

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**Triagem e avaliação farmacológica de novos
inibidores de PDE4, da classe das *N*-metil-*N*-
acilidrazonas, para controle da asma.**

SUZANA VANESSA SOARES CARDOZO

**RIO DE JANEIRO
2014**

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

C268 Cardozo, Suzana Vanessa Soares

Triagem e avaliação farmacológica de novos inibidores de PDE4, da classe das N-metil-N-acilhidrazonas, para controle da asma / Suzana Vanessa Soares Cardozo. – Rio de Janeiro, 2014.

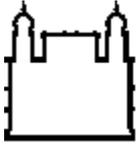
xiii, 102 f. : il. ; 30 cm.

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

Bibliografia: f. 75-83

1. Asma. 2. Inflamação pulmonar. 3. HDM. 4. Ovoalbumina. 5. N-acilidrazonas. 6. Metilação. 7. Lipopolissacarídeos (lps). 8. Modelos animais. I. Título

CDD 616.238



Ministério da Saúde

FIQCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

SUZANA VANESSA SOARES CARDOZO

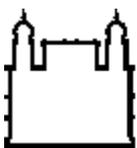
**Triagem e avaliação farmacológica de novos
inibidores de PDE4, da classe das *N*-metil-*N*-
acilidrazonas, para controle da asma.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em biologia celular e molecular com ênfase em farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Martins

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

SUZANA VANESSA SOARES CARDOZO

Triagem e avaliação farmacológica de novos inibidores de PDE4, da classe das N-metil-N-acilidrazonas, para controle da asma.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marco Aurélio Martins

Aprovada em: 16 / 12 / 2014.

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto
Prof. Dr. Jorge Carlos Santos da Costa
Prof. Dr. Arthur Eugen Kümmerle
Profa. Dra. Ana Luisa Palhares de Miranda (suplente)
Profa. Dra. Magda Fraguas Serra (revisor e suplente)

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2014

DEDICATÓRIA

À minha Vó Maria Angélica

Ao meu anjinho Gabriel Santiago Cardozo Sales

À minha família

Ao meu orientador Marco Aurélio Martins e

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha avó Angélica, pelo apoio e dedicação ao longo da minha vida, por me fazer sentir a pessoa mais importante do mundo, pelos carinhos, por ter estado sempre ao meu lado e ter acreditado em mim acima de tudo. Não tenho palavras para expressar o quanto a amo.

À minha tia Graça por seu carinho, pelas palavras sensatas nos momentos certos, pelas plantinhas que tanto amo e por se um exemplo do que significa a palavra família.

Aos “LASSBianos” pelo carinho, pelas sessões de artigos, pelo companheirismo e por terem sido fundamentais na minha iniciação científica. Jorge, Fernanda, Arthur, Alexandra, Raquel e muitos outros.

À Magda Fráguas, pela sua orientação durante a minha iniciação científica, pela revisão da tese, pelas broncas e inúmeras discussões que acima de tudo me fizeram crescer e enxergar as coisas com mais clarezas, por acreditar em mim, pelas palavras de carinho, pelos conselhos... são tantas coisas que tenho que agradecer a você, mas uma coisa não posso deixar: Obrigada por ter feito parte da minha formação.

AO MEUS AMIGOS, amigos queridos que são acima de tudo a família que eu escolhi fazer parte. Diana Dalzy, obrigada pelo carinho e principalmente por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis. Aline Vieira, não tenho palavras para descrever o tamanho do seu coração e nem espaço para enumerar suas qualidades: amiga, justa, humana, honrada, e etc. Agradeço a Deus por ter tido o privilégio de conhece-la. Obrigada por fazer parte da minha grande família. Priscila Olsen, Daniele Bianchi, Daniele Matheus, Jéssica Prado, Raphael, Thiago, Andressa Moraes, Tássia, Luciana Pontes, Bianca Torres e Patricia Tretim OBRIGADA pela amizade de vocês, pelos conselhos e broncas, por acrescentarem coisas boas na minha vida.

À Carolina Azevedo, pela amizade, pelo carinho, pelos ensaios no citometro de fluxo. Obrigada por toda ajuda.

À Dani Matheus, obrigada por sua amizade, pelas broncas, conselhos, momentos felizes, por estar sempre por perto, por me ouvir e ser dura quando necessário e por ser a cumadre mais fofa do mundo..

À Edna Vallota, obrigada por ser essa pessoa tão especial, pela grande ajuda junto com o Diego Coutinho na execução dos ensaios iniciais e por ser minha amiga.

À todos do Laboratório de Inflamação por fazerem parte do meu dia-dia, por estarem dispostos a ajudar. À Ana Lúcia pelos puxões de orelha, pelos incansáveis ensaios de ELISA junto com a Natalia, pela forma franca e transparente de ser. À Ana Carolina pelos ensaios no BUXCO, obrigada pelas constantes ajudas durante os experimentos. Finalmente, a pessoa

EPÍGRAFE

"Há uma vitória e uma derrota - a maior e a melhor das vitórias,
a mais baixa e a pior das derrotas -, que cada homem conquista ou sofre
não pelas mãos dos outros, mas pelas próprias mãos."

Platão

"No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade."

Albert Einstein

" Só é digno da liberdade, como da vida, aquele que se empenha
em conquistá-la."

Johann Goethe

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	XII
ASBRACKT	XIII
I- INTRODUÇÃO.....	01
1.1 - Definição e aspectos epidemiológicos da Asma.....	01
1.2 - Imunopatologia da asma	02
1.3 – Fisiopatologia da asma	11
1.4 - Estratégias terapêuticas na asma	14
1.4.1 - Anti-inflamatórios esteroidais	14
1.4.2 - Agonistas β_2 -adrenérgicos	17
1.4.3 - Antagonistas do receptor de cisteinil leucotrienos (CysLT).....	19
1.4.4 - Inibidores de fosfodiesterase (PDE) 4	19
1.5.2 – Derivados <i>N</i> -metil- <i>N</i> -acilhidrazônicos (NAHs).....	23
II - OBJETIVOS	26
2.1 - Objetivos específicos	26
III - METODOLOGIA	27
3.1 - Animais	27
3.2 - Compostos	27
3.3 - Modelos de inflamação pulmonar.....	27
3.3.1 - Ensaio de inflamação pulmonar induzida por LPS.....	27
3.3.2 - Modelo de asma induzida com ovoalbumina (OVA).....	27
3.3.3 - Protocolo de provocação antigênica com extrato proteico de ácaros da poeira doméstica (HDM).....	28
3.4 - Pletismografia barométrica de corpo inteiro - avaliação da resistência e	

elastância pulmonares	28
3.5 - Análise das células presentes no lavado broncoalveolar (BAL).....	29
3.6 - Quantificação de citocinas do tecido pulmonar.....	29
3.7 - Ensaio de detecção de peroxidase de eosinófilos (EPO).....	30
3.8 - Análise morfométrica do tecido pulmonar.....	30
3.8.1 - Avaliação do infiltrado eo sinofílico e neutrílico peribronquiolar	31
3.8.2 - Avaliação da fibrose subepitelial e da produção de muco por morfometria digital.....	31
3.9 - Cultura primária de fibroblastos pulmonares.....	31
3.9.1 - Avaliação da resposta proliferativa.....	32
3.9.2 - Quantificação de MCP-1 no sobrenadante de fibroblastos.....	32
3.9.3 - Viabilidade celular.....	32
3.10 - Ensaio de avaliação da atividade de linfócitos <i>in vitro</i>	33
3.11 - Protocolo de anestesia mediada por receptor adrenérgico 2.....	33
3.9 - Análise estatística.....	34
IV - RESULTADOS	35
V - DISCUSSÃO	64
VI - CONCLUSÕES	74
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO - ARTIGO PUBLICADO EM 2012 NO JOURNAL MEDICINAL CHEMISTRY, TÍTULO: DESIGN, SYNTHESIS, AND PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF N-ACYLHYDRAZONES AND NOVEL CONFORMATIONALLY CONSTRAINED COMPOUNDS AS SELECTIVE AND POTENT ORALLY ACTIVE PHOSPHODIESTERASE-4 INHIBITORS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP – adenosina monofosfato
- AMT- 3-amino-1,2,4-triazol
- AP-1 – proteína ativadora 1
- ATP – Adenosina trifosfato
- BAL – Lavado Broncoalveolar
- BSA - albumina sérica bovina
- C/EBP - CCAAT/*enhancer binding protein* - proteína alfa estimuladora de ligação a sequencia CCAAT do DNA
- CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório
- CXCR4 - receptor 4 de alfa-quimiocinas CXC
- ECP - proteína catiônica eosinofílica
- EDN - neurotoxina derivada de eosinófilos
- EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGF - fator de crescimento epidermal
- EMT - transição epitelial-mesenquimal
- EPO - enzima peroxidase do eosinófilo
- GMP – guanosina monofosfato
- GR – receptor de glicocorticoide
- H&E - hematoxilina-eosina
- HAT - histona acetiltransferase
- IL-(?) - interleucina-(?)
- MBP - proteína básica principal
- MCP-1 - proteína quimiotática de monócitos-1
- MEC - matriz extracelular
- MHC- complexo de histocompatibilidade principal
- MIP-1 - proteína inflamatória de macrófago-1 alfa
- MMPs - metaloproteinases de matriz
- NFkB - fator nuclear kappa B
- OPD - o-phenildiamino dihidrocloro
- OVA - ovoalbumina
- PBS - salina tamponada com fosfatos
- PDE - fosfodiesterase
- RANTES - “regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted”

rmIL-13 - recombinante murino de IL-13

SBF - soro fetal bovino

SCF - fator de crescimento celular

TBS - tampão tris-salina

TGF- - fator de transformação do crescimento eta

TIMPs - metaloproteinases do tecido

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

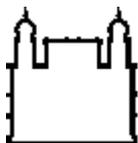
GINA- Iniciativa global para controle da asma

NAH - N- acilidrazonas

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

PI - iodeto de propídeo

APC - Célula apresentadora de antígenos



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

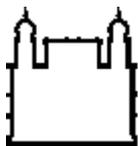
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESUMO

Triagem e avaliação farmacológica de novos inibidores de PDE4, da classe das *N*-metil-*N*-acilidrazonas, para controle da asma.

SUZANA VANESSA SOARES CARDOZO

Inibidores de PDE4 atuam aumentando as concentrações intracelulares de AMPc, um segundo mensageiro com várias ações anti-inflamatórias em células efectoras envolvidas na patogênese da asma e DPOC. Nesta tese foram avaliados 8 compostos de uma nova série de inibidores de PDE4, pertencentes à classe das *N*-metil-*N*-acilidrazonas (NAHs), com base em modelos experimentais de inflamação e remodelamento pulmonar, visando-se identificar potenciais novos agentes terapêuticos para doenças inflamatórias pulmonares. Foram quantificados leucócitos infiltrados no tecido pulmonar, a geração de citocinas, resistência e elastância pulmonar, fibrose e a produção de muco nas vias aéreas de camundongos A/J estimulados, por via intranasal, com LPS ou alérgeno. Todas as análises foram realizadas 18 ou 24 h após a última provocação. Culturas primárias de linfócitos e fibroblastos foram também empregadas para estudo de impacto dos tratamentos ao nível celular. O potencial pro-emético dos compostos mais promissores foi indiretamente investigado com base no ensaio de tempo de anestesia induzido pela mistura de quetamina e xilazina. O tratamento com agentes NAHs (100 µmol/kg, oral), exceto LASSBio-1393, inibiu acentuadamente a hiper-reatividade das vias aéreas (AHR), o infiltrado leucocitário e a produção de citocinas, de forma comparável ao observado para rolipram e cilomilast. Observou-se que os NAHs foram também ativos no bloqueio terapêutico da resposta asmática alérgica desencadeada por ovoalbumina (OVA). Neste modelo, somente LASSBio-1406 e LASSBio-1407 foram capazes de reverter todas as alterações patológicas avaliadas, incluindo o infiltrado eosinofílico, a fibrose peribrônquica e a mucogênese, claramente refratários ao tratamento com o inibidor de referência de PDE4 rolipram. O perfil de ação diferenciada do composto LASSBio-1407 foi também confirmado na reversão das respostas de infiltração eosinofílica, secreção de citocinas, hiperreatividade e remodelamento das vias aéreas no modelo de asma induzida por HDM, em condições onde o composto de referência cilomilast mostrou eficácia comparativamente menor. Ambos LASSBio-1406 e LASSBio-1407 foram também mais potentes do que cilomilast e rolipram no bloqueio da ativação e resposta proliferativa de linfócitos e fibroblastos em sistemas *in vitro*. Por último, constatou-se que a administração oral de LASSBio-1406 e LASSBio-1407, diferentemente do observado com rolipram e cilomilast, não modificaram o tempo de sono induzido por quetamina e xilazina, realçando o menor potencial pró-emético dos compostos NAHs destacados. Tomados em conjunto, os resultados apontam os derivados LASSBio-1406 e o LASSBio-1407, como os mais promissores na série estudada de agentes *N*-metil-*N*-acilidrazônicos, inibidores de PDE4, pelo amplo perfil de ação sobre alterações patológicas cruciais associadas à asma, bem como pelo menor impacto sobre efeitos adversos pró-eméticos. Os compostos LASSBio-1406 e LASSBio-1407 são certamente, dentre os compostos testados, protótipos moleculares de forte potencial terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias pulmonares crônicas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

Pharmacological evaluation of novel orally active PDE4 inhibitors of the class of *N*-methyl-*N*-acylhydrazones for control of asthma.

SUZANA VANESSA SOARES CARDOZO

Inhibitors of phosphodiesterase type 4 (PDE4) act by increasing intracellular concentrations of cyclic AMP, which has a broad range of anti-inflammatory effects on various key effector cells involved in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In this study we have evaluated eight compounds of a new series PDE4 inhibitors, which belong to the class of *N*-methyl-*N*-acylhydrazones (NAHs), using experimental models of lung inflammation and remodeling order to identify potential new therapeutic agents for pulmonary inflammatory diseases. Local change in leukocyte levels, cytokines production, airway hyper-reactivity (AHR) and remodeling were examined in A/j mice challenged intranasally with LPS or allergen. All analyzes were performed 18 or 24 h after the last challenge. Primary Cultured lymph node cells and fibroblasts were also used to assess the effects of NAHs at the cellular level. Potential provoke emesis of the more promising compounds was investigated indirectly based on the test sleep time induced by mixture of ketamine and xylazine. NAHS derivative (100 $\mu\text{mol/kg}$, *v.o.*), except LASSBio-1393, markedly inhibited the AHR, leukocyte infiltration and cytokine production, in a comparable manner to that observed in rolipram and cilomilast. We found that NAHs derivatives were also active in the therapeutic blockade of ovalbumin-evoked allergic asthmatic response. In this model, only LASSBio-1406 and LASSBio-1407 were able to reverse all pathological changes, including eosinophilic infiltrate, peribronchial fibrosis and mucus exacerbation clearly refractory to treatment with the PDE4 inhibitor rolipram. The distinguished the action profile of LASSBio-1407 compound was also confirmed in the reversal of eosinophilic inflammation responses, cytokine secretion, hyperresponsiveness and airway remodeling in asthma model induced by HDM, in conditions where the reference compost cilomilast showed efficacy compared lower. Both LASSBio-1406 and LASSBio-1407 were also more potent than rolipram, and cilomilast in blocking the activation and proliferative response of lymphocytes and fibroblasts *in vitro* systems. Finally, it was found that oral administration of LASSBio-1406 and LASSBio-1407, different from that observed with rolipram and cilomilast, did not change the sleep time induced by ketamine and xylazine, highlighting the lowest pro-emetic potential of posted NAHs compounds. Taken together, the results indicate that LASSBio-1406 derivatives and the LASSBio-1407, as the most promising in the studied series of NAHs agents, PDE4 inhibitors, the broad profile of action on crucial pathological changes associated with asthma, as well as the smallest adverse impact on pro-emetic effects. LASSBio-1406 and LASSBio-1407 are certainly among the tested compounds, molecular prototype strong therapeutic potential in the treatment of chronic pulmonary inflammatory diseases.

I - Introdução

1.1 – Definição e aspectos epidemiológicos da Asma

A asma é uma doença complexa e heterogênea, caracterizada por inflamação pulmonar crônica e obstrução das vias aéreas inferiores (van den Berge, Ten Hacken et al. 2013). Com alto impacto social e econômico, a doença afeta indivíduos de ambos os sexos em todas as faixas etárias e pode ser fatal (Lloyd and Hessel 2010; Poon, Eidelman et al. 2012). Segundo a organização mundial de saúde (OMS), a asma atinge 300 milhões de pessoas no mundo, com maior prevalência nos países desenvolvidos, principalmente devido ao aumento da exposição a alérgenos, poluição e a uma estimulação reduzida do sistema imunológico durante os períodos críticos do desenvolvimento (WHO, FactSheet No 307, May 2011). Caracterizada como um importante problema de saúde pública em termos de prevalência, morbidade e mortalidade, estima-se que a asma afete uma em cada sete crianças e um em cada doze adultos em países ocidentais, sendo responsável por 20 milhões de faltas diárias ao trabalho e escola (Holgate, Arshad et al. 2010; Ribeiro-Filho, Calheiros et al. 2013; Gold, Montealegre et al. 2014).

Aproximadamente 40 milhões de pessoas com asma residem em países da América latina. No Brasil, os estudos epidemiológicos referentes à asma são poucos. Dados recentes do "International Study of Asthma and Allergies in Childhood" (ISAAC), publicados na "Global initiative for asthma" revelam que a prevalência da asma está aumentando em muitos países, principalmente em crianças, afetando aproximadamente 10 % das crianças de 13-14 anos no Brasil (Lai, Beasley et al. 2009; GINA 2014). A "World health organization global burden of disease study" estima que os gastos anuais devido à asma representem 1.8 % dos gastos totais com doenças no mundo, sendo responsável por 346.000 mortes por ano (GINA 2014; Gold, Montealegre et al. 2014).

A asma pode ser classificada em 3 categorias: controlada, parcialmente controlada e não-controlada (ou grave) de acordo com a frequência e intensidade de sintomas, principalmente dispneia, chiado, tosse seca e sensação de aperto torácico, junto com a limitação do fluxo de ar expiratório. Geralmente, esses sintomas e a limitação do fluxo de ar são reversíveis tanto espontaneamente quanto após a administração de medicamentos, ou simplesmente podem se ausentar por semanas ou meses (Kroegel 2009; GINA 2014).

1.2 - Imunopatologia da asma

A asma é uma doença multifatorial complexa, na qual a inflamação das vias aéreas inferiores e o remodelamento adverso pulmonar têm papel central. Essas alterações são causadas a partir de um contato inicial com alérgenos presentes no ambiente, que em indivíduos suscetíveis podem induzir uma resposta inflamatória local (Galli, Tsai et al. 2008; Holgate, Arshad et al. 2010; Holgate 2012).

Fatores genéticos e ambientais podem influenciar o epitélio das vias aéreas, incluindo sua permeabilidade a alérgenos, favorecendo o desenvolvimento da resposta inflamatória alérgica (Galli, Tsai et al. 2008). O epitélio das vias aéreas de indivíduos asmáticos apresenta um defeito intrínseco na formação das suas junções de oclusão, e assim na sua função como barreira física, facilitando a penetração de alérgenos inalados no tecido. Ademais, uma proporção dos alérgenos relacionados à asma apresenta propriedades biológicas intrínsecas que aumentam sua capacidade de penetrar a barreira epitelial e causar dano tecidual. Componentes alergênicos de ácaros, baratas, fungos e animais são proteolíticos e podem romper as junções de oclusão e ativar receptores de proteases. Além disso, estímulos ambientais como vírus e poluentes, incluindo fumaça de cigarro, também podem romper as junções ocludentes e comprometer a função de barreira do epitélio das vias aéreas (Galli, Tsai et al. 2008; Holgate 2012; Lambrecht and Hammad 2012).

Associada com o epitélio das vias aéreas está uma população de células especializadas apresentadoras de antígenos (APCs), denominadas células dendríticas (DCs). Essas células expressam receptores do sistema de imunidade inata e têm o potencial de captar os alérgenos, processá-los em peptídeos pequenos e apresentá-los via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) a receptores de células T $CD4^+$ virgens ($T_H0 CD4^+$) que fazem a identificação do alérgeno através de receptores de reconhecimento de células T (TCR). A apresentação do antígeno juntamente com sinais co-estimuladores, leva à diferenciação de células $T_H0 CD4^+$ em diferentes subpopulações, incluindo T_H1 , T_H2 , T_H17 ou células T_{Reg} , diferenciadas de acordo com o perfil de citocinas que produzem (Figura 1.1) (Cohn, Elias et al. 2004; Galli, Tsai et al. 2008; Holgate 2012).

