlford-Lenane CL, et al. Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Jul;160(1):297-303.
152. Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Doz E, Noulin N, Janot L, et al. Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Exp Pathol.* 2007 Dec;88(6):387-91.
153. Rojas M, Woods CR, Mora AL, Xu J, Brigham KL. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Feb;288(2):L333-41.
154. Kabir K, Gelinas JP, Chen M, Chen D, Zhang D, Luo X, et al. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock.* 2002 Apr;17(4):300-3.
155. Thorn J, Rylander R. Inflammatory response after inhalation of bacterial endotoxin assessed by the induced sputum technique. *Thorax.* 1998 Dec;53(12):1047-52.
156. Rylander R, Bake B, Fischer JJ, Helander IM. Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Oct;140(4):981-6.
157. Tigani B, Hannon JP, Rondeau C, Mazzoni L, Fozard JR. Airway hyperresponsiveness to adenosine induced by lipopolysaccharide in Brown Norway rats. *Br J Pharmacol.* 2002 May;136(1):111-9.
158. Albaiceta GM, Gutierrez-Fernandez A, Garcia-Prieto E, Puente XS, Parra D, Astudillo A, et al. Absence or inhibition of matrix metalloproteinase-8

decreases ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 Nov;43(5):555-63.

159. Rittirsch D, Flierl MA, Day DE, Nadeau BA, McGuire SR, Hoesel LM, et al. Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation. *J Immunol.* 2008 Jun 1;180(11):7664-72.

160. Borges VM, Falcao H, Leite-Junior JH, Alvim L, Teixeira GP, Russo M, et al. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *J Exp Med.* 2001 Jul 16;194(2):155-64.

161. Perez-Ramos J, de Lourdes Segura-Valdez M, Vanda B, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Oct;160(4):1274-82.

162. Ferreira TP, de Arantes AC, do Nascimento CV, Olsen PC, Trentin PG, Rocco PR, et al. IL-13 immunotoxin accelerates resolution of lung pathological changes triggered by silica particles in mice. *J Immunol.* 2013 Nov 15;191(10):5220-9.

163. Jindal SK. Silicosis in India: past and present. *Current Opinion in Pulmonary Medicine.* 2013 Mar;19(2):163-8.

164. Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res.* 2000;1(1):54-61.

165. Eggleston PA, Rosenstein BJ, Stackhouse CM, Alexander MF. Airway hyperreactivity in cystic fibrosis. Clinical correlates and possible effects on the course of the disease. *Chest.* 1988 Aug;94(2):360-5.

166. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Mar;111(3):450-63; quiz 64.

167. Thakur SA, Beamer CA, Migliaccio CT, Holian A. Critical role of MARCO in crystalline silica-induced pulmonary inflammation. *Toxicol Sci.* 2009 Apr;108(2):462-71.
168. Fernandez Tena A, Casan Clara P. Deposition of inhaled particles in the lungs. *Arch Bronconeumol.* 2012 Jul;48(7):240-6.
169. Lippmann M, Yeates DB, Albert RE. Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med.* 1980 Nov;37(4):337-62.
170. Fu NF, Luo CH, Wu JC, Zheng YY, Gan YJ, Ling JA, et al. Clearance of free silica in rat lungs by spraying with chinese herbal kombucha. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:790792.
171. Vanhee D, Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel AB. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Eur Respir J.* 1995 May;8(5):834-42.
172. Farias Filho FA. Estudo da participação de mastócitos no processo de fibrose pulmonar induzido por sílica em camundongos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz. 2008.
173. Hamada H, Vallyathan V, Cool CD, Barker E, Inoue Y, Newman LS. Mast cell basic fibroblast growth factor in silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Jun;161(6):2026-34.
174. Castranova V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2004 Oct 1;37(7):916-25.
175. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 May;157(5 Pt 1):1666-80.

176. Hao CF, Li XF, Yao W. Role of insulin-like growth factor II receptor in transdifferentiation of free silica-induced primary rat lung fibroblasts. *Biomed Environ Sci.* 2013 Dec;26(12):979-85.
177. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):666-71.
178. Hao CF, Li XF, Yao W. Protein expression in silica dust-induced transdifferentiated rats lung fibroblasts. *Biomed Environ Sci.* 2013 Sep;26(9):750-8.
179. Hu M, Che P, Han X, Cai GQ, Liu G, Antony V, et al. Therapeutic Targeting of Src Kinase in Myofibroblast Differentiation and Pulmonary Fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014 Jul 21.
180. Chen F, Kuhn DC, Sun SC, Gaydos LJ, Demers LM. Dependence and reversal of nitric oxide production on NF-kappa B in silica and lipopolysaccharide-induced macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Sep 25;214(3):839-46.
181. Chen F, Sun SC, Kuh DC, Gaydos LJ, Demers LM. Essential role of NF-kappa B activation in silica-induced inflammatory mediator production in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Sep 25;214(3):985-92.
182. Rojanasakul Y, Ye J, Chen F, Wang L, Cheng N, Castranova V, et al. Dependence of NF-kappaB activation and free radical generation on silica-induced TNF-alpha production in macrophages. *Mol Cell Biochem.* 1999 Oct;200(1-2):119-25.
183. Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. *Chest.* 2000 May;117(5):1482-7.
184. Goblyos A, Ijzerman AP. Allosteric modulation of adenosine receptors. *Purinergic Signal.* 2009 Mar;5(1):51-61.

185. Goblyos A, Ijzerman AP. Allosteric modulation of adenosine receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1808(5):1309-18.
186. Impellizzeri D, Di Paola R, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Melani A, et al. CGS 21680, an agonist of the adenosine (A_{2A}) receptor, decreases acute lung inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2011 Oct 1;668(1-2):305-16.
187. Brown RA, Spina D, Page CP. Adenosine receptors and asthma. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153 Suppl 1:S446-56.
188. Xiao H, Shen HY, Liu W, Xiong RP, Li P, Meng G, et al. Adenosine A_{2A} receptor: a target for regulating renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *PLoS One*. 2013;8(4):e60173.
189. Xiao H, Si LY, Liu W, Li N, Meng G, Yang N, et al. The effects of adenosine A_{2A} receptor knockout on renal interstitial fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. *Acta Histochem*. 2013 May;115(4):315-9.
190. Garcia GE, Truong LD, Chen JF, Johnson RJ, Feng L. Adenosine A_{2A} receptor activation prevents progressive kidney fibrosis in a model of immune-associated chronic inflammation. *Kidney Int*. 2011 Aug;80(4):378-88.
191. Chan ES, Montesinos MC, Fernandez P, Desai A, Delano DL, Yee H, et al. Adenosine A_{2A} receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. *Br J Pharmacol*. 2006 Aug;148(8):1144-55.
192. Nakav S, Kachko L, Vorobiov M, Rogachev B, Chaimovitz C, Zlotnik M, et al. Blocking adenosine A_{2A} receptor reduces peritoneal fibrosis in two independent experimental models. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Aug;24(8):2392-9.
193. Fernandez P, Trzaska S, Wilder T, Chiriboga L, Blackburn MR, Cronstein BN, et al. Pharmacological blockade of A_{2A} receptors prevents dermal fibrosis in a model of elevated tissue adenosine. *Am J Pathol*. 2008 Jun;172(6):1675-82.