A contribuição específica dos linfócitos T_H2 na asma tem sido documentada em larga escala, com dados experimentais em humanos e animais de experimentação, ao longo dos anos. Notadamente, evidências mostram uma correlação positiva entre número de linfócitos T_H2 presente nas vias aéreas e o grau de gravidade da asma

(Barrett and Austen 2009; Barnes 2011; Bosnjak, Stelzmueller et al. 2011). Os linfócitos T CD4⁺ do subtipo T_H2 são uns dos principais responsáveis por promover a resposta inflamatória alérgica, através da secreção de citocinas como interleucina (IL)-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Lloyd and Hessel 2010; Barnes 2011). Essas citocinas são cruciais no recrutamento e ativação de células efetoras relacionadas às respostas alérgicas, como eosinófilos e mastócitos. Por exemplo, a IL-5 regula a diferenciação, ativação e sobrevivência de eosinófilos. A IL-4 controla alguns eventos cruciais como a diferenciação da célula T_H2 e indução da mudança de classe de imunoglobulinas para o isotipo IgE, em linfócitos B. Além disso, a IL-4 e a IL-5 são responsáveis por aumentar a expressão de moléculas de adesão eosinófilo-endotélio, permitindo a migração de eosinófilos para o parênquima pulmonar. A IL-13 tem efeito pleiotrópico e atua em conjunto com a IL-4 em muitas de suas funções, além de ser um mediador crucial na hiper-responsividade das vias aéreas e no remodelamento tecidual (Lloyd and Hessel 2010; Lloyd and Saglani 2013).

A presença de IL-4 e IL-13 e a ligação de moléculas co-estimuladoras na superfície das células T_H2 levam à ativação de linfócitos B que produzem e secretam IgE específica para o alérgeno. Essa imunoglobulina secretada pode alcançar a corrente sanguínea e ligar-se a receptores Fc de alta afinidade (Fc RI) presentes na superfície de basófilos e mastócitos teciduais. Essas células ficam sensibilizadas pela ligação de IgE nos receptores Fc e estão preparadas para reagirem a uma posterior exposição ao alérgeno (Galli, Tsai et al. 2008) (Figura 1.1).

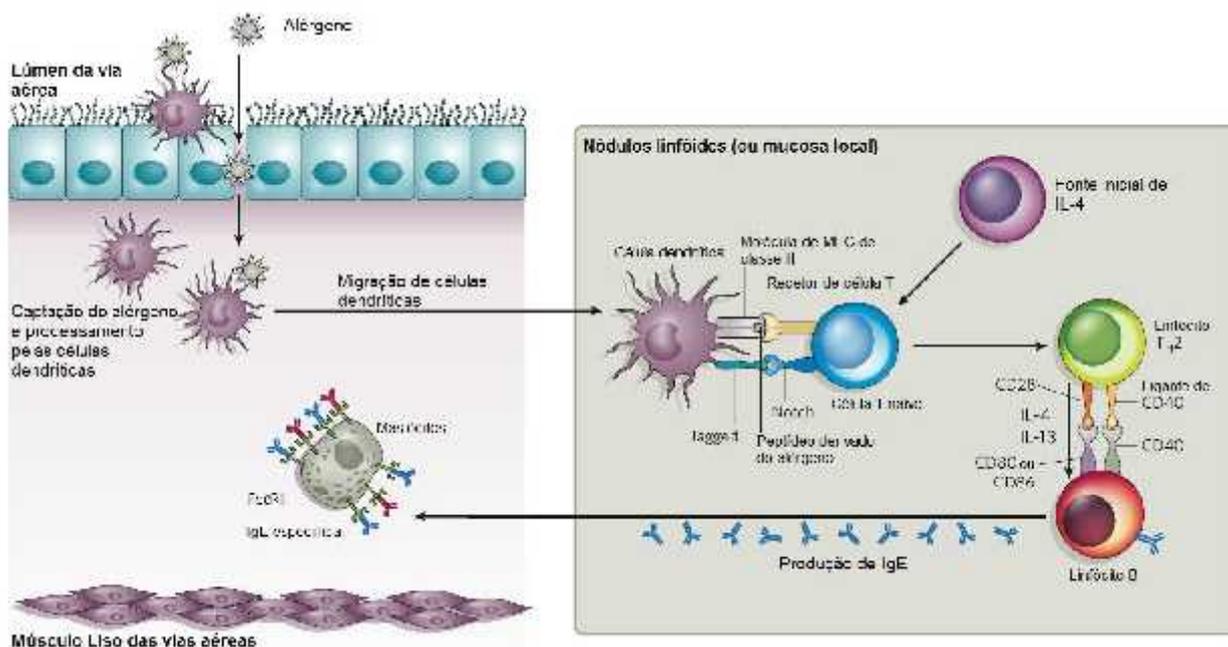


Figura 1.1. Reconhecimento do antígeno. O alérgeno é reconhecido pelas células dendríticas, que migram para os nódulos linfóides e promovem a ativação dos linfócitos T através da apresentação antigênica. Os linfócitos T ativados proliferam e produzem mediadores inflamatórios, incluindo IL-4 e IL-13. A presença dessas citocinas e a ligação de moléculas coestimuladoras promovem a mudança de classe de imunoglobulina para IgE específica para o antígeno nos linfócitos B. Adaptado de Galli et al. 2008, *Nature*.

A resposta asmática pode ser dividida em duas fases que se diferenciam pela ordem temporal e pela qualidade dos eventos. A reação de fase inicial consiste na resposta imediata (ocorre em segundos ou minutos) após a reexposição ao alérgeno, seguida pela reação de fase tardia, que reflete a influência de células inflamatórias. A constante exposição ao alérgeno acarreta uma contínua indução da resposta inflamatória, levando ao dano tecidual e consequências graves aos pacientes, como a cronificação da resposta inflamatória pulmonar (Galli, Tsai et al. 2008).

A reação da fase inicial ou imediata inicia-se quando um indivíduo sensibilizado entra em contato com o alérgeno. Os mastócitos teciduais e os basófilos sanguíneos são ativados pelo acoplamento do antígeno (ligação cruzada) às moléculas de IgE, ligadas nos receptores Fc RI na superfície da membrana celular (Holgate, Arshad et al. 2010; Holgate 2012). Essa ligação estimula a secreção de mediadores pré-formados e recém sintetizados, num processo denominado desgranulação. O conteúdo liberado durante a desgranulação é constituído principalmente por aminas biogênicas (como histamina), proteoglicanos (como

heparina e sulfato condroitina), serina proteases (como triptase e carboxipeptidase) e várias outras enzimas, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Figura 1.2)(Galli, Tsai et al. 2008).

A liberação de mediadores preformados e derivados de lipídios contribuem para os sinais e sintomas agudos associados à resposta alérgica inicial (Barnes 2011). As aminas biogênicas, como a histamina, se ligam a receptores específicos presentes em diferentes tipos celulares. No endotélio, a ligação de histamina provoca contração das células, levando ao extravasamento do plasma para os tecidos, além de estimular a produção de prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico que levam à vasodilatação local. Adicionalmente, a histamina promove contração da célula muscular lisa das vias aéreas. As proteases neutras de serina são importantes constituintes proteicos dos grânulos de mastócitos, contribuindo para o remodelamento tecidual e o recrutamento de células efectoras. Assim como a histamina, os mediadores derivados de lipídios, principalmente os leucotrienos, induzem vasodilatação, broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, aumento da secreção de muco e da expressão de moléculas de adesão (Galli, Tsai et al. 2008; Eisenbarth and Flavell 2009; Holgate 2012). Alguns dos mediadores liberados podem estimular os terminais periféricos dos nervos sensoriais nas vias aéreas e ocasionar tosse (Galli, Tsai et al. 2008)(Figura 1.2).

Os mastócitos ativados também liberam mediadores recém-sintetizados, incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, mas são liberados mais lentamente do que os mediadores pré-formados (Sismanopoulos, Delivanis et al. 2013). Esses mediadores estão associados ao recrutamento, ativação e proliferação de linfócitos, mastócitos e eosinófilos, além de influenciar a função de células estruturais, incluindo endotélio vascular, células epiteliais, fibroblastos, células musculares lisas e nervos sensoriais. A liberação lenta desses mediadores contribui para transição para reação de fase tardia (Figura 1.2) (Galli, Tsai et al. 2008).

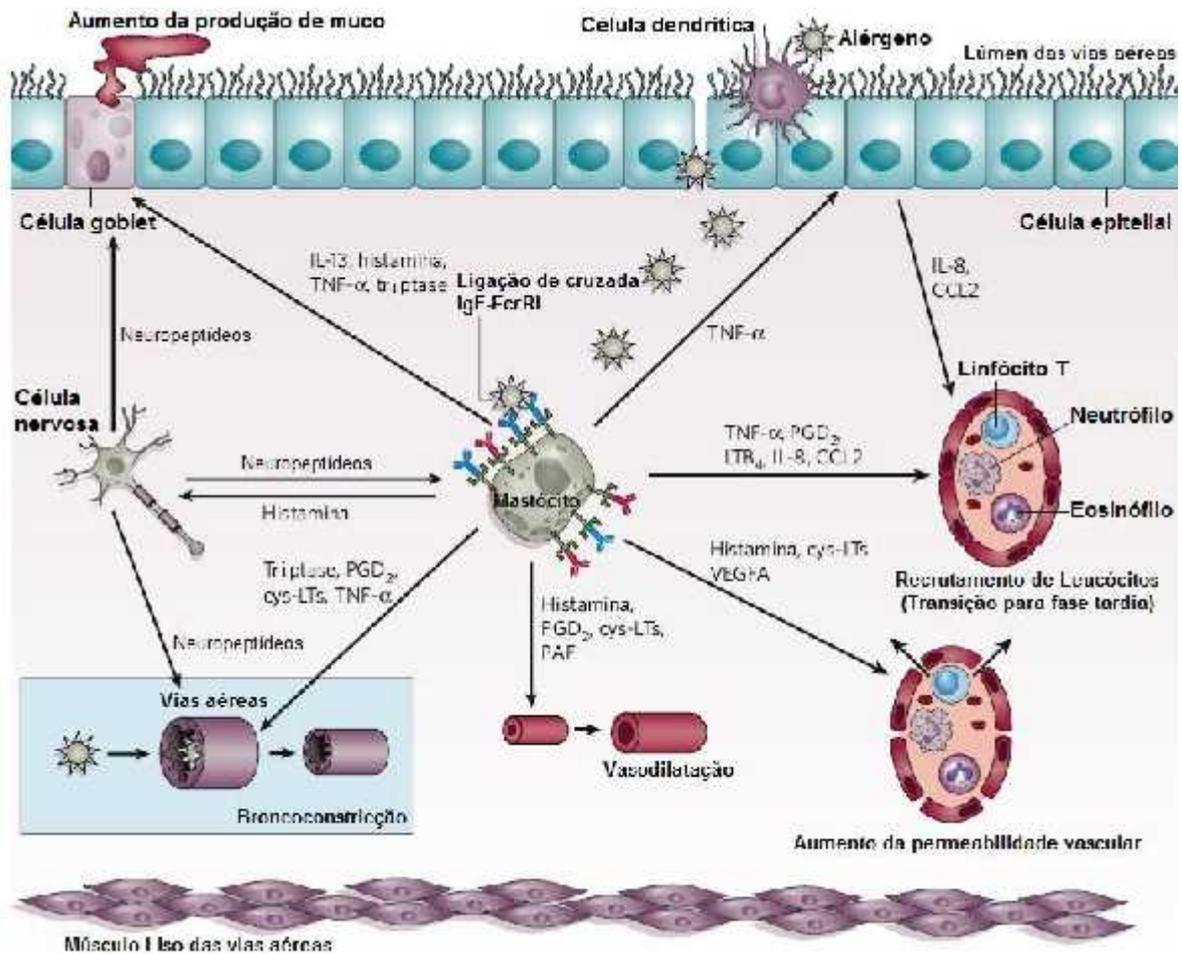


Figura 1.2. Reação de fase inicial (ou imediata). O reconhecimento do alérgeno pelas IgEs específicas ligadas aos receptores Fc RI dos mastócitos e basófilos promove a ativação dessas células que secretam mediadores preformados e derivados de lipídeos, e aumentam a síntese de inúmeras citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Os mediadores secretados rapidamente resultam em broncoconstrição, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e da produção de muco. A liberação lenta de mediadores contribui para a transição para a fase tardia, promovendo o influxo de leucócitos, através da regulação de moléculas de adesão e pela secreção de mediadores quimiotáticos (LTB₄ e PGD₂) e quimiocinas (IL-8 e CCL2). Adaptado de Galli et al. 2008, *Nature*.

A segunda fase da resposta asmática, denominada de reação de fase tardia, desenvolve-se 2 a 4 h após a exposição do alérgeno e perdura por várias horas. Essa reação parece ser coordenada tanto pelas consequências a longo prazo dos mediadores liberados pelos mastócitos ativados durante a reação de fase inicial

quanto pela estimulação antigênica dos linfócitos do subtipo T_h2. Os aspectos clínicos da reação de fase tardia refletem a ação de células efetoras recrutadas da circulação e a liberação de mediadores pelas células residentes, caracterizando um acúmulo de células inflamatórias no tecido pulmonar. Esse infiltrado inflamatório é constituído principalmente de linfócitos T_h2, mastócitos, eosinófilos, células dendríticas e macrófagos (Galli, Tsai et al. 2008).

Os eosinófilos são os principais constituintes do infiltrado inflamatório pulmonar em indivíduos com asma. A diferenciação terminal e a mobilização de eosinófilos na medula óssea são dirigidas pela IL-5 secretada durante reação de fase inicial e tardia. Eosinófilos ativados podem produzir e secretar mediadores lipídicos (como o leucotrieno C4 (LTC₄)), proteínas básicas, citocinas incluindo interferon (IFN)- γ , IL-4, IL-5, IL-13 e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de linfócitos T_h2, amplificando a resposta inflamatória alérgica (Cohn, Elias et al. 2004; Holgate 2012). Os eosinófilos também podem modular a resposta imune adaptativa e atuar como células apresentadoras de antígeno, agindo como amplificadores do processo inflamatório no sítio da inflamação (Barrett and Austen 2009) (Figura 1.3).

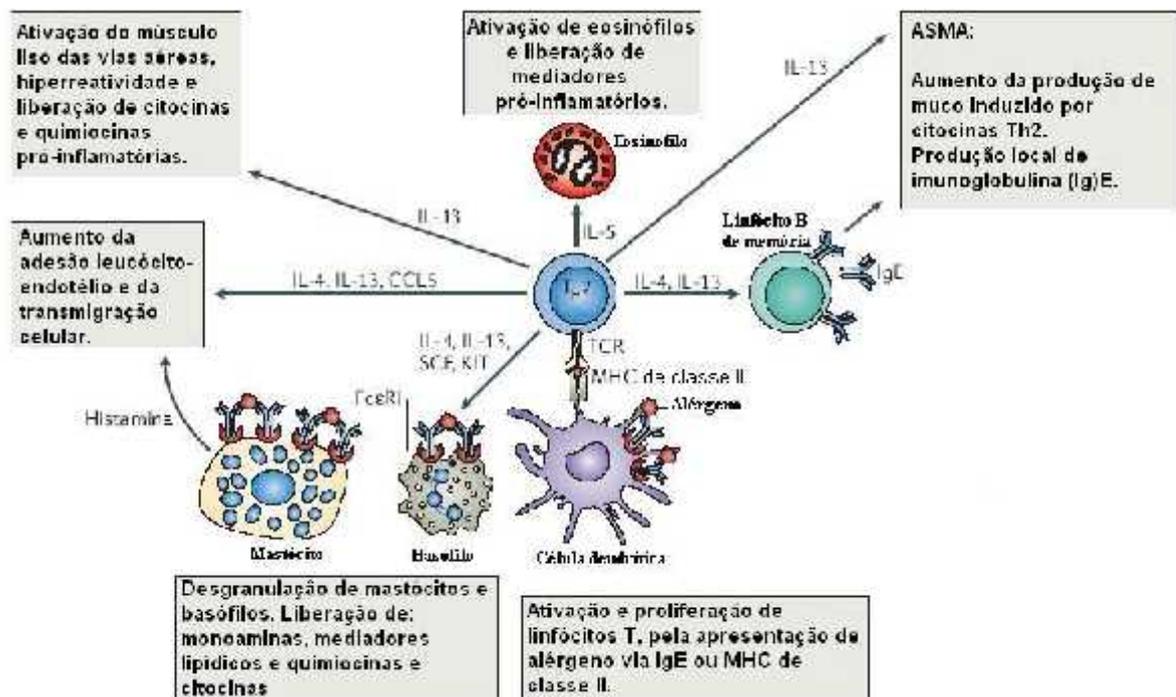


Figura 1.3. Reação de fase tardia da inflamação induzida por alérgeno. A reação de fase tardia reflete as ações de células imunes e inflamatórias e a secreção de mediadores pelas células residentes do tecido pulmonar. Os linfócitos T ativados pelas APCs secretam mediadores que culminam na ativação e migração de células inflamatórias para o tecido pulmonar, levando a amplificação da resposta inflamatória, com aumento da produção de muco, hiperreatividade e dano tecidual. Adaptado de Larché et al. 2006, *Nature Reviews Immunology*.

Modelos experimentais utilizando animais, nos quais citocinas de perfil T_H2 , como IL-4, IL-5 ou IL-13, são individualmente bloqueadas sugerem um importante papel das citocinas deste perfil na condução da inflamação eosinofílica, bem como no declínio da função pulmonar, sendo detectável em pelo menos 50 % dos indivíduos com asma (Lloyd and Hessel 2010; Lambrecht and Hammad 2012). Apesar da notória contribuição dos linfócitos T_H2 na asma (Figura 1.3), estudos revelam a descoberta de outros subtipos de células T, como linfócitos T_H17 , T_H9 e linfócitos T reguladores (T_{Reg}) que podem contribuir para o desenvolvimento da inflamação alérgica e para o entendimento da heterogeneidade da célula T na patogenia da asma (Lloyd and Hessel 2010). As células T_H17 são um subtipo distinto de linfócitos T $CD4^+$ efetores que produzem IL-17A, IL-17F e IL-22 e expressam o fator de transcrição do

receptor órfão relacionado ao ácido retinóico- gama e alfa (ROR- T e ROR , respectivamente). A diferenciação da célula T naiva em células T_H17 se dá na presença de IL-6 e do fator de transformação de crescimento (TGF)- , através da ativação de fatores de transcrição. A IL-17A é regulada positivamente no pulmão de pacientes com asma e, os níveis elevados IL-17 está correlacionado com a severidade da doença, particularmente em pacientes com neutrofilia, e na asma resistente a corticoide. Contudo, estudos de bloqueio *in vivo* revelaram um papel complexo da IL-17 na alergia pulmonar, sugerindo também um efeito regulatório da IL-17 na fase inicial da inflamação alérgica (Lloyd and Saglani 2013) (Figura 1.4).

A complexidade que envolve os subtipos de células T efetoras aumentou ainda mais com a descrição recente de uma discreta população de células T $CD4^+$ que secretam IL-9 e dependem do TGF- e IL-4 para o seu desenvolvimento. A diferenciação da célula T $CD4^+$ naiva em células T_H9 requer a expressão do fator de transcrição PU.1, e a secreção de IL-9 é regulada positivamente pela IL-25. Funcionalmente, as células T_H9 intensificam a resposta alérgica pelo recrutamento e ativação específica de mastócitos no tecido pulmonar (Lloyd and Hessel 2010; Lloyd and Saglani 2013) (Figura 1.4).

A função reduzida ou alterada das células T_{Reg} pode fornecer uma explicação plausível para uma resposta imune inadequada a alérgeno, observada em pacientes com asma. Vários subtipos de células T_{Reg} têm sido descritas e sua presença ameniza o desenvolvimento da inflamação e da hiper-reatividade das vias aéreas, além de prevenir a ativação de células dendríticas induzida por alérgeno. Os efeitos inibitórios das células T_{Reg} se devem principalmente pela produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), expressão de moléculas inibitórias (CTLA4 e PD-1) e indução da regulação negativa de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 nas APCs (Lloyd and Hessel 2010; Lloyd and Saglani 2013) (Figura 1.4). Outros subtipos de linfócitos T também podem estar envolvidos no desenvolvimento da asma alérgica e podem ser úteis no entendimento da heterogeneidade da doença(Lloyd and Hessel 2010).

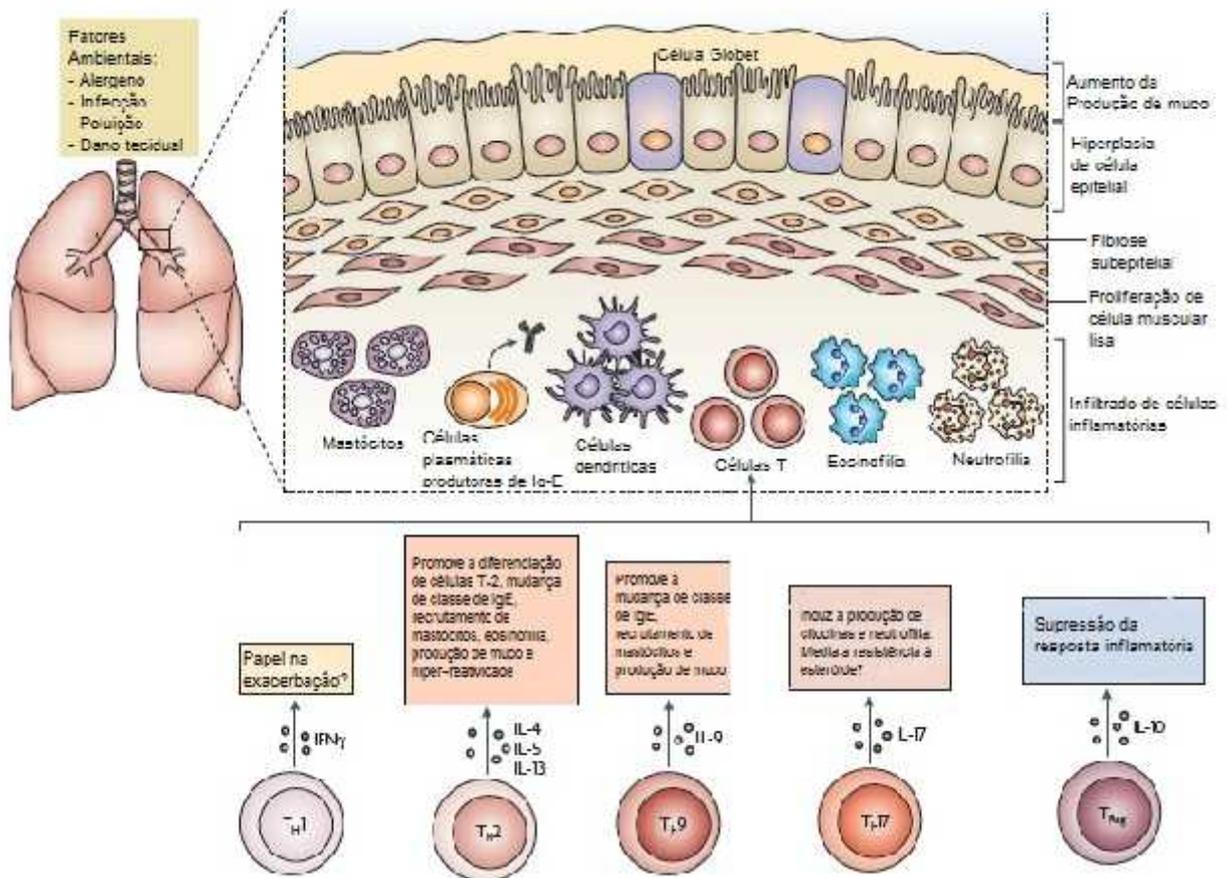


Figura 1.4. Heterogenicidade da célula T na resposta inflamatória alérgica. A asma é uma doença heterogênea caracterizada por hiperreatividade e remodelamento das vias aéreas, com aumento da produção de muco e fibrose subepitelial, e recrutamento de células inflamatórias para o tecido pulmonar. Algumas das células T que podem interferir na natureza e magnitude da resposta inflamatória alérgica através da secreção de citocinas e quimiocinas, recrutando e/ou ativando diversas células. A célula T_H2 promove o aumento da produção de muco e o recrutamento de eosinófilos e outras células. Já as células T_H1 e T_H17 estão associadas com a severidade do quadro asmático e na asma refratária ao esteróide, os quais são marcados pelo aumento do infiltrado neutrofílico. A célula T_{Reg} são capazes de regular negativamente a resposta imune e são importantes na homeostase da resposta imune no tecido pulmonar. A natureza e a magnitude da resposta inflamatória também é influenciada por estímulos ambientais, como exposição de alérgeno, poluição e outros. Adaptado de Lloyd e Hessel 2010, *Nature Reviews Immunology*.

A constante exposição ao alérgeno acarreta em persistência do quadro inflamatório, levando a alterações estruturais e funcionais nos órgãos afetados. Essas alterações acarretam em consequências patológicas graves nas vias aéreas de pacientes com asma e estão correlacionadas com o declínio da função pulmonar (Lukacs, Hogaboam et al. 2001; Galli, Tsai et al. 2008).

1.3 – Fisiopatologia da asma

Na asma, a inflamação crônica é frequentemente acompanhada de mudanças estruturais que podem envolver todas as camadas da parede das vias aéreas e tipicamente está associada com: aumento do número e tamanho de células caliciformes, aumento da produção de citocinas e quimiocinas pelas células epiteliais, a presença de áreas de injúria e reparo tecidual, inflamação substancial da submucosa, deposição de componentes de matriz extracelular levando à fibrose subepitelial; aumento no desenvolvimento de miofibroblastos e da vascularidade (angiogênese), e alterações nas células musculares lisas (Figura 1.5) (Lazaar and Panettieri 2004; Galli, Tsai et al. 2008; Pelaia, Vatrella et al. 2012). A parede das vias aéreas de pacientes asmáticos é infiltrada com eosinófilos e células mononucleares, principalmente linfócitos T CD4⁺. Os mastócitos, macrófagos e neutrófilos também estão aumentados em número no tecido pulmonar de pacientes asmáticos nesta etapa do processo. No lúmen das vias aéreas, o muco está misturado com células efetoras ativadas, incluindo macrófagos, linfócitos T_H2 e eosinófilos. Nos casos mais graves, ocorre também um aumento substancial no número de neutrófilos. Além disso, essas alterações estruturais acarretam no comprometimento da função de barreira (física) do epitélio das vias aéreas (Lukacs, Hogaboam et al. 2001; Cohn, Elias et al. 2004; Barnes 2011).

As alterações estruturais na parede das vias aéreas e no parênquima pulmonar, coletivamente referidas como remodelamento, parecem resultar da interação de mediadores inflamatórios com as células do estroma e células inflamatórias. Fatores locais, incluindo as células estruturais e a matriz extracelular, respondem à inflamação de forma característica e coordenada na tentativa de reparar o dano causado pela inflamação local. Ademais, o espessamento da membrana basal reticular, como resultado da fibrose subepitelial, acarreta numa redução no diâmetro do lúmen dessas vias (Cohn, Elias et al. 2004; Lloyd and Robinson 2007; Erle and Sheppard 2014).

Miofibroblastos derivados do mesênquima apresentam um fenótipo altamente proliferativo, contrátil e secretor e são normalmente responsáveis por reparar o tecido após a lesão. Na asma há um aumento substancial de miofibroblastos subepiteliais que está diretamente relacionado as alterações ocorridas na espessura da membrana basal reticular. Além das células inflamatórias, células do trato respiratório contribuem fortemente para o espessamento e obstrução das vias aéreas.

Destaca-se a hiperplasia e hipertrofia de glândulas mucosas e de células caliciformes que resultam na hipersecreção de muco, no estreitamento das vias aéreas que podem levar a sua oclusão total (Lloyd and Robinson 2007). Há também um espessamento da camada subendotelial como resultado da deposição de colágeno tipo I, II, V assim como fibronectina, laminina e tenascina. A matriz também apresenta um aumento de proteoglicanos, elastina e glicosaminoglicanos. Os miofibroblastos estão hiperplásicos igual às células musculares lisas que passam ocupar até três vezes a área que ocupam em indivíduos saudáveis. Além disso, ocorre dilatação dos vasos e angiogênese, aumento da permeabilidade vascular e edema na parede das vias aéreas (Cohn, Elias et al. 2004; Lloyd and Robinson 2007) (Figura 1.5).

O mecanismo de deposição de matriz extracelular parece estar relacionado a um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de matriz. A deposição de colágeno nos tecidos é controlada pelo balanço entre as metaloproteases de matriz (MMPs), responsáveis pela degradação de colágeno, e os inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs). Na asma, o aumento da expressão de TIMP-1 causa deposição de matriz extracelular e o espessamento da membrana basal pela inibição da degradação da matriz. A proporção entre MMP-9 e TIMP-1 em asmáticos está reduzida e se correlaciona com o grau de obstrução das vias aéreas. Além disso, o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) sintetizado por uma variedade de células, incluindo células epiteliais, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e fibroblastos, estimula a produção de matriz extracelular. Outras citocinas, incluindo a IL-13 são consideradas mediadores pró-fibróticos importantes na patogênese da asma (Cohn, Elias et al. 2004; Lloyd and Robinson 2007; Bai 2010).

O remodelamento tecidual e a inflamação resultam na hiper-responsividade e obstrução reversível das vias aéreas, que causam falta de ar e sibilância. A hiper-responsividade é definida como um aumento da resposta de broncoconstrição a estímulos não-específicos. Essa resposta pode ser avaliada em laboratório com testes de provocação brônquica utilizando diferentes estímulos, os quais resultam em diversas implicações clínicas. O mecanismo preciso que controla a hiper-responsividade brônquica não está bem esclarecido. Sabe-se que a magnitude da resposta está correlacionada com o nível de inflamação no tecido pulmonar. Outros fatores, incluindo a redução do diâmetro das vias aéreas, aumento na contratilidade de células musculares lisas, grau de injúria tecidual, disfunção na regulação neuronal, aumento na permeabilidade microvascular e mediadores inflamatórios, também estão envolvidos. Quando as vias aéreas estão estreitadas pelas mudanças

estruturais, com presença de muco e células inflamatórias no lúmen dessas vias, estímulos que aumentam a contração de células musculares resultam invariavelmente em obstrução parcial ou total das mesmas (Cohn, Elias et al. 2004) (Figura 1.5).

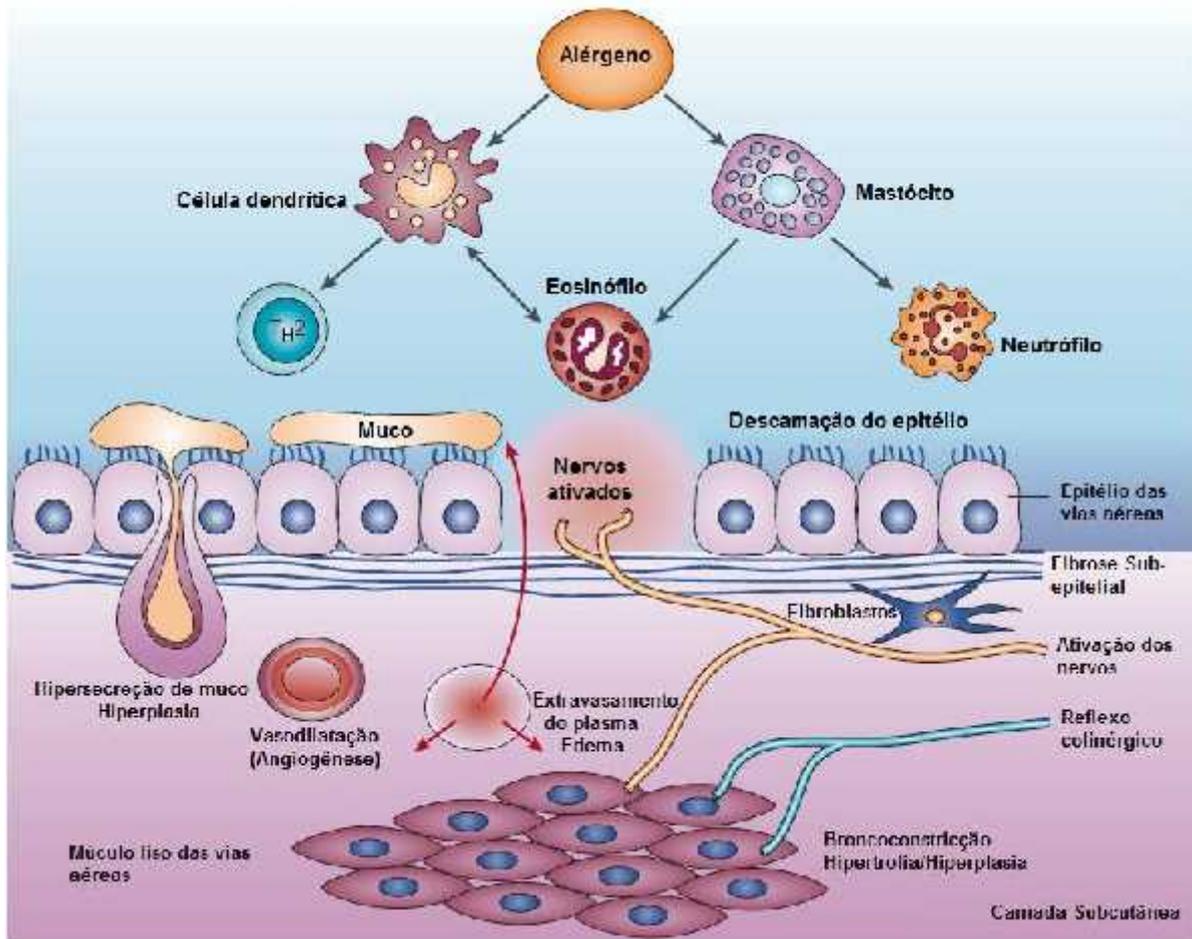


Figura 1.5. Fisiopatologia da asma. Recrutamento e ativação de células inflamatórias nas vias aéreas. A liberação de mediadores inflamatórios resulta em broncoconstrição, extravasamento do plasma, vasodilatação, hipersecreção de muco, ativação de nervos sensoriais, hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas e broncoconstrição induzida por reflexos colinérgicos. Além desses efeitos, ocorrem mudanças estruturais incluindo fibrose subepitelial, angiogênese, aumento do número de células produtoras de muco, e espessamento da camada de células musculares lisas das vias aéreas. Adaptado de Barnes 2004, *Nature reviews drug discovery*.

1.4 - Estratégias terapêuticas na asma

A asma é uma doença altamente heterogênea, o que constitui um desafio adicional para o desenvolvimento de novas terapias. Essa heterogeneidade deve-se à combinação de fatores ambientais e genéticos e manifesta-se em muitos níveis incluindo na etiologia, patogênese, prognóstico, e na resposta ao tratamento (Rolph, Sisavanh et al. 2006).

Durante as últimas décadas, o tratamento mais utilizado no controle da asma consiste na combinação de duas classes terapêuticas, os anti-inflamatórios esteroidais (ex: budesonida, fluticasona) e os agonistas β_2 -adrenérgicos (ex: salmeterol e sabultamol). Os glicocorticoides suprimem a inflamação e os agonistas β_2 -adrenérgicos impendem a broncoconstrição, prevenindo e evitando a exacerbação dos sintomas da asma na maioria dos pacientes (Rolph, Sisavanh et al. 2006). Embora a terapia com agentes glicocorticoides, em geral, apresente êxito no controle dos sintomas da asma, em pacientes com sintomas persistentes e recorrentes exacerbações, doses altas são requeridas o que ocasiona graves efeitos colaterais sistêmicos. Além disso, aproximadamente 5-10% dos indivíduos asmático permanecem sintomáticos e refratários ao tratamento, apontando para a inequívoca necessidade de novas alternativas terapêuticas. Outros fármacos eficazes no tratamento da asma, incluem os inibidores de fosfodiesterase (PDE) e os antagonistas de leucotrienos (Rolph, Sisavanh et al. 2006; Currie, Alluri et al. 2007; Cortijo, Iranzo et al. 2009). Além disso, recentes avanços no entendimento da imunopatologia da asma sugerem que terapias biológicas focadas no bloqueio de citocinas podem ser potencialmente úteis no controle da asma (Pelaia, Vatrella et al. 2012). A terapia fundamentalmente deve focalizar de forma especial a redução da inflamação e do remodelamento tecidual, protegendo os pacientes contra a perda progressiva da função pulmonar.

1.4.1 – Anti-inflamatórios esteroidais

Os glicocorticoides suprimem a inflamação das vias aéreas através da inibição da expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, levando à redução do recrutamento, maturação e ativação de células efetoras importantes na patogênese da asma (Barnes 2006). Os benefícios do tratamento com glicocorticoides inalados incluem a redução da obstrução das vias aéreas, das exacerbações da asma e da

necessidade de internação, melhorando a qualidade de vida de grande maioria dos asmáticos (Adcock and Barnes 2008).

Os glicocorticoides livres difundem-se através da membrana celular e se ligam a receptores citoplasmáticos, denominados receptor de glicocorticoides (GR). Essa interação resulta na ativação do receptor e sua subsequente translocação para o núcleo, onde a atividade transcricional de genes alvos é modulada por vários mecanismos, de maneira a estimular (transativação) e reprimir (transrepressão) a expressão gênica. Na transativação, o complexo receptor-glicocorticoide ativado forma um dímero e liga-se ao elemento de resposta ao glicocorticoide (GRE) na região promotora dos genes sensíveis ao esteroide, levando a transcrição dos genes responsáveis pela codificação de mediadores anti-inflamatórios, assim como anexina-1, mitógeno proteína quinase ativada fosfatase-1 (MKP-1) e do inibidor do fator nuclear- B (I B). Já na transrepressão, o homodímero receptor-glicocorticoide ativado interage com moléculas coativadoras que apresentam atividade histona acetiltransferase (HAT) intrínseca, as quais são ativadas por fatores transcricionais pró-inflamatórios (como AP-1 e NF- B), impedindo sua ativação e promovendo a inibição da expressão dos genes inflamatórios, ativados por estes fatores (Barnes 1998). A acetilação das histonas permite o desenrolar regiões específicas do DNA, que se encontram enoveladas em proteínas especiais histonas, liberando o acesso para a ação de fatores de transcrição a região promotora do DNA. A acetilação é regulada por um balanço entre a atividade das HATs e histona desacetilase (HDAC). Contudo, os glicocorticoides suprimem a inflamação principalmente pelo recrutamento da HDAC2 para múltiplos genes inflamatórios ativados, as quais levam a desacetilação de genes e sua subsequente repressão gênica (Barnes 2006). Ademais, os glicocorticoides podem exercer efeitos diretos sobre as células inflamatórias incluindo eosinófilos, linfócitos T e mastócitos. Nos eosinófilos, os esteroides inibem a liberação de mediadores, a ação permissiva de citocinas (como IL-5) sobre a sobrevivência, contribuindo para redução da eosinofília das vias aéreas. Os esteroides inibem a ativação dos linfócitos T e bloqueiam a liberação de citocinas, as quais são importantes no recrutamento e sobrevivência de células inflamatórias envolvidas na patogênese da asma. Nos mastócitos, os esteroides não parecem ter um efeito direto sobre a desgranulação mastocitária, mas há evidências de que a exposição reduza o número de mastócito na mucosa (Barnes 1998).

Os glicocorticoides inalados revolucionaram o tratamento da asma. Os principais fármacos utilizados na clínica são a budesonida e o propionato de

fluticasona. Contudo esses fármacos podem ser absorvidos no pulmão ou na mucosa nasal, em doses altas, podem exercer também alguns efeitos sistêmicos. Na asma grave o uso de glicocorticoides inalados precisa muitas vezes do reforço do tratamento com a administração também por via oral, o que aumenta os riscos de efeitos adversos (Barnes 2011; Barnes 2013). Em crianças, os efeitos sistêmicos podem resultar em inibição do crescimento. Nas mulheres asmáticas, tratadas com esteroides inalados, ocorrem reduções significativas de densidade mineral óssea, mesmo em pequenas doses. Ademais, os efeitos benéficos dos glicocorticoides são frequentemente limitados pelos efeitos colaterais graves incluindo osteoporose, hiperglicemia, hipertensão, glaucoma, aumento do risco de infecções e supressão da adrenal (Barnes 2002; Barnes 2013). Além dos efeitos sistêmicos associados ao tratamento a longo prazo, alguns pacientes asmáticos não respondem ao tratamento com glicocorticoides sistêmicos e inalados, independente da dose e do período de tratamento (Chu and Drazen 2005).

A resistência aos efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores dos glicocorticoides, em pacientes com asma grave, pode estar relacionada a alterações diversas e até o momento não foram completamente compreendidas. Uma das evidências é a redução da translocação nuclear de GR- após ligação ao glicocorticoide. Outros mecanismos podem induzir resistência aos efeitos dos glicocorticoides, como a redução do número de GR- , da afinidade de ligação do esteroide ao GR- , da habilidade de GR ligar-se ao DNA, como também o aumento da expressão de fatores transcricionais pró-inflamatórios, os quais competem pela ligação no DNA, da expressão de GR- (inibidor dominante negativo do GR-) e redução na expressão e atividade de HDAC2 (Barnes 2013). A redução de C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) nas células musculares lisas de asmáticos graves é responsável pela perda da função de GR, e subsequente incapacidade do esteroide de inibir a proliferação dessas células e induzir a formação de mediadores anti-inflamatórios (Matthews, Ito et al. 2004; Barnes 2006). Além disso, fatores como o antagonismo do receptor GR, o microambiente de citocinas e a ação de hormônios também podem contribuir para a resistência ao glicocorticoides. Sabe-se, por exemplo, que o neuropeptídeo pró-inflamatório prolactina, produzido por células mononucleares, pode atuar como antagonista endógeno do glicocorticoide reduzindo sua eficácia. Citocinas como o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) contrapõe os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos glicocorticoides. Ademais, acredita-se que a insensibilidade aos corticoides em pacientes com asma

grave possa ser mediada pelos níveis persistentemente elevados das citocinas IL-2, IL-4 e IL-13. A adição *in vitro* destas citocinas reduz a inibição da proliferação de linfócito T induzida por dexametasona, o que parece associado à capacidade dessas citocinas reduzirem a afinidade do esteroide ao receptor GR- . De fato, um dos mecanismos melhor descrito de resistência envolve a participação da enzima p38 MAP quinase (p38 MAPK), ativada pelas proteínas descritas acima, promovendo a fosforilação do receptor GR- via p-38 MAPK. O entendimento de toda a base molecular de resistência ao glicocorticoide em pacientes com asma grave pode contribuir para o desenvolvimento racional de novas abordagens terapêuticas (Barnes 1998; Marwick, Ito et al. 2007; Adcock, Marwick et al. 2010; Yim and Koumbourlis 2012).

1.4.2 – Agonistas 2-adrenérgicos

Os agonistas 2 atuam como broncodilatadores que ativam diretamente os receptores 2 nas células musculares lisas das vias aéreas. A função dos receptores no pulmão é regulada por vários mecanismos que afetam o controle do tônus da musculatura lisa peribrônquica e outras importantes respostas da asma. Esses fármacos são antagonistas funcionais e podem prevenir e reverter os efeitos de substâncias broncoconstrictoras diversas, incluindo leucotrieno (LT) D₄, acetilcolina, bradicinina, prostaglandinas (PG), histamina e endotelinas (Moore, Calder et al. 2003).

Os receptores 2 são amplamente distribuídos nas vias aéreas e estão presentes em diversos tipos celulares que participam da patogênese da asma (Barnes 2011). Após a ligação desses agonistas ao adrenoreceptor 2, a adenilato ciclase é estimulada pela subunidade da proteína G_s, e converte a adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3,5'-monofosfato cíclica (AMPC), a qual ativa a proteína kinase A (PKA). Essa enzima promove o relaxamento do músculo liso através da fosforilação da cadeia leve da miosina e pela abertura de canais de cálcio (Ca²⁺) dependente de potássio (K⁺), aliviando a broncoconstrição na asma (Holgate and Polosa 2008). Além disso, os agonistas 2 inibem a neurotransmissão colinérgica nas vias aéreas humanas, reduzindo a broncoconstrição induzida por essa via. Alguns estudos também demonstraram que os agonistas 2-adrenérgicos aumentam a condutância de canais de K⁺ das vias aéreas, provocando hiperpolarização e relaxamento da membrana. Em parte, isso ocorre por mecanismos independentes da

atividade da adenilato ciclase e da produção subsequente de AMPc (Moore, Calder et al. 2003; Holgate and Polosa 2008; Barnes 2011).

Os agonistas β_2 , com poucas exceções, são administrados diretamente nas vias aéreas por inalação e podem ser classificados em agentes de ação curta ou longa. Os agonistas de curta duração (≤ 4 h), incluindo albuterol e o levalbuterol, são usados para o alívio sintomático da asma, enquanto os agonistas de longa duração (> 12 h), incluindo salmeterol são usados profilaticamente no controle da doença, diminuindo a frequência e o número de exacerbações (Barnes 2004).

Os agonistas β_2 são até hoje os broncodilatadores mais eficazes no tratamento da asma e exercem pouco ou nenhum efeito sobre o processo inflamatório. Alguns estudos relatam que a estimulação desses receptores inibe a função de células inflamatórias, incluindo mastócitos, eosinófilos e linfócitos. Como dito, a estimulação dos receptores β_2 -adrenérgicos provoca elevação do AMPc, o que desencadeia uma série de reações que levam à inibição da liberação de mediadores inflamatórios importantes na patogênese da asma. No entanto, o tratamento crônico com um agonista β_2 frequentemente leva à dessensibilização do receptor e à redução dos seus efeitos. A velocidade e o grau de dessensibilização desses receptores dependem do tipo celular. Por exemplo, os receptores β_2 das células musculares lisas das vias aéreas são relativamente resistentes a dessensibilização, enquanto os receptores de mastócitos, linfócitos e eosinófilos são rapidamente dessensibilizados após a exposição de um agonista (Moore, Calder et al. 2003; Kandeel, Balaha et al. 2013). Isso pode explicar porque existem poucas evidências de que esses fármacos sejam eficazes em inibir a inflamação das vias aéreas associada com a asma. É importante ressaltar que vários estudos realizados recomendam que o tratamento da asma com um agonista do receptor β_2 -adrenérgico deve ser sempre acompanhado do uso de anti-inflamatórios (GINA 2014).

Os agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos são a terapia de escolha para o controle da broncoconstrição na asma. Contudo, sua utilização é limitada pelos efeitos adversos e pela dificuldade de adequação ao tratamento apresentada por alguns pacientes. Os efeitos adversos estão associados a doses altas dos agonistas β_2 -adrenérgicos, seja por via oral ou inalatória. Os efeitos mais frequentes são tremores, câimbras musculares, taquicardias e distúrbios metabólicos (Lipworth 2007).

1.4.3 – Antagonistas do receptor de cisteinil leucotrienos (CysLT)

Os CysLTs são potentes broncoconstritores das vias aéreas, e induzem o extravasamento de plasma. Há evidências, que os CysLTs podem promover a inflamação eosinofílica e aumentar a secreção de muco. Os antagonistas dos receptores de CysLT1, montelukast, pranlukast e zafirlukast, bem como o inibidor da síntese de leucotrienos, zileuton são medicamentos eficazes no controle da broncoconstrição. Estudos clínicos demonstraram que esses fármacos melhoram os sintomas da asma, função pulmonar e reduzem a necessidade de recorrer ao uso de broncodilatadores (Lynch, O'Neill et al. 1999; Currie, Alluri et al. 2007; Genovese, Rossi et al. 2008). A principal vantagem desses fármacos é que eles são eficazes por via oral e não apresentam efeitos adversos sérios (Lazaar and Panettieri 2004).

1.4.4 – Inibidores de fosfodiesterase (PDE) 4

As fosfodiesterases (PDEs) são um grupo de 11 superfamílias de metalofosfohidrolases estruturalmente relacionadas, mas funcionalmente distintas (PDE1 à PDE11), que estão envolvidas na degradação dos nucleotídeos cíclicos purinérgicos (AMPC e GMPc) (Houslay and Baillie 2005). A diversidade molecular das PDEs está associada à regulação específica e funcionalmente importante de processos fisiológicos e patológicos, e tem estimulado a indústria farmacêutica a desenvolver inibidores para 9 das 11 famílias de PDEs (Lazaar and Panettieri 2004; Maurice, Ke et al. 2014).

A fosfodiesterase (PDE) do tipo 4 é a isoforma predominante nas células estruturais, inflamatórias e imunes envolvidas na fisiopatologia da asma. A PDE4 constitui um grupo de enzimas farmacologicamente distintas codificadas por, pelo menos, quatro genes (PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D), os quais apresentam especificidade pelo AMPC (Fan Chung 2006). A importância do AMPC é evidenciada pela multiplicidade de PDEs, codificadas pelo genoma humano, que o hidrolisam, e sua extrema conservação entre espécies durante as pressões evolutivas (Houslay and Baillie 2005). A PDE4 é encontrada em diversos tipos de células e tecidos, incluindo leucócitos, músculo liso das vias aéreas e vasculares, endotélio e cérebro. O envolvimento da PDE4 em processos patológicos associados com esses tecidos sugere um potencial ponto de intervenção farmacológica em diversas desordens inflamatórias, vasculares, angiogênicas e neurológicas (Houslay and Baillie 2005).

Através da modulação dos níveis de AMPc, a PDE4 regula a resposta de leucócitos incluindo ações pró-inflamatórias de monócitos, células T, eosinófilos e mastócitos. Além de regular a contração do músculo liso das vias aéreas e vasculares, e a sinalização de neurotransmissores (como N-metil-D-aspartato – NMDA). Estudos mostram que células de pacientes atópicos apresentam um aumento na expressão de PDE4 (Barnes 2004). Deste modo, a família das fosfodiesterases do tipo 4 tem atraído considerável interesse nas últimas décadas como alvo no tratamento da asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Figura 1.6).

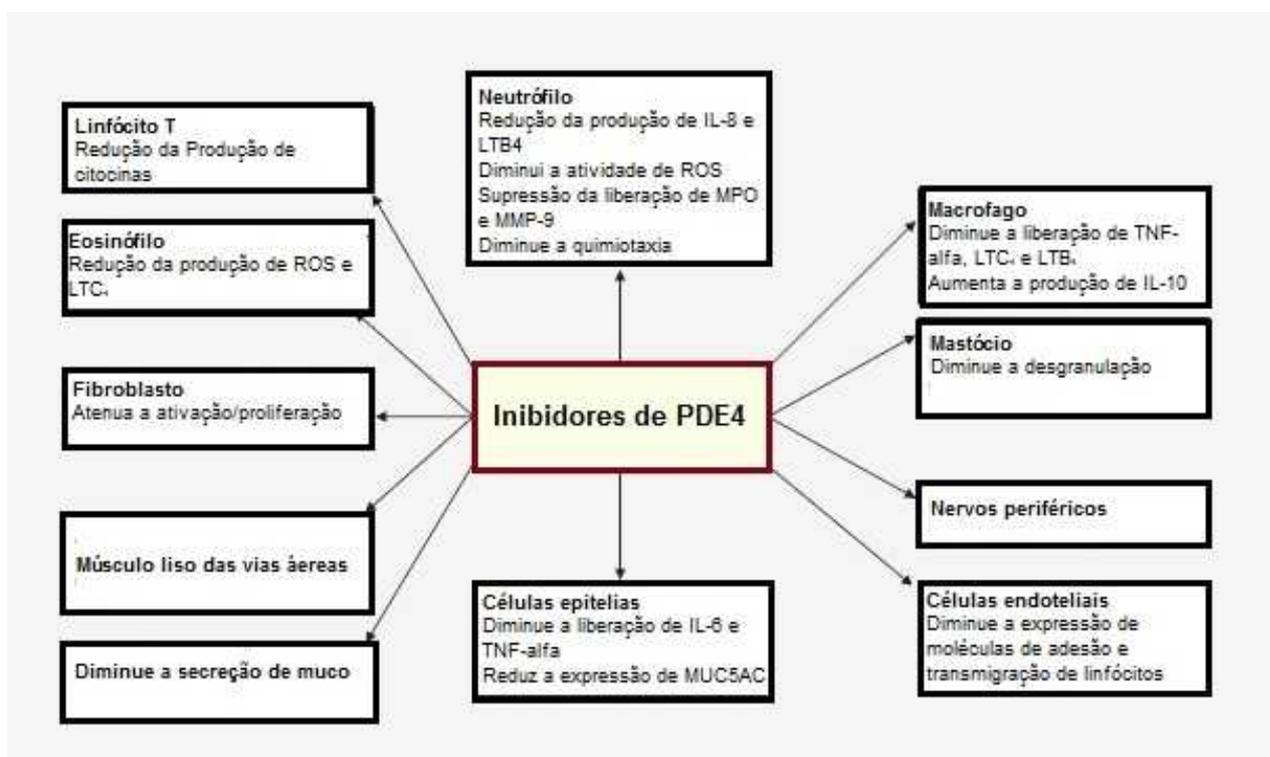


Figura 1.6. Amplo espectro de efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores dos inibidores de PDE4 na asma. Esses inibidores suprimem o recrutamento e ativação de células inflamatórias, e a hiperplasia e hipertrofia de células estruturais, aspectos cruciais na fisiopatologia da asma. Adaptado de Currie et al. 2008, *British Journal Clinical Pharmacology*.

A teofilina é um inibidor não seletivo da PDE, utilizado no tratamento da asma e da DPOC por mais de 70 anos. A inibição indiscriminada de enzimas PDEs leva ao aumento dos níveis de AMPc e guanosina monofosfato cíclica (GMPc) em vários órgãos e tecidos incluindo: pulmão, rins, cérebro, coração, pâncreas e fígado, resultando em uma gama de efeitos adversos. Apesar das limitações, o uso da teofilina é recomendado para pacientes com asma grave (não-controlada ou resistente a corticoide) e DPOC (Currie, Butler et al. 2008; Barnes 2010) (Figura 1.7).

Vários projetos de desenvolvimento de inibidores de PDE4 estão sendo implementados por grandes laboratórios de pesquisa no mundo, visando o tratamento de doenças respiratórias incluindo asma, baseados em achados que indicam efeitos marcados sobre características cruciais da doença, tais como inibição do recrutamento e ativação de células inflamatórias, além de benefícios sobre a função pulmonar em resposta a estímulos variados (Houslay, Baillie et al. 2007; Lynch, Baillie et al. 2007; Hoymann, Wollin et al. 2009).

O desenvolvimento do rolipram forneceu um novo paradigma para os inibidores seletivos da PDE4. Muitos compostos foram subsequentemente desenvolvidos, e a família de inibidores dialcoxifenil (catecol) aumentou e tem sido amplamente estudada ao longo dos anos. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o rolipram e outros inibidores de PDE4 inibem a resposta induzida por alérgeno na asma, reduzindo as exacerbações e melhorando a função pulmonar (Houslay and Baillie 2005; Currie, Butler et al. 2008). Bousquet e cols mostraram que o tratamento com 500 µg do inibidor de PDE4 roflumilast por via oral, uma vez ao dia foi comparável a inalação de 400 µg do glicocorticoide beclometasona três vezes ao dia, melhorando a função pulmonar e os sintomas em pacientes com asma persistente. Portanto, os inibidores de PDE4 podem fornecer, no tratamento da asma, um simplificado e eficiente regime terapêutico quando comparado aos glicocorticoides inalados (Bousquet, Aubier et al. 2006).



Figura 1.7. A PDE é encontrada em uma variedade de células e tecidos do corpo. A teofilina inibe de forma não-específica a PDE. Enquanto que o cilomilast/roflumilast/rolipram inibe de forma específica a PDE4. Adaptado de Barnes 2010, *Trends Pharmacology Science*.

Contudo, o potencial terapêutico dos inibidores de PDE4 tem sido limitado pelos efeitos adversos de náuseas e vômitos, observados em humanos e em várias espécies de animais após a administração de compostos estruturalmente diversos. O principal desafio no desenvolvimento de nova geração de inibidores da PDE4 é melhorar o índice terapêutico dessa classe de compostos. O entendimento da farmacologia básica dos inibidores de PDE4 é extremamente importante para se avaliar de que forma os efeitos adversos dessa classe de agentes podem ser evitados (Fan Chung 2006; Maurice, Ke et al. 2014).

A subunidade catalítica das 4 subfamílias da PDE4 pode adotar dois estados conformacionais distintos. Esses dois estados conformacionais, nos quais o inibidor específico rolipram apresenta alta e baixa afinidade, foram inicialmente investigados. Hirose e cols sugeriram que a ocupação do sítio de ligação de alta afinidade do rolipram no sistema nervoso central seria responsável, pelo menos em parte, pelos efeitos eméticos dos inibidores de PDE4 (Hirose, Manabe et al. 2007). No entanto, alguns autores ressaltam o papel dos subtipos de PDE4. Camundongos deficientes de

PDE4D apresentam redução do tempo de anestesia induzida por ketamina e xilazina (comportamento correlacionado com os efeitos eméticos em roedores) em comparação com os animais controles, o que não acontece com camundongos deficientes de PDE4B, principal subtipo associado aos efeitos anti-inflamatórios. Além disso, a atividade no tronco cerebral sensível ao rolipram reduziu em camundongos deficientes de PDE4D. Isto sugere que os efeitos adversos desses inibidores estejam associados à inibição do subtipo de PDE4D no sistema nervoso central (Hirose, Manabe et al. 2007; Kodimuthali, Jabarisi et al. 2008). Dentre as estratégias a serem estudadas para viabilizar o uso clínico desses compostos e reduzir efeitos colaterais estão o tratamento através da via inalatória, e/ou o desenvolvimento de inibidores não-eméticos de PDE4 pela inibição seletiva da PDE4B (Houslay, Baillie et al. 2007; Lynch, Baillie et al. 2007; Hoymann, Wollin et al. 2009). Neste contexto, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®-UFRJ), principal parceiro no desenvolvimento desta tese, tem acumulado grande experiência na identificação e compreensão das razões moleculares de novos protótipos anti-inflamatórios, especialmente aqueles que apresentam padrão estrutural *N*-acilidrazônico (Fraga and Barreiro 2006) e sulfonamídico (Lima, Ormelli et al. 1999).

1.5 – Derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos (NAHs)

A função *N*-acilidrazona tem sido descrita como grupamento farmacofórico de muitos protótipos com propriedades anti-inflamatórias (Tributino, Duarte et al. 2009), analgésicas (Lima, Lima et al. 2000), cardioativas (Silva, Zapata-Sudo et al. 2005) e tripanomicidas (Romeiro, Aguirre et al. 2009), dentre outras. Sua importância e aparecimento recorrente em substâncias bioativas de diferentes classes terapêuticas têm indicado o caráter “privilegiado” da função *N*-acilidrazona (Duarte, Barreiro et al. 2007), cuja adequada modulação dos substituintes em posições específicas favorece a interação seletiva com o biorreceptor-alvo. O perfil antiinflamatório evidenciado para vários derivados *N*-acilidrazônicos funcionados estimulou a construção de uma nova família combinatória racional de 8 compostos dessa classe, gerados com foco na *N*-metilação regioseletiva do *N*-sp³ da função amida dessa subunidade estrutural. A *N*-metilação dessa nova família planejados a partir de conhecidos inibidores da PDE4, como a zardaverina (Figura 1.8), resultou na inibição dessa enzima em faixas sub-micromolar (Tabela 1.1), principalmente

devido às mudanças conformacionais induzidas pelo grupo metila, permitindo uma melhor interação da carbonila com os metais do sítio catalítico, requisito essencial à atividade inibitória (Figura 1.9)(Kummerle, Schmitt et al. 2012).

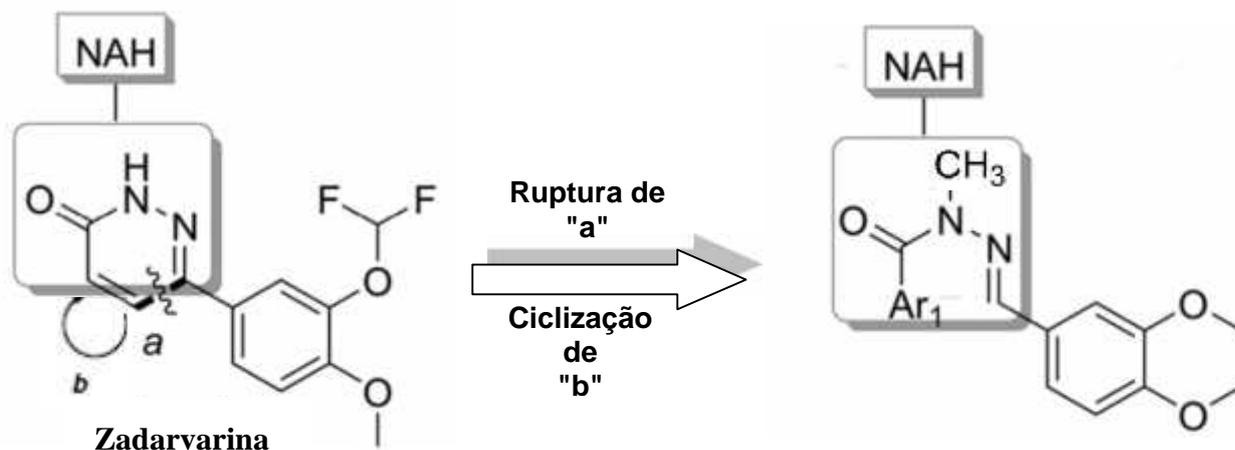


Figura 1.8. Planejamento estrutural de novos derivados *N*-metil-*N*-acilhidrazônicos 3,4-dimetoxifenila.

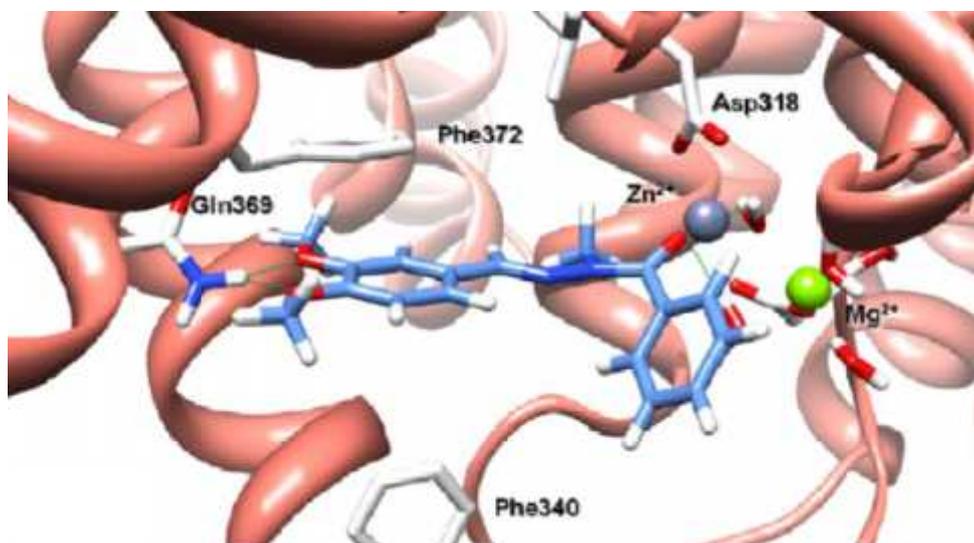


Figura 1.9. Interação do LASSBio-1359 com a PDE4. Ancoramento molecular das *N*-metil-*N*-acilhidrazonas sobre a PDE4 indicaram a importância do grupo metila para a atividade inibitória. Estudo de ancoramento foi realizado através do programa FlexX.

A capacidade dos derivados NAHs de inibir a PDE4 foi avaliada previamente em colaboração com a Dra. Claire Lugnier da Université Louis Pasteur, utilizando a enzima purificada a partir de aorta bovina (Lugnier, Schoeffter et al. 1986), no âmbito de um acordo de cooperação internacional do programa CAPES/COFECUB. Os compostos foram avaliados a uma concentração inicial de 10 μ M e os resultados foram determinados de acordo com o percentual de inibição da hidrólise do substrato natural AMPc (Tabela 1.1)(Lugnier, Schoeffter et al. 1986; Kummerle, Schmitt et al. 2012). Os efeitos anti-inflamatórios dos NAHs também foram avaliados previamente *in vitro*, pelo mesmo grupo, através do efeito desses derivados sobre a supressão da liberação do Fator de Necrose Tumoral alfa(TNF- α) induzida por LPS em células mononucleares, obtidas do sangue periférico de indivíduos saudáveis. Esses derivados também demonstraram forte inibição da liberação de TNF- α , com valores de IC₅₀ que variam 0,52 - 1,75 μ M (Tabela 1.1)(Kummerle, Schmitt et al. 2012).

Tabela 1.1. Inibição da atividade da enzima PDE4 e da liberação de TNF- α .

Compostos	PDE4		TNF- α	
	% inibição ^a	IC ₅₀ ^b (nM)	% inibição ^c	EC ₅₀ ^b (μ M)
Rolipram	----	800	0.13	----
LASSBio-1359	97.1	140	91	1.8 \pm 0.82
LASSBio-1366	95.8	300	92	1.2 \pm 0.10
LASSBio-1372	96.3	110	90	0.5 \pm 0.04
LASSBio-1379	97.0	150	88	1.0 \pm 0.10
LASSBio-1386	98.3	105	84	1.4 \pm 0.21
LASSBio-1393	98.4	50	83	0.5 \pm 0.04
LASSBio-1406	98.1	290	81	1.3 \pm 0.14
LASSBio-1407	97.8	210	80	1.6 \pm 0.14

^{a, c} Percentual de inibição da atividade da PDE4 e da liberação de TNF- α após a preincubação derivados NAH na concentração de 10 μ M; ^{b, d} IC₅₀ e EC₅₀ foram calculados por regressão linear (coeficiente de correlação r= 0.95) e representam o valor médio de três determinações, o erro experimental é por volta de 15%.

II – OBJETIVOS

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar as propriedades farmacológicas dessa nova série de derivados NAHs inibidores de PDE4 em modelos experimentais visando definir seu potencial terapêutico no controle da asma.

2.1 – Objetivos específicos

2.1.1 - Avaliar o efeito dos derivados NAHs, administrados por via oral, sobre alterações inflamatórias e hiper-reatividade de vias aéreas induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) com a finalidade de identificar os compostos mais ativos;

2.1.2 - Avaliar o efeito dos derivados NAHs, administrados por via oral, sobre alterações inflamatórias, hiper-reatividade de vias aéreas, produção de muco e remodelamento pulmonar induzidos por alérgenos distintos, tais como ovoalbumina e extrato de ácaro;

2.1.3 – Ranquear os compostos mais promissores da série com base em critérios de eficácia e abrangência de efeitos nos diferentes parâmetros de disfunção pulmonar asmática, tendo o inibidor de PDE4 cilomilast como referência;

2.1.4 – Estudar o efeito dos compostos selecionados diretamente sobre alvos celulares como linfócitos e fibroblastos visando definir mecanismo de ação;

2.1.5 – Avaliar o potencial de indução de êmese dos compostos selecionados, em comparação a inibidores referências de PDE4.

III – METODOLOGIA

3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos A/J machos/fêmeas e DO11.10 (TCR Tg OVA) machos pesando entre 18-20g, além de ratos Wistar machos pesando entre 250-300g. Os animais foram criados e fornecidos pelo CECAL-FIOCRUZ, sendo que todos os procedimentos experimentais aos quais foram submetidos encontram-se aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) (Licença LW-23/10). Todos os animais foram acondicionados em grupos de 5 por caixa, no biotério do pavilhão Ozório de Almeida com temperatura e umidades controladas (21 ± 2 °C, 50 ± 10 %, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos de claro/escuro.

3.2 – Compostos

Os derivados NAHs, LASSBio-1359, LASSBio-1366, LASSBio-1372, LASSBio-1379, LASSBio-1386, LASSBio-1393, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 foram fornecidos pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Biotivas, sob a responsabilidade do Prof^o. Dr. Arthur E. Kümmerle durante sua tese de doutorado, sob orientação do e Prof^o. Dr. Carlos Alberto Manssour. O rolipram (R6520) e cilomilast (SML0733) foram obtidos da Sigma®. As soluções foram preparadas antes do uso e não foram armazenadas para uso posterior.

3.3 – Modelos de inflamação pulmonar

3.3.1 – Ensaio de inflamação pulmonar induzida por LPS

Camundongos A/J fêmeas foram anestesiados com aerossol de halotano e estimulados por instilação nasal com LPS (25 µg/25 µl) (controle positivo) ou salina (controle negativo) 18 h antes dos ensaios biológicos. Os tratamentos foram realizados por via oral 1 h antes do desafio. Os compostos foram diluídos em Tween 80 (0,2 %) e salina.

3.3.2 – Modelo de asma induzida com ovoalbumina (OVA)

Camundongos A/J machos foram imunizados nos dias 0 e 7 com injeção subcutânea (0,2mL de solução/animal) de 50 µg OVA (grau V; sigma) e 5 mg de hidróxido de alumínio em salina estéril (0,9%). Os desafios foram iniciados sete dias após a imunização, sendo realizados uma vez por semana durante 4 semanas por

instilação nasal com 50 µg de OVA em 25 µL de salina/animal. O grupo controle negativo foi instilado apenas com salina no volume de 25 µL /animal. Os tratamentos foram efetuados na terceira e quarta semana por via oral, 1 h antes de cada provocação antigênica. Os compostos foram diluídos em 0,2% de Tween 80. As análises foram realizadas 24 h após a última provocação antigênica (36° dia).

3.3.3 - Protocolo de provocação antigênica com extrato proteico de ácaros da poeiradoméstica (HDM)

Camundongos A/J machos "naives" foram desafiados, por via intranasal, com 25 µL de uma solução contendo 25 µg de extrato proteico de ácaros purificado de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer Laboratories) em PBS estéril, três vezes por semana, em dias alternados, durante três semanas consecutivas (Cheng, Lee et al. 1998; Singh, Daniels et al. 2003). O tratamento com os compostos foi realizado por via oral e através de aerossol durante 6 dias consecutivos apenas na última semana de desafios. Quando o tratamento coincidiu com os dias de provocação antigênica, a administração dos compostos foi realizada 1 h antes do desafio com HDM. O grupo controle foi representado por animais desafiados com 25 µL de PBS estéril.

3.4 – Pletismografia barométrica de corpo inteiro - avaliação da resistência e elastância pulmonares

A hiper-reatividade das vias aéreas foi avaliada pelo método invasivo de pletismografia barométrica de corpo inteiro (Buxco, Troy, NY) (Hamelmann, Schwarze et al. 1997). Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódio (60 mg/Kg i.p.), e as traqueias foram expostas e incisionadas transversalmente entre dois anéis fibrosos, por onde foi introduzida uma cânula de traqueostomia, conectada a um ducto em linha com um respirador artificial, transdutor de pressão e aerolizador. Os animais foram então tratados com bloqueador neuromuscular (Brometo de Pancurônio- 0,04 mg/por animal) e ventilados mecanicamente. Para analisar o desenvolvimento da hiper-reatividade das vias aéreas (resistência e a complacência pulmonar), os animais foram submetidos sequencialmente ao aerossol de PBS e concentrações crescentes de metacolina (3, 9 e 27 mg/mL) em intervalos de 5 min.

3.5 – Análise das células presentes no lavado broncoalveolar (BAL)

Os camundongos foram sacrificados por anestesia terminal com tiopental (500 mg/kg, i.p.), em seguida tiveram a traqueia dissecada e canulada. O lavado broncoalveolar foi obtido por duas (LPS) ou três (HDM) lavagens consecutivas de 0,75 mL de PBS contendo EDTA (10mM). Os lavados foram, então, submetidos à centrifugação (1500 rpm por 10 min), o sobrenadante foi recolhido e ao “pellet” obtido foram adicionados 250 µL de PBS + EDTA (10 mM), para as contagens de leucócitos total e diferencial. A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer através de microscopia de luz (objetiva de 10), diluindo-se uma alíquota da suspensão de células proveniente do lavado em líquido de Türk (1:10). A contagem diferencial foi realizada em citoesfregaços, centrifugados a uma rotação de 350 rpm, por 5 min (Incibrás), e posteriormente corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio de luz com objetiva de imersão em óleo (objetiva de 100).

3.6 – Quantificação de citocinas do tecido pulmonar

Os pulmões dos camundongos AJ foram removidos e perfundidos com 20 mL de salina através do coração. Uma parte do pulmão foi pesada e macerada com 1 mL de solução de PBS (1x), Triton X-100 (1%) e Complete. Após centrifugação 3500 rpm por 10 min à 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e armazenado para posterior quantificação de citocinas.

A produção das citocinas IL-4, IL-13, IL-17, eotaxina-2, KC (BioSource), IFN- γ , eotaxina-1 e IL-5 (R&D) foi detectada com auxílio da técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). O anticorpo capturador (100 µL por poço) foi usado para recobrir a placa de 96 poços, a qual permaneceu incubada em temperatura ambiente por 18 h à 4°C. A placa foi lavada em tampão contendo bicarbonato e tartrazina, e bloqueada para ligações inespecíficas com PBS-BSA 1 % (250 µL por poço) por 1h a 20 °C e permaneceu com o anticorpo capturador durante 1 h. Após esta incubação outra lavagem foi realizada, seguida da aplicação por 1 h a 4 °C das amostras e dos padrões com diluições seriadas, conforme recomendação do fabricante. Na sequencia, a placa foi então lavada para adição do anticorpo de detecção conjugado, permanecendo incubado por 1 h. Após esse tempo, a placa foi lavada novamente e adicionou-se a enzima permanecendo por mais 1 h. O substrato (K-Blue) foi adicionado e a reação foi interrompida com H₂SO₄ nas concentrações

indicadas nos kits. Os resultados obtidos foram corrigidos por mg de tecido pulmonar.

3.7 – Ensaio de detecção de peroxidase de eosinófilos (EPO)

Os pulmões foram removidos e perfundidos com 20 ml de salina/EDTA (20 mM). Os pulmões foram colocados em 5% de suspensão de HBSS (Solução balanceada de Hank's; pH 7.4; Sigma Chemical Co.) e macerados usando um homogeneizador de tecidos (T25 ultra-Tirrax). O homogenato resultante foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C. As hemácias foram removidas por lise hipotônica. As células em suspensão foram então, novamente centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min. Ao pellet obtido foram adicionados uma solução de HBSS contendo 0,05% de HTAB (Hexadeciltrimetilbrometo; Sigma Chemical Co.) (pH 7,4). Essa suspensão foi submetida a choque térmico para lise das células, em três etapas de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Ao final, a suspensão foi centrifugada, e o sobrenadante recolhido. As amostras foram plaqueadas e, em seguida foi adicionado o substrato contendo OPD (*o*-fenildiaminodiidrocloreto; Sigma Chemical Co.) na concentração de 1.5 mM e peróxido de hidrogênio 6.6 mM, diluídos em 0.05 mM Tris-HCl (pH 8.0). A reação foi interrompida após 30 min com a adição de H₂SO₄ (4 M). A leitura de densidade óptica (DO) foi feita no espectrofotômetro (Titertek Multiscan) no comprimento de onda de 492 nm

3.8 – Análise morfométrica do tecido pulmonar

Os pulmões dos animais foram removidos 24 h após o último desafio antigênico e fragmentos destes foram, imediatamente, fixados em formalina-Milloning e posteriormente, incluídos em parafina (Carson, Martin et al. 1973). Secções de 3 µm foram submetidas a diferentes técnicas de coloração para identificação e análise i) do infiltrado celular (Sirius Red pH 10.2), ii) da produção de muco pelas células caliciformes do epitélio brônquico (Ácido Periódico de Schiff – PAS) e iii) Fibrose subepitelial (Tricrômico de Gomori).

3.8.1 – Avaliação do infiltrado eosinofílico e neutrofílico peribronquiolar

A análise histomorfométrica foi realizada em secções coradas com sirius red pH 10,2 com auxílio de microscópio de luz, contendo retículo morfométrico acoplado à ocular e objetiva de 100 x. O retículo morfométrico contendo 100 pontos foi posicionado em regiões periféricas que tangem às vias aéreas, permitindo quantificar o número de neutrófilos e eosinófilos peribronquiolares. Essa avaliação foi feita em pelo menos 8 vias aéreas por corte pulmonar, e 3 campos para cada via aérea.

3.8.2 – Avaliação da fibrose subepitelial e da produção de muco por morfometria digital

A quantificação da fibrogênese subepitelial foi realizada por morfometria digital com o auxílio de um microscópio de luz (Olympus BX50) acoplado a uma câmera de vídeo. Para análise das imagens utilizou-se o programa Image Pro-Plus. As imagens das vias aéreas coradas com tricômico de Gomori e PAS⁺ foram obtidas com auxílio de um microscópio de luz (objetiva com aumento de 400x). Para análise demarcou-se a região que circundava a membrana basal das vias aéreas, excluindo o epitélio e os alvéolos, para quantificação da fibrose subepitelial e, a região do epitélio bronquiolar para quantificação de muco.

3.9 – Cultura de fibroblastos pulmonares

Camundongos "naives" foram sacrificados em câmara de CO₂. Após toracotomia, em condições assépticas, os pulmões foram perfundidos através do coração com 20 mL de PBS estéril (Sigma Chemical Co.). Os pulmões foram, então, removidos e cortados em pequenos pedaços para passarem posteriormente por 2 etapas de digestão enzimática/mecânica. Cada uma consistiu na incubação dos fragmentos de tecidos pulmonar com colagenase tipo 1^a (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 1500 rpm durante 10 min a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em meio DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle's 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.

3.9.1 – Avaliação da resposta proliferativa

Após a terceira passagem, as células foram submetidas ao processo de tripsinização (Tripsina 1,25 g/l + EDTA 0,2 g/l), contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $12,5 \times 10^3$ células/poço. Para a análise da proliferação celular foi utilizada a técnica de incorporação de timidina [^3H]. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram incubadas com os compostos LASSBio-1406, LASSBio-1407, Cilomilast (1, 10 e 100 μM) e, em seguida, estimuladas com IL-13 (40 ng/mL). Após 20 h foram adicionados 0,5 μCi de timidina [^3H] (Metil-3H-Timidina; Amersham) e, feita incubação por 4 h. O DNA marcado foi transferido para um filtro que posteriormente, foi imerso em líquido de cintilação. A taxa de timidina incorporada ao DNA celular foi avaliada por cintilografia em contador beta (Beckman, Série LS-6500).

3.9.2 – Quantificação de MCP-1 no sobrenadante de fibroblastos.

Fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos naive foram plaqueados na densidade de 25×10^4 células por poço, em placas de 6 poços. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram incubadas com os compostos LASSBio-1406, LASSBio-1407, Cilomilast (1, 10 e 100 μM) e, em seguida, estimuladas com IL-13 (40 ng/mL). O sobrenadante foi recolhido 24 h após a estimulação para quantificação da quimiocina MCP-1, através de protocolo descrito anteriormente (ELISA).

3.9.3 – Viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o ensaio colorimétrico com base na utilização do reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-metil)-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT). Para tanto as células foram tripsinizadas, e em seguida adicionadas a placas de 96 poços, na densidade de 2×10^4 células por poço. Uma hora após, os compostos foram adicionados e incubados por 21 h. Em seguida, foi adicionado a solução de MTT (0,5 mg/mL) e as células foram incubadas durante 3 h. Após esse período a placa foi centrifugada à 4000 rpm por 3 min à 4°C. O

sobrenadante foi descartado e os cristais residuais dissolvidos com DMSO 100%. A análise da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro a 540nm.

3.10 – Ensaio de avaliação da atividade de linfócitos *in vitro*

Linfonodos cervicais, axilares e inguinais retirados dos camundongos DO11.10 (TCR Tg), transgênicos que expressam o receptor TCR para OVA, foram macerados em DMEN com soro fetal bovino (SBF 10%). As células obtidas de cada animal foram plaqueadas (5×10^4 células/poço) (n=4) e estimuladas com OVA (0.5 mg/ml por poço) ou veículo (PBS 1 %), na presença ou ausência de concentrações crescentes de cilomilast, LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 (0.1-100 μ M) ou dexametasona (100 μ M) por 72 h, 37°C e 5% CO₂. O sobrenadante das células foi recolhido 72 h após a estimulação para análise de secreção de citocinas (ELISA), como descrito anteriormente. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de citocina (pg) por volume de sobrenadante recolhido.

Para a análise da proliferação e apoptose de células T, células foram permeabilizadas e marcadas com iodeto de propídeo de acordo com as instruções do kit e analisadas no citômetro de fluxo (FACS Calibur). O iodeto de propídeo intercala o DNA, permitindo uma análise das fases do ciclo celular e da degradação deste, resultado característico da apoptose.

3.11 - Protocolo de anestesia mediada por receptor adrenérgico 2.

O potencial emético dos derivados NAHs em camundongos A/J naives foi avaliado como descrito previamente (Robichaud, Savoie et al. 2001; Robichaud, Savoie et al. 2002). Os camundongos (n=10) foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de citadina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), 15 min depois da administração oral dos derivados NAHs. Depois de colocados em decúbito dorsal, o tempo para recuperar os reflexos foi usado como o tempo de duração da anestesia.

3.12 - Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisadas estatisticamente através do teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste t de Newman-Keuls Student. As avaliações dos parâmetros de resistência e elastância pulmonar no BUXCO foram realizadas usando o two way anova seguido pelo teste t de Bonferroni Os valores de P inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significantes.

IV – RESULTADOS

4.1 – Efeito dos novos derivados NAH sobre a inflamação pulmonar induzida por Lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos.

O modelo de inflamação induzida por LPS tem sido extensivamente usado como ponto inicial para investigar o efeito de compostos em doenças respiratórias como asma e DPOC. O LPS, componente principal da membrana externa de bactérias gram-negativas, leva à ativação de receptores Toll-like (TLR)4 e subsequente indução de uma resposta inflamatória local. O LPS induz um acúmulo de células, principalmente neutrófilos, nas secreções respiratórias, similar ao observado em pacientes com DPOC (Bates, Rincon et al. 2009; Virtala, Ekman et al. 2011; Corazza and Kaufmann 2012). Sendo assim, com base no modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS, realizamos a primeira triagem *in vivo* de uma nova série de derivados NAH, sujeito principal desta tese, tendo como referências os inibidores de PDE4 rolipram e cilomilast.

A administração intranasal de LPS (25 µg/animal) induziu um aumento da produção de TNF- α e IL-6 (Tabela 4.1 e 4.2), um significativo acúmulo de leucócitos recuperados do lavado broncoalveolar (BAL), caracterizado predominante por células neutrofílicas (87%), e subsequente aumento da hiper-reatividade das vias aéreas. Como esperado, o tratamento com rolipram inibiu a produção de TNF- α e IL-6 (Tabela 4.2) em 69% e 54%, respectivamente. Enquanto o cilomilast aboliu a produção de IL-6 (100%) e inibiu a produção de TNF- α em 84%. Tanto o rolipram quanto o cilomilast foram efetivos em inibir a neutrofília induzida pela administração intranasal de LPS e a hiper-reatividades das vias aéreas. Os tratamentos orais com os derivados NAHs, com exceção do LASSBio-1359 e LASSBio-1393, foram tão eficazes quanto o rolipram em inibir a produção de TNF- α e IL-6 (Tabela 4.2). Sendo que os LASSBio-1366, LASSBio-1359 e LASSBio-1407 foram tão efetivos quanto o cilomilast, inibindo a produção TNF- α e IL-6 em valores que variaram de 80 à 100% (Tabela 4.1 e 4.2).

Tabela 4.1. Efeito da administração oral de cilomilast (10 µmol/kg, 3 mg/kg) sobre a inflamação pulmonar induzida por LPS.

Estímulo	Tratamento	Célula x10 ³ /BAL				AUC ₀₋₂₇	
		^a TNF- α (pg/mg)	^a IL-6 (pg/mg)	Leucócito Total ^a	Neutrófilos ^a	^{a,b} Resistência	^{a,b} Elastância
Salina	-----	4.6 ± 0.2	5.6 ± 0.7	45.0 ± 5.0	0.6 ± 0.03	78.9 ± 4.3	1893 ± 191.7
LPS	+ Tween 80 0,2%	7.7 ± 0.8 ⁺	8.2 ± 0.1 ⁺	308.3 ± 23.0 ⁺	260.0 ± 14.3 ⁺	115.8 ± 14.0 ⁺	3535 ± 215.3 ⁺
	+ Cilomilast	5.1 ± 0.7 [*]	5.5 ± 0.8 [*]	193.8 ± 25.3 [*]	148.5 ± 19.8 [*]	71.5 ± 8.2 [*]	2005 ± 266.2 [*]

^aValores representam a média ± erro padrão da média (EPM) de pelo menos 6 animais. ^b Área sob a curva (AUC) formada pela aerosolização de concentrações crescentes de metacolina de 0 mg/ml a 27 mg/ml (AUC₀₋₂₇), retirados da avaliação de resistência e elastância pulmonar. LPS (25 µg/25 µl) foi administrado intranasal. ⁺P<0.05 comparado com os camundongos estimulados com salina. ^{*}P<0.05 comparado com os camundongos estimulados com LPS e tratados com o veículo.

Tabela 4.2. Efeito da administração oral de rolipram (45 µmol/kg, 10 mg/kg) ou dos derivados *N*-metil-*N*-acilhidrazônicos (100 µmol/kg, 30-35 mg/kg) sobre a produção de TNF- α e IL-6 induzida por LPS no tecido pulmonar, 18 h pós-desafio.

Estímulo	Tratamento	^a TNF- α	Inibição	^a IL-6	Inibição
		(pg/mg)	(%)	(pg/mg)	(%)
Salina	-----	5.3 \pm 1.4	-	7.5 \pm 1.7	-
LPS	+ Tween 80 0,2%	17.0 \pm 1.8 ⁺	-	37.0 \pm 3.0 ⁺	-
	+ Rolipram	8.9 \pm 1.3*	69	20.9 \pm 2.8*	54
	+ LASSBio-1359	11.6 \pm 1.4*	46	21.2 \pm 2.3*	53
	+ LASSBio-1366	8.3 \pm 0.3*	74	17.7 \pm 2.6*	65
	+ LASSBio-1372	7.6 \pm 1.7*	80	10.0 \pm 1.8*	92
	+ LASSBio-1379	10.7 \pm 1.6*	54	19.7 \pm 3.7*	59
	+ LASSBio-1386	11.0 \pm 1.1*	51	23.8 \pm 2.7*	45
	+ LASSBio-1393	12.9 \pm 2.4	35	35.2 \pm 2.7	6
	+ LASSBio-1406	8.2 \pm 2.8*	75	25.8 \pm 4.1*	38
	+ LASSBio-1407	5.3 \pm 0.8*	100	7.9 \pm 1.5*	99

^aValores representam a média \pm EPM de pelo menos 6 animais por grupo. LPS (25 µg/25 µL) foi administrado intranasal. ⁺*P*<0,05 comparado com os camundongos estimulados com salina.

**P*<0,05 comparado com os camundongos estimulados com LPS e tratados com o veiculo.

Similarmente ao observado para rolipram e cilomilast, o tratamento com os derivados NAHs inibiram significativamente o aumento no número de neutrófilos recuperados no BAL (50% a 77%)(Tabela 4.3). Sendo que os compostos LASSBio-1359, LASSBio-1379 e LASSBio-1406 foram mais efetivos que o rolipram e cilomilast em inibir o acúmulo de leucócitos totais e neutrófilos no BAL (Tabela 4.1;

tabela 4.3). Todos os análogos estudados inibiram significativamente as respostas de resistência e elastância pulmonar aumentadas após exposição ao LPS como mostrado na tabela 4.4. O destaque aqui foi o LASSBio-1366, tão eficaz quanto os compostos de referência, prevenindo a hiper-reatividade das vias aéreas, evidenciada pelo aumento da resposta de resistência e elastância pulmonar em 92% e 79 %, respectivamente (Tabela 4.4).

Tabela 4.3. Efeito da administração oral de rolipram (45 µmol/kg, 10 mg/kg) ou dos derivados *N*-metil-*N*-acilhidrazônicos (100 µmol/kg, 30-35 mg/kg) sobre o número de células recuperadas do BAL 18 h pos-desafio.

Estímulo	Tratamento	Leucócitos totais (x10 ³ /BAL)	Inibição (%)	Neutrófilo (x 10 ³ /BAL)	Inibição (%)
Salina	-----	65.8 ± 3.9	-	3.1 ± 1.0	-
LPS	+ Tween 80 0,2%	480.5 ± 46.2 ⁺	-	416.0 ± 40.7 ⁺	-
	+ Rolipram	191.3 ± 39.7 [*]	70	128.1 ± 30.0 [*]	70
	+ LASSBio-1359	177.1 ± 14.5 [*]	73	136.2 ± 14.5 [*]	68
	+ LASSBio-1366	262.5 ± 10.0 [*]	53	209.2 ± 6.7 [*]	50
	+ LASSBio-1372	222.9 ± 32.5 [*]	62	138.3 ± 23.4 [*]	67
	+ LASSBio-1379	192.9 ± 26.6 [*]	69	193.1 ± 31.5 [*]	54
	+ LASSBio-1386	145.0 ± 9.7 [*]	81	136.6 ± 7.9 [*]	68
	+ LASSBio-1393	211.9 ± 28.4 [*]	65	167.2 ± 26.4 [*]	60
	+ LASSBio-1406	179.7 ± 17.6 [*]	73	99.4 ± 11.2 [*]	77
	+ LASSBio-1407	264.6 ± 23.5 [*]	52	197.0 ± 11.3 [*]	53

^aValores representam a média ± EPM de pelo menos 6 animais por grupo). LPS (25 µg/25 µL) foi administrado por via intranasal. ⁺*P*<0,05 comparado com os camundongos estimulados com salina. ^{*}*P*<0,05 comparado os camundongos estimulados com LPS e tratados com o veículo.

Tabela 4.4. Efeito da administração oral de rolipram (45 µmol/kg, 10 mg/kg) ou dos derivados *N*-metil-*N*-acilhidrazônicos (100 µmol/kg, 30-35 mg/kg) sobre a hiper-reatividade das vias aéreas (alterações de resistência e elastância pulmonar) em resposta a concentrações crescentes de metacolina (0, 3, 9 e 27 mg/ml), 18 h após o desafio.

Estimulo	Tratamento	^aResistência (AUC₀₋₂₇)	Inibição (%)	^aElastância (AUC₀₋₂₇)	Inibição (%)
Salina	-----	202.0 ± 21.0	-	9676 ± 1150	-
LPS	+ Tween 80 0,2%	496.8 ± 28.0 ⁺	-	25677 ± 1978 ⁺	-
	+ Rolipram	218.1 ± 28.9 [*]	95	10315 ± 2123 [*]	96
	+ LASSBio-1359	325.2 ± 35.8 [*]	58	17410 ± 1199 [*]	51
	+ LASSBio-1366	224.5 ± 46.7 [*]	92	13101 ± 2479 [*]	79
	+ LASSBio-1372	332.8 ± 28.3 [*]	56	15376 ± 1870 [*]	64
	+ LASSBio-1379	400.5 ± 23.4 [*]	33	14189 ± 1606 [*]	72
	+ LASSBio-1386	318.4 ± 47.2 [*]	61	15753 ± 2862 [*]	62
	+ LASSBio-1393	392.1 ± 38.6 [*]	36	15863 ± 3170 [*]	61
	+ LASSBio-1406	290.2 ± 30.8 [*]	70	14704 ± 3738 [*]	69
	+ LASSBio-1407	316.4 ± 32.6 [*]	61	16249 ± 1941 [*]	59

^aValores são representados pela área sob a curva (AUC) formada pela aerossolização de concentrações crescentes de metacolina de 0 a 27 mg/mL (AUC₀₋₂₇), retirados da avaliação de resistência e elastância pulmonar. Valores representam a média ± EPM de pelo menos 6 animais por grupo. LPS (25 µg/25 µL) foi administrado por via intranasal. ⁺*P*<0,05 comparado com os camundongos estimulados com salina. ^{*}*P*<0,05 comparado com os camundongos estimulados com LPS e tratados com veículo.

4.2 – Efeito do tratamento terapêutico com os derivados NAHs no modelo de asma induzida por ovoalbumina

Utilizando o protocolo de sensibilização e desafio antigênico esquematizado na Figura 4.1, estudamos o efeito dos derivados NAHs na sua capacidade de inibir a resposta inflamatória alérgica pulmonar instalada, tendo o inibidor de PDE4 rolipram como referência.

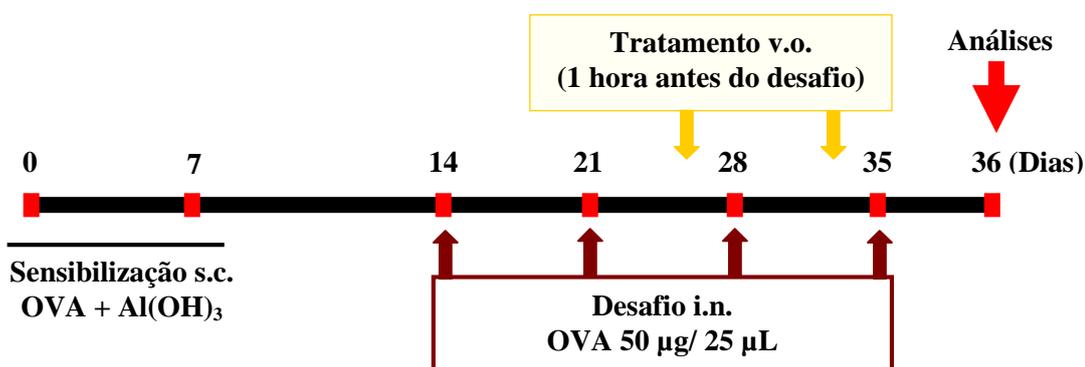


Figura 4.1. Protocolo experimental de indução de inflamação pulmonar alérgica em camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina. Os animais foram sensibilizados no dia 0 e 7 com uma mistura de ovoalbumina e hidróxido de alumínio. Após 14 dias, os animais foram desafiados por instilação nasal de 50 µg de OVA em 25 µL de salina, uma vez por semana durante 4 semanas. Os grupo controle foi desafiado com salina. Os tratamentos foram realizados por via oral na terceira e quarta semana após a sensibilização, 1 h antes de cada desafio. As análises foram feitas 24 h após o último desafio.

A sequência de desafios antigênicos causou 24 h após a última provocação, (i) aumento significativo na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias detectadas no tecido pulmonar (Figura 4.2), (ii) consequente influxo de polimorfonucleares, principalmente eosinófilos (Figura 4.3), além de marcada hiperreatividade das vias aéreas, em resposta à aerossolização de concentrações crescentes de metacolina (Figura 4.4). Notou-se um aumento significativo na resistência (Figura 4.4A) e elastância pulmonares (Figura 4.4B) dos camundongos provocados com OVA, em comparação àqueles desafiados com salina. Além disso, observa-se um intenso remodelamento da vias aéreas, caracterizado por densa deposição de componentes de matriz na região peribronquiolar (Figura 4.5) e hipersecreção de muco (Figura 4.6).

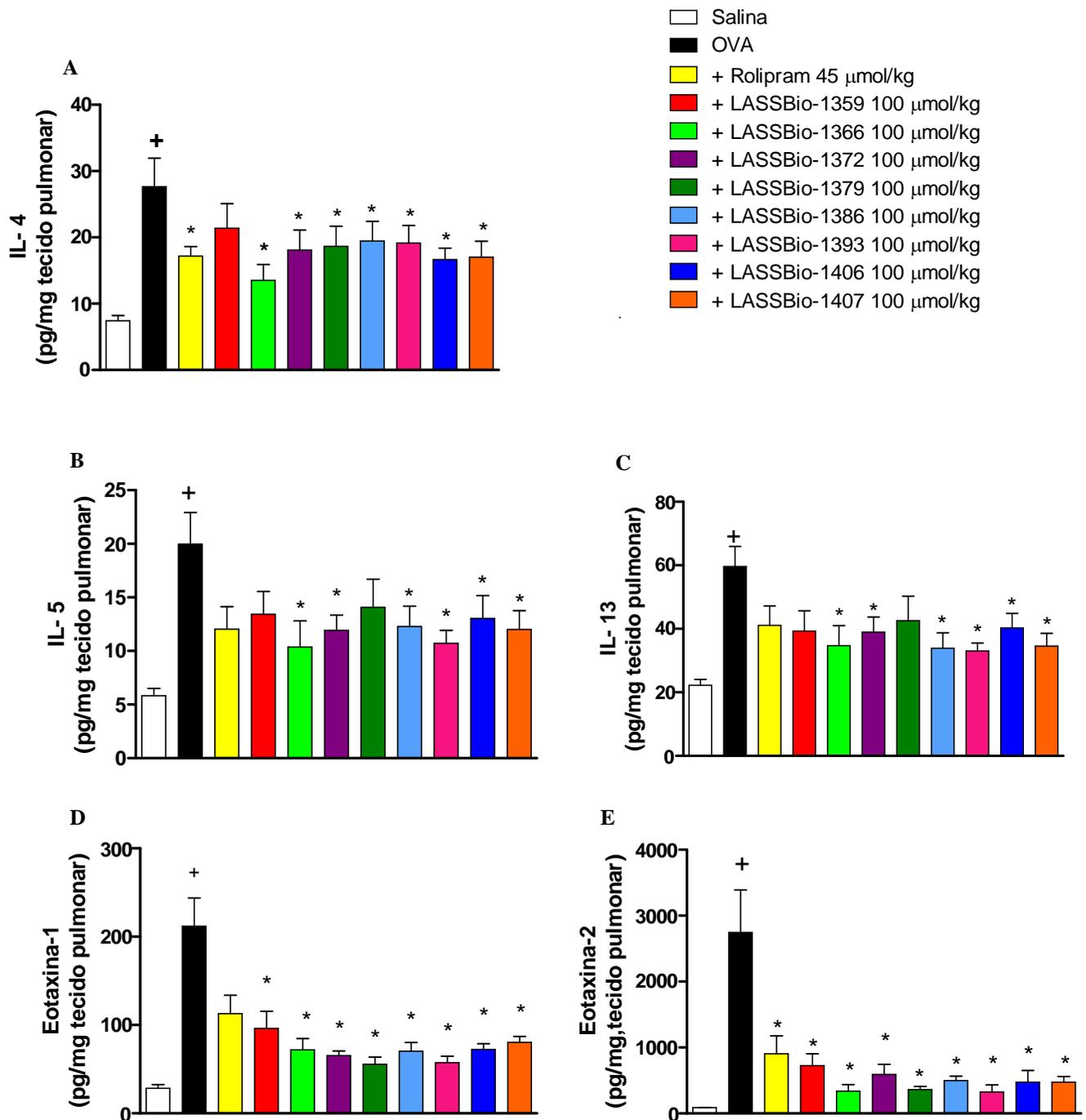


Figura 4.2 . Efeito dos tratamentos com os derivados NAHs e rolipram na secreção de IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (c), eotaxina-1 (D) e eotaxina-2 (E) no tecido pulmonar de camudongos ativamente sensibilizados. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 7 animais por grupo. $^+P<0,01$ comparado ao grupo desafiado com salina. $*P<0,05$ comparado ao grupo desafiado com OVA e tratado com veículo (Tween 80 0,2%).

Como podemos observar na figura 4.2, os níveis de IL-4, IL-5, IL-13, eotaxina-1 e 2 em amostras de tecido pulmonar de camundongos desafiados com OVA mostraram-se significativamente aumentados em comparação aos animais controles sensibilizados e falso-desafiados. O tratamento realizado com rolipram (45 µmol/kg, 10 mg/kg), iniciado na terceira semana de desafios com OVA, foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IL-4 e eotaxina-2. Adicionalmente, o tratamento curativo com rolipram reduziu o acúmulo de neutrófilos (Figura 4.3) e aboliu a hiper-reatividade das vias aéreas (Figura 4.4). No entanto, o rolipram mostrou-se incapaz de reverter significativamente o acúmulo de eosinófilos (Figura 4.3), a deposição de componentes de matriz (Figura 4.5) e a hipersecreção de muco (Figura 4.6) no tecido pulmonar de camundongos desafiados com OVA.

Os compostos LASSBio-1366, LASSBio-1372, LASSBio-1386, LASSBio-1393, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 inibiram, de forma significativa (40%), o aumento dos níveis de IL-4, IL-5, IL-13, eotaxina-1 e 2 dos camundongos desafiados com OVA. Os LASSBio-1359 e LASSBio-1379, assim como o rolipram, foram capazes de inibir significativamente apenas os níveis de IL-4, eotaxina-1 e eotaxina-2 (Figura 4.2).

Nossos dados mostram que o tratamento terapêutico com os derivados NAHs foi capaz de reduzir de forma significativa o influxo de células polimorfonucleares, eosinófilos e neutrófilos, em magnitudes que variaram de 45-63% e 59-100%, respectivamente (Figura 4.3), além de reduzir o aumento de resistência e elastância pulmonar em valores de inibição que variaram de 70 a 100 %, no caso das medidas de resistência (Figura 4.4A), e 60 a 99 % para as medidas de elastância (Figura 4.4B), respectivamente. Notou-se que os compostos LASSBio-1372, LASSBio-1386, LASSBio-1393, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 foram tão efetivos quanto o rolipram em inibir a hiper-reatividade das vias aéreas.

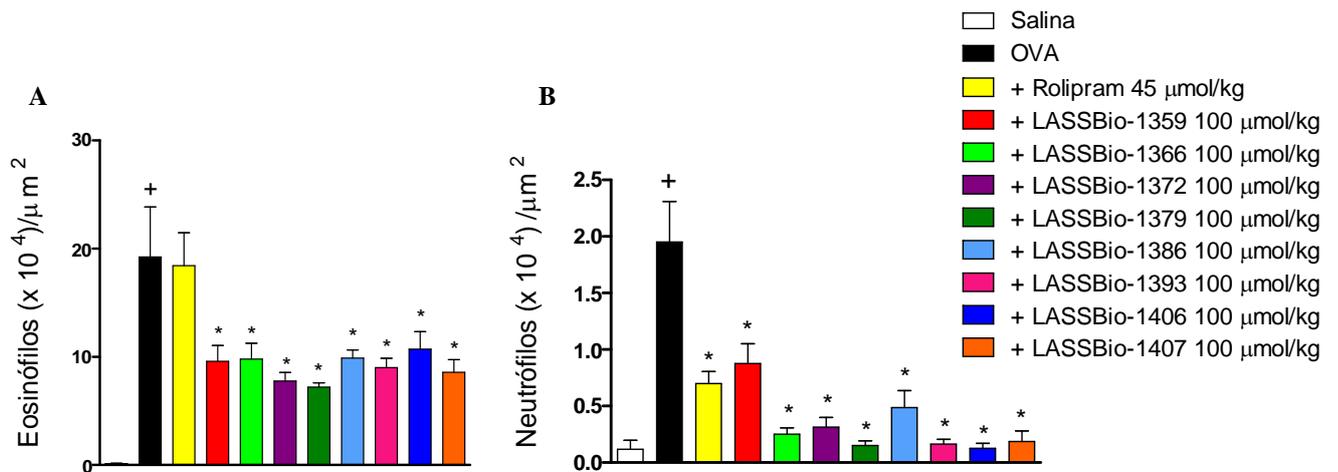
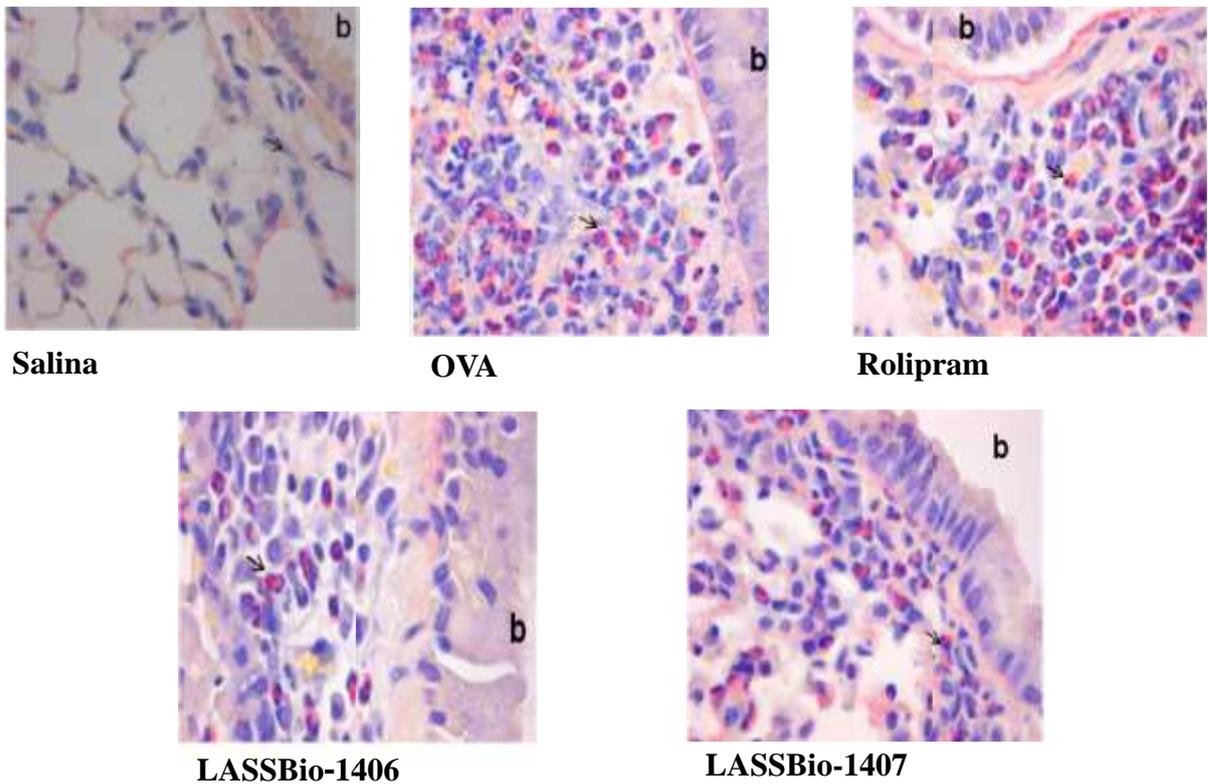


Figura 4.3. Efeito do tratamento com o rolipram e dos derivados NAHs sobre o infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares no tecido pulmonar em resposta a múltiplos desafios com OVA. Fotomicrografias de tecido pulmonar coradas com Sirius red modificado pH 10.2. Os valores representam a média ± EPM de pelo menos 8 animais por grupo. Os painéis A e B representam os valores quantitativos de eosinófilos/μm² e neutrófilos/μm², respectivamente. ⁺P<0,001 em comparação com os grupo desafiado com salina. *P< 0,05 em comparação com o grupo desafiado com OVA e tratado com o veículo (Tween 80 0,2%). As micrografias são representativas, as setas escuras indicam os eosinófilos e a letra b indica as regiões bronquiolares.

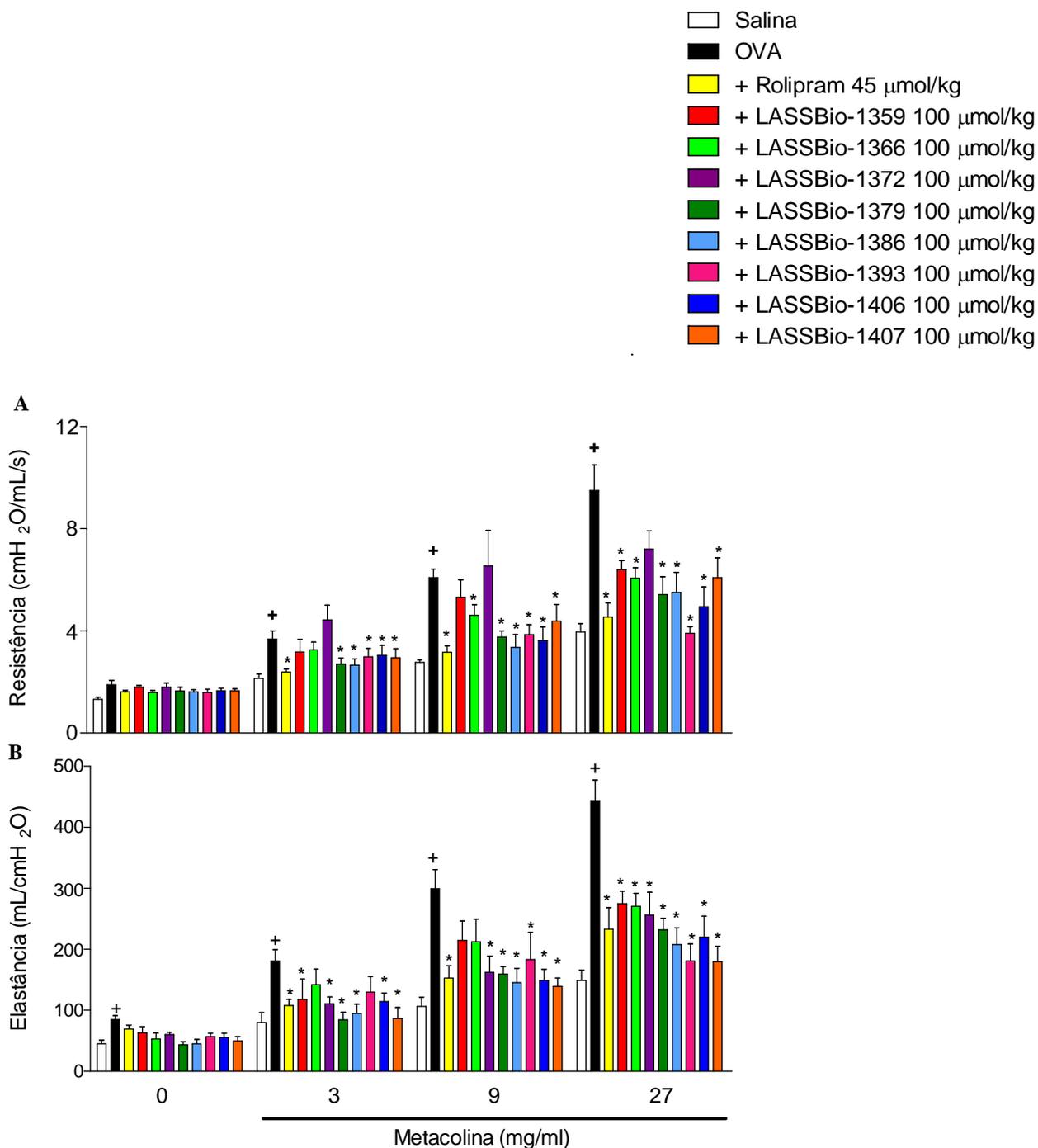


Figura 4.4. Efeito do tratamento com o rolipram e derivados NAHs na hiperreatividade das vias aéreas em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. A exposição dos animais a concentrações crescentes de metacolina (3 a 27 mg/mL) induziu aumento de resistência (A) e elastância (B) pulmonares. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 7 animais por grupo. ⁺ $P < 0,05$ em comparação com o grupo sham-desafiado. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo desafiado com OVA tratado com o veículo (Tween 80 0,2%).

Adicionalmente, o tratamento com todos os derivados NAHs, com exceção do LASSBio-1366, reverteu de forma significativa deposição de componentes de matriz na região peribronquiolar de camundongos ativamente sensibilizados. Como

mostrado na figura 4.5, os percentuais de inibição variaram de 74 a 94%, enquanto que o tratamento com rolipram, apesar de reduzir a resposta fibrogênica, não o fez de forma estatisticamente significativa.

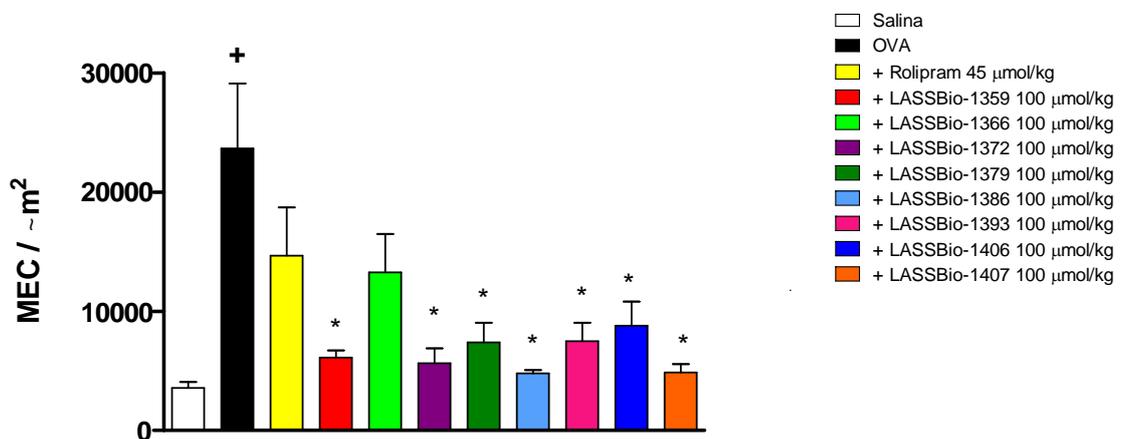
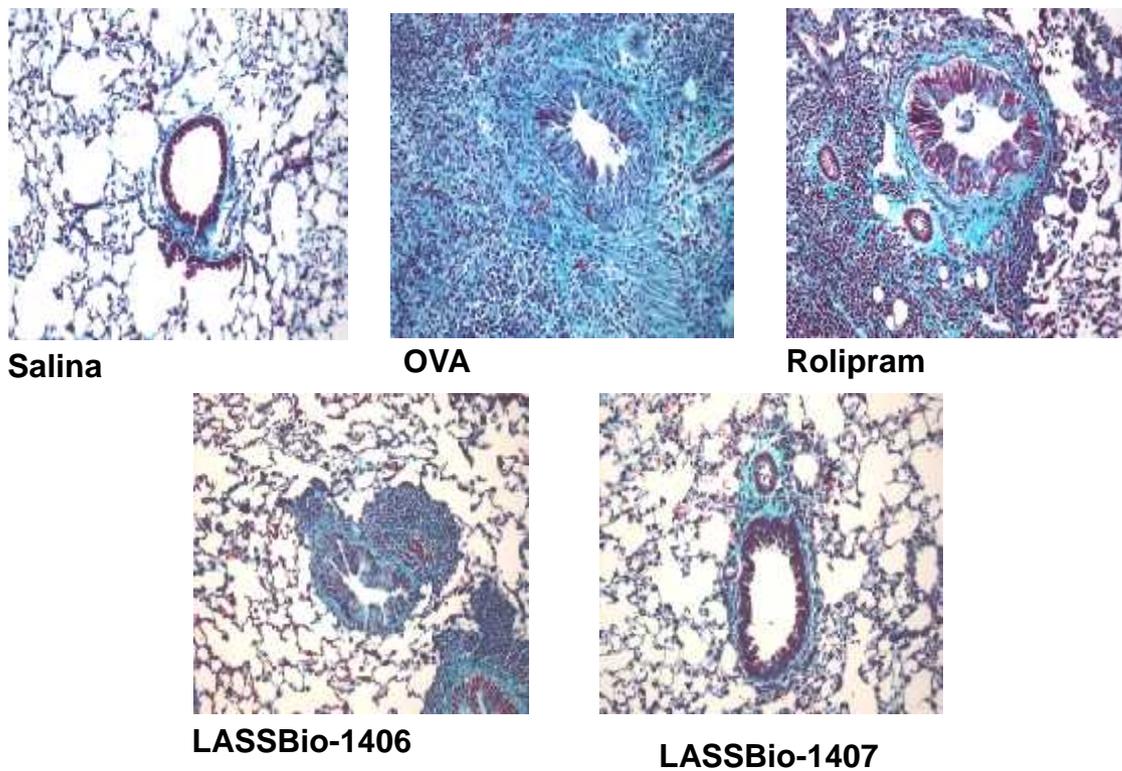


Figura 4.5. Efeito do tratamento com o rolipram e os derivados NAHs sobre a deposição de componentes de matriz na região peribrônquica induzida por OVA em camundongos ativamente sensibilizados. Fotomicrografias de tecido pulmonar coradas com Tricômico de Gomori. Os valores representam a média \pm EPM de pelo menos 8 animais por grupo. $^+P < 0,001$ em comparação com o grupo sham-desafiado. $*P < 0,05$ em comparação com o grupo desafiado com OVA tratado com o veículo tween 80 0,2%. As micrografias são representativas dos grupos experimentais.

Ademais, de forma interessante, apenas os tratamentos com LASSBio-1406 e LASSBio-1407 foram capazes de reverter de forma significativa a hipersecreção de muco em resposta aos desafios antigênicos com OVA (Figura 4.6).

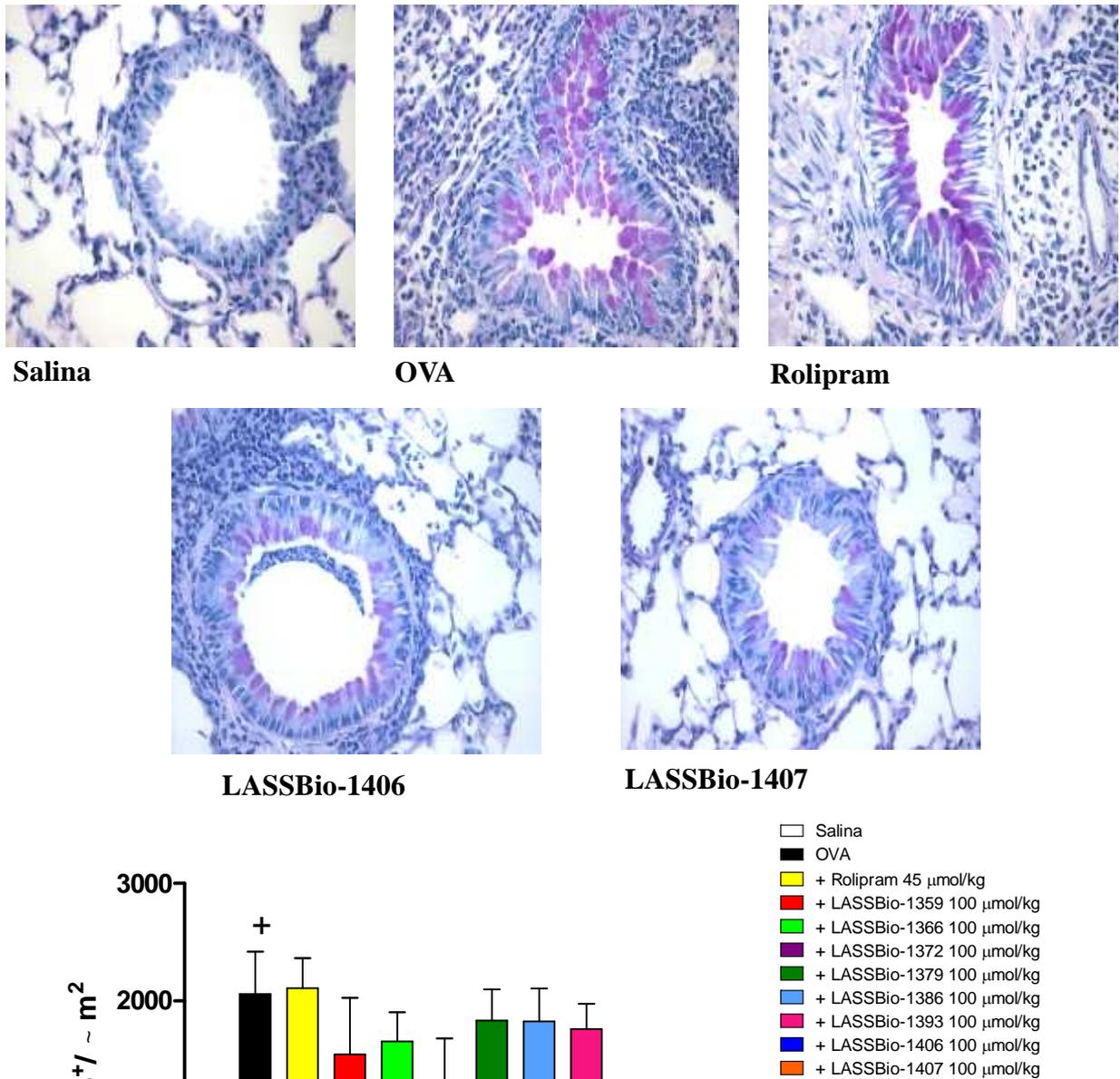


Figura 4.6. Efeito do tratamento com o rolipram e dos NAHs na hipersecreção de muco nas vias aéreas de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Fotomicrografias de tecido pulmonar coradas com ácido periódico de Schiff (PAS⁺). Análise quantitativa da produção de muco, em pixel por μm^2 de 6-10 vias aéreas por animal. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 8 animais por grupo. ⁺ $P < 0,0001$ em comparação com o grupo sham-desafiado. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo desafiado com OVA e tratadas com tween 80 0,2%. As micrografias são representativas.

4.3 – Efeito da administração oral dos compostos LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 na asma experimental induzida por extrato caseiro de ácaros (HDM)

O HDM é um alérgeno de grande relevância responsável pelo desenvolvimento da asma em aproximadamente 10% da população mundial. Assim, utilizando o protocolo esquematizado na figura 4.7, camundongos A/J foram estimulados através de administração intranasal de HDM (25 µg/25 µL de salina) ou PBS 3 vezes por semana, durante 3 semanas (5 a 7 camundongos por grupo). Os tratamentos com os derivados NAHs mais promissores nos ensaios anteriores, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 (100 µmol/kg), e rolipram (50 µmol/kg) foram realizados, por via oral, somente nos 6 últimos dias do período de provocação, sempre 1 h antes dos desafios com HDM (nos dias em que ocorreram a provocação) (Figura 4.7).

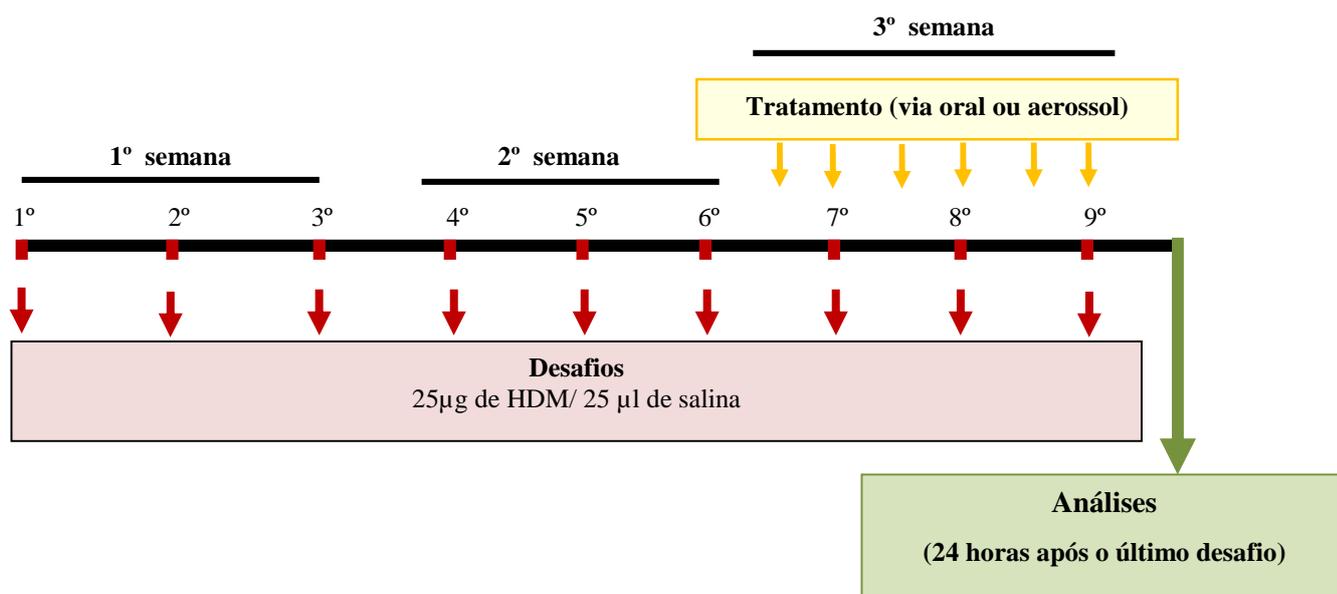


Figura 4.7. Modelo experimental de asma induzida por extrato caseiro de ácaro (HDM) em camundongos A/j. Camundongos A/J machos foram expostos por via intranasal ao extrato de HDM ou PBS 3 (três) vezes por semana (dias intercalados), durante 3 semanas (n=7-8 camundongos por grupo).

A sequência de desafios com extrato de HDM durante 3 semanas promoveu persistente inflamação das vias aéreas, evidenciada pelo aumento no número de leucócitos totais e eosinófilos recuperados no lavado broncoalveolar (Figura 4.8). Ademais, notou-se elevação das respostas de resistência e elastância pulmonar induzidas por concentrações crescentes de metacolina (0-27 mg/ml), comparado ao grupo desafiado com PBS, 24 h após o último desafio (Tabela 4.5). O tratamento com rolipram (50 μ mol/kg, *via oral*) reduziu significativamente a quantidade de células totais e eosinófilos recuperados no lavado broncoalveolar, quando comparado ao grupo desafiado com HDM e tratado com veículo ($P < 0.01$, Figura 4.8). O tratamento com rolipram foi também eficaz em reduzir a hiper-reatividade das vias aéreas, inibindo em 34% e 44 % a resposta de aumento de resistência e elastância pulmonar, respectivamente (Tabela 4.5).

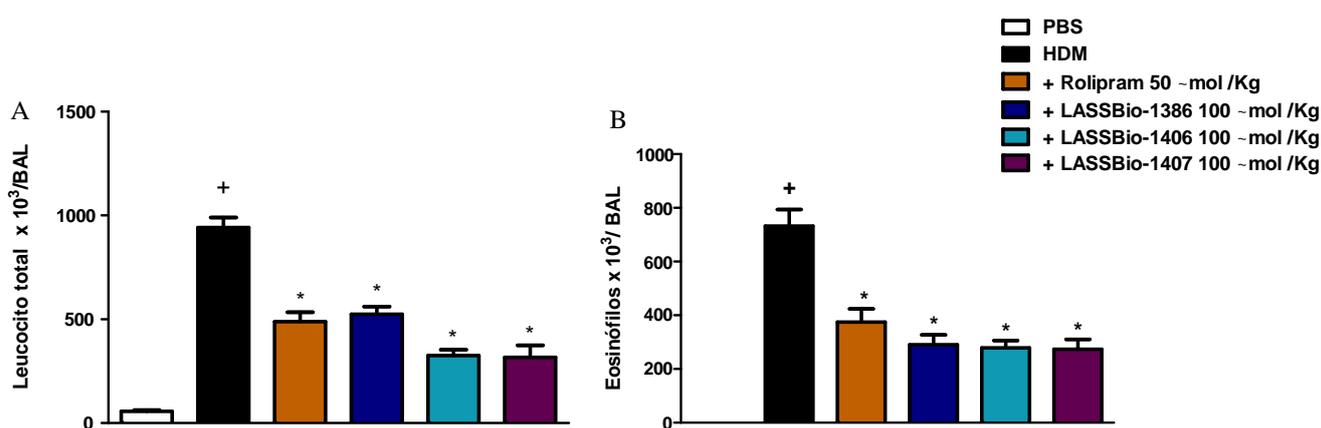


Figura 4.8. Efeito do tratamento com os LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 (100 μ mol/kg *via oral*) sobre o número de células recuperadas do BAL. Número de total de leucócitos (A) e o número de eosinófilos (B) recuperados no BAL. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 8 animais por grupo. ⁺ $P < 0,05$ em comparação com o grupo desafiado com PBS. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo desafiado com HDM e tratados com Tween 80 0,2%.

Similar ao observado para o rolipram, os tratamentos com os LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 (100 μ mol/kg, *via oral*) também inibiram o acúmulo de leucócitos totais e eosinófilos no BAL ($P < 0.001$) (Figura 4.8). De forma interessante, como mostrado na tabela 4.5, os tratamentos com o LASSBio-1406 e LASSBio-1407 inibiram a resposta de aumento de resistência, após provocação com metacolina, em 81% e 94% respectivamente, em condições onde rolipram e LASSBio-1386 produziram bloqueios da

ordem de 34% e 38%, respectivamente. Da mesma forma, observou-se bloqueios da resposta aumentada de elastância pulmonar em 52% e 84% após LASSBio-1406 e 1407, enquanto que rolipram e LASSBio-1386 geraram bloqueios de 44% e 0%, respectivamente (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Efeito da administração oral de rolipram (50µmol/kg, 10 mg/kg) ou dos LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 (100 µmol/kg, 30-35 mg/kg) sobre a hiper-reatividade das vias aéreas induzida por desafio alérgico com HDM .

Estimulo	Tratamento	^a Resistência (AUC ₀₋₂₇)	Inibição (%)	^a Elastância (AUC ₀₋₂₇)	Inibição (%)
PBS	Veículo	95.7± 16.3	-	2773.0± 333.0	-
HDM	Veículo	239.8 ± 38.0 ⁺	-	4936.0± 385.1 ⁺	-
	+ Rolipram	218.1 ± 33.0	34	3985.5± 285.0 [*]	44
	+ LASSBio-1386	185.1± 34.2	38	5544.9±380.0	0
	+ LASSBio-1406	122.6± 8.8 [*]	81	3800.0± 531.0 [*]	52
	+ LASSBio-1407	104.1± 14.1 [*]	94	3118.0± 331.0 [*]	84

^aValores são representados pela área sob a curva (AUC) formada pela aerolização de concentrações crescentes de metacolina de (3-27 mg/ml, AUC₀₋₂₇), obtidas para respostas de resistência e elastância pulmonares, em camundongos desafiados com HDM (25 µg/25 µl) por via intranasal. Valores representam a média ± EPM de pelo menos 8 animais por grupo. ⁺P<0,05 em comparação com o grupo desafiado com PBS. ^{*}P<0,05 em comparação com o grupo desafiado com HDM e tratado com tween 80 0,2 %.

4.4 – Estudo do efeito dose-resposta de LASSBio-1407 na asma experimental produzida por HDM

Utilizando o protocolo experimental descrito no item anterior, avaliamos o efeito do tratamento com LASSBio-1407, por via oral (10 - 100 $\mu\text{mol/kg}$) por aerossol (2×10^{-1} M; Fluxo contínuo, 20 min), sobre a inflamação das vias aéreas, hiper-reatividade brônquica e remodelamento tecidual causado por provocação alérgica com HDM.

Como podemos observar na figura 4.9, o tratamento diário com o inibidor de PDE4 cilomilast (30 $\mu\text{mol/kg}$, *via oral*), nos últimos seis dias de provocação alérgica, inibiu significativamente os níveis de IL-4, IL-13 e IL-17 dos camundongos desafiados com HDM (100 e 98%, respectivamente), mas falhou em modificar os níveis de IL-5 e KC. Adicionalmente, cilomilast reduziu drasticamente o acúmulo de eosinófilos e neutrófilos no BAL (Figura 4.10), a hiper-reatividade das vias aéreas (Figura 4.11) e a deposição de componentes de matriz extracelular (Figura 4.12). No entanto, mostrou-se incapaz de inibir significativamente a produção aumentada de muco (Figura 4.13) no tecido pulmonar de camundongos desafiados com extrato de HDM.

Diferentemente do cilomilast, o tratamento oral por seis dias consecutivos com LASSBio-1407 (10-100 μM), inibiu de forma dose-resposta a secreção de IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, eotaxina-2 e KC (Figura 4.9). O tratamento inibiu também de maneira dose-dependente o aumento de leucócitos totais, principalmente pela redução do número de eosinófilos e neutrófilos no BAL (Figura 4.10), além de reduzir o aumento de resistência e elastância pulmonar (Figura 4.11). Adicionalmente, o tratamento oral com LASSBio-1407 foi eficaz em inibir significativamente a deposição de componentes matriz na região peribronquiolar (Figura 4.12) e a hipersecreção de muco (Figura 4.13) em valores de inibição que variaram de 86-98% e 73-82 %, respectivamente.

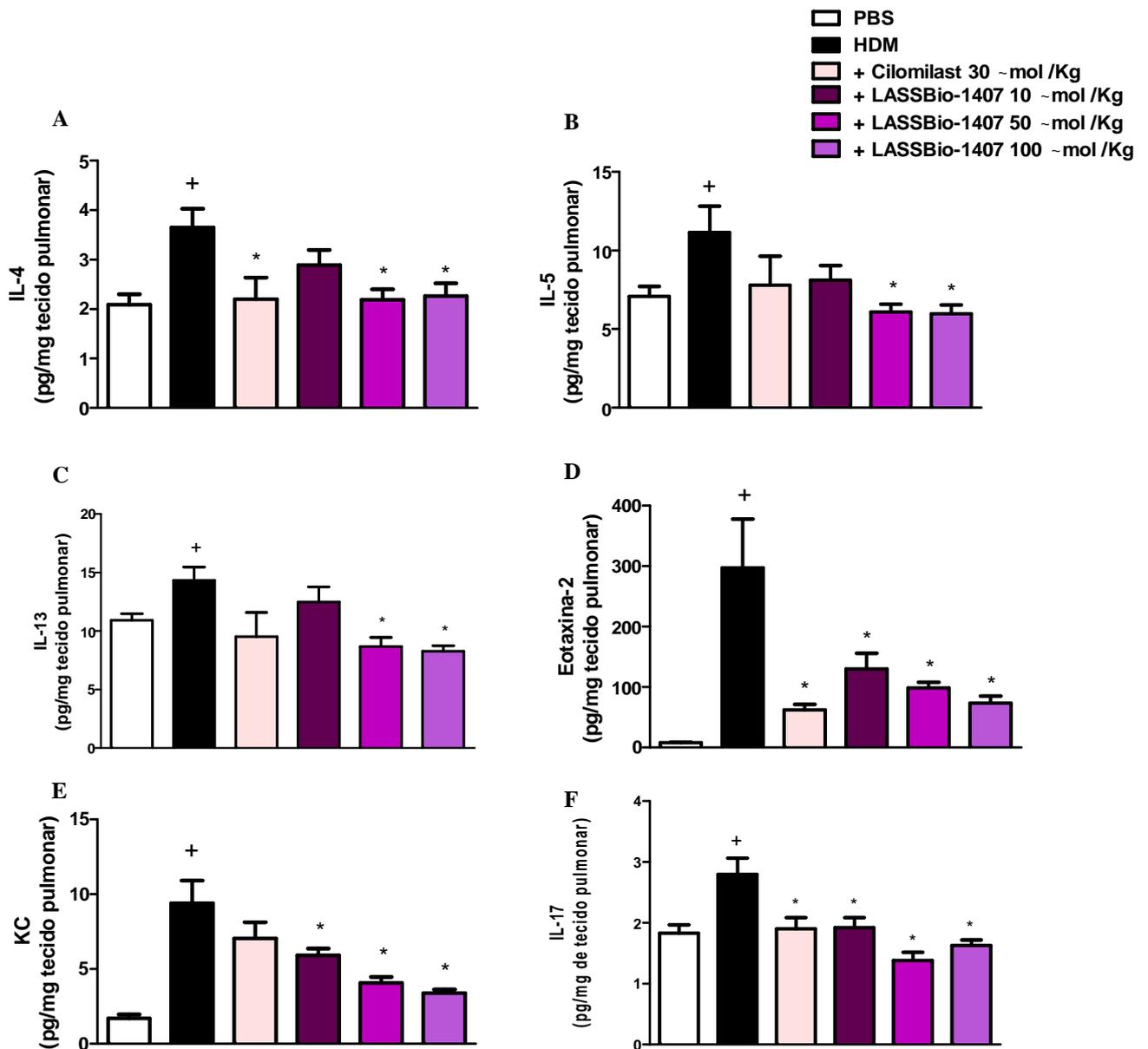


Figura 4.9. Efeito do tratamento com LASSBio-1407 e cilomilast sobre a secreção de IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C), eotaxina-2 (D), KC (E) e IL-17 (F) no tecido pulmonar de camundongos desafiados com extrato de HDM. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 8 animais por grupo. $^+P < 0.01$ comparado ao grupo desafiado com PBS. $*P < 0.05$ comparado ao grupo desafiado com HDM e tratado com tween 80 0,2%.

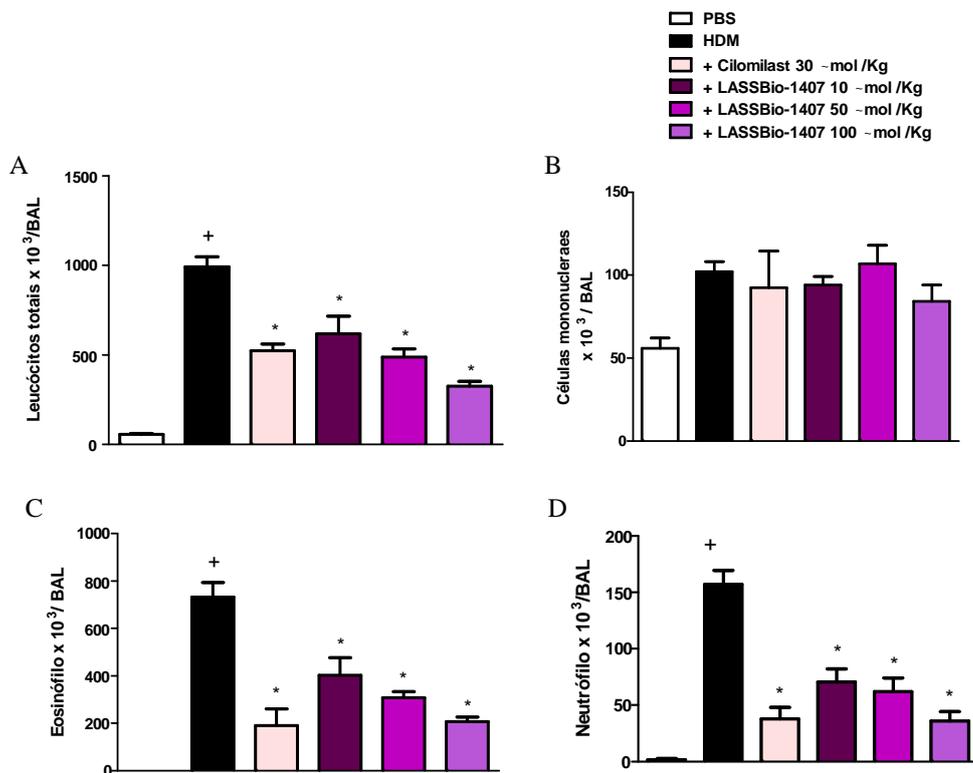


Figura 4.10. Efeito do tratamento com o LASSBio-1407 (10 - 100 $\mu\text{mol/kg}$ via oral) sobre o número de células recuperadas do BAL: em comparação com o Cilomilast (30 $\mu\text{mol/kg}$ via oral). Número de total de leucócitos (A), células mononucleares (B), eosinófilos (C) e neutrófilos (D) recuperados no BAL. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 7 animais por grupo. ⁺ $P < 0.05$ em comparação com o grupo desafiado com PBS. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo desafiado com HDM e tratado com tween 80 0,2%.

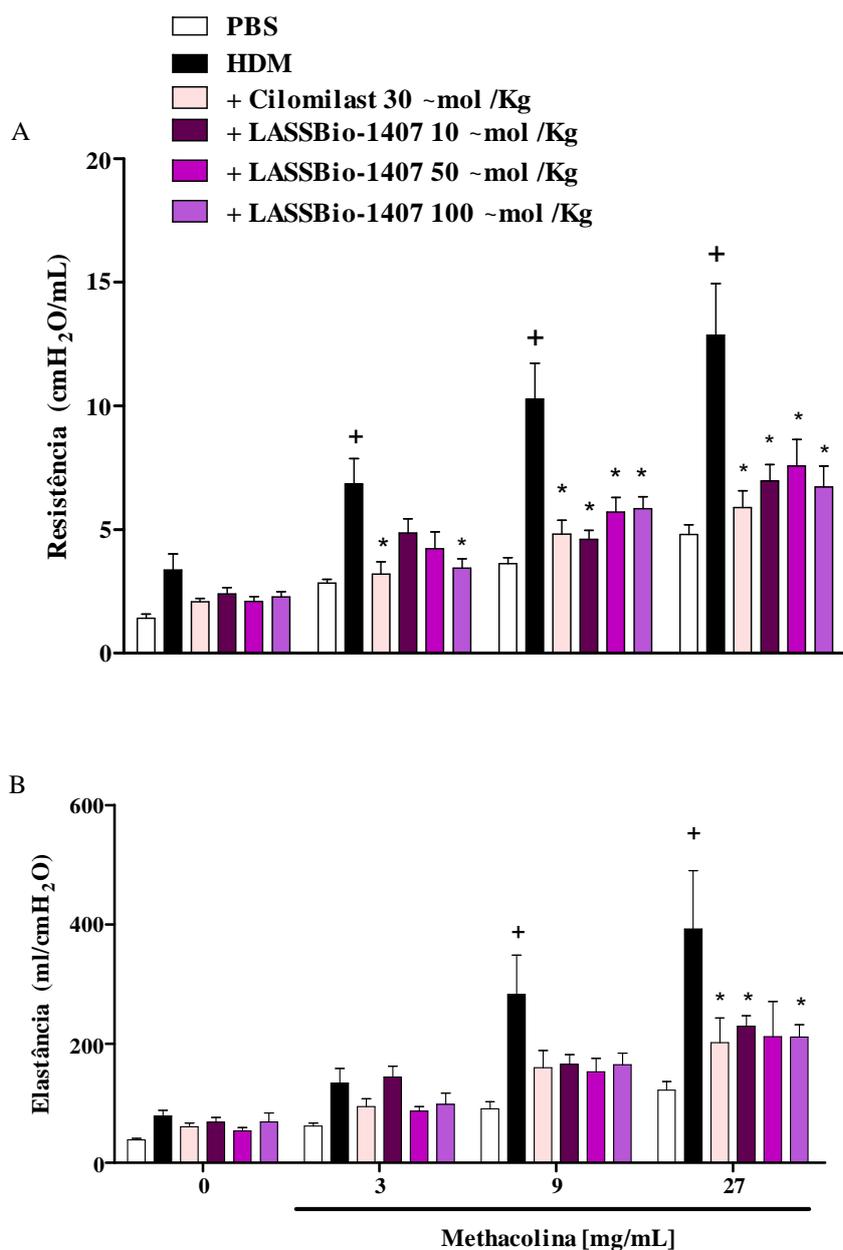
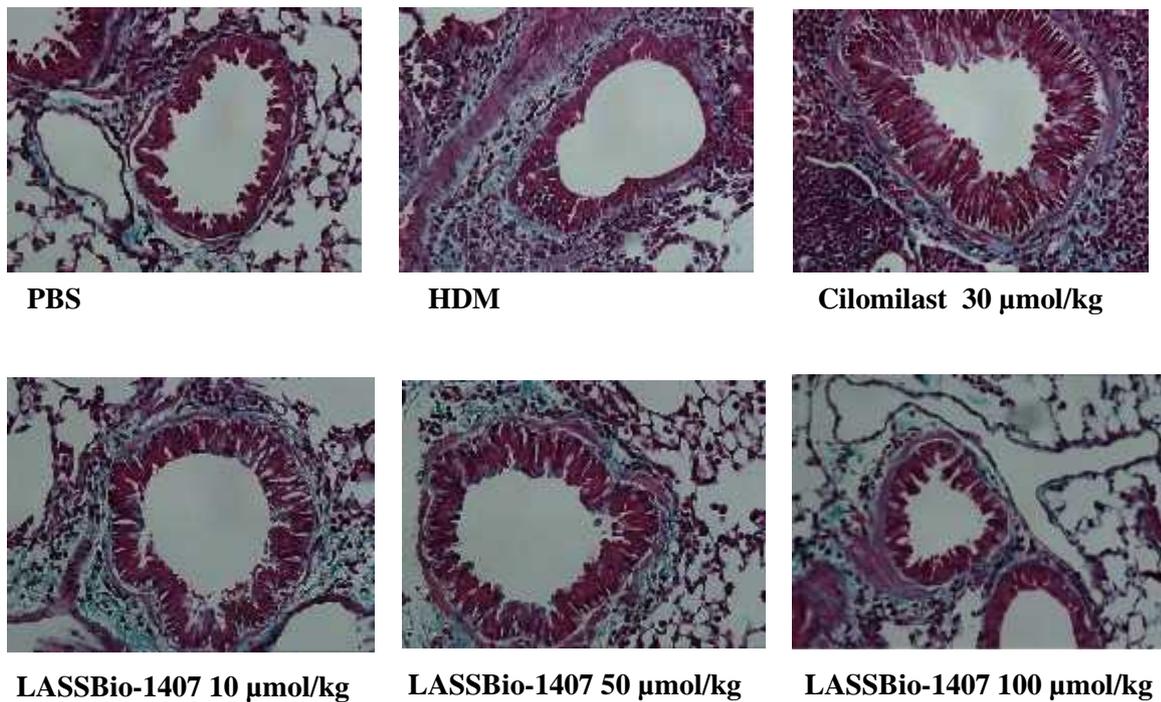


Figura 4.11. Efeito do tratamento com o LASSBio-1407 sobre a hiperreatividade das vias aéreas no modelo murino de asma induzida por HDM. O desafio antigênico promoveu um aumento de resistência (A) e elastância (B) pulmonar em resposta a concentrações crescentes de metacolina aerolizada. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 7 animais por grupo. ⁺ $P < 0,05$ em comparação com o grupo desafiado com PBS. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo desafiado com HDM e tratado com tween 80 0,2%.



PBS

HDM

Cilomilast 30 µmol/kg

LASSBio-1407 10 µmol/kg

LASSBio-1407 50 µmol/kg

LASSBio-1407 100 µmol/kg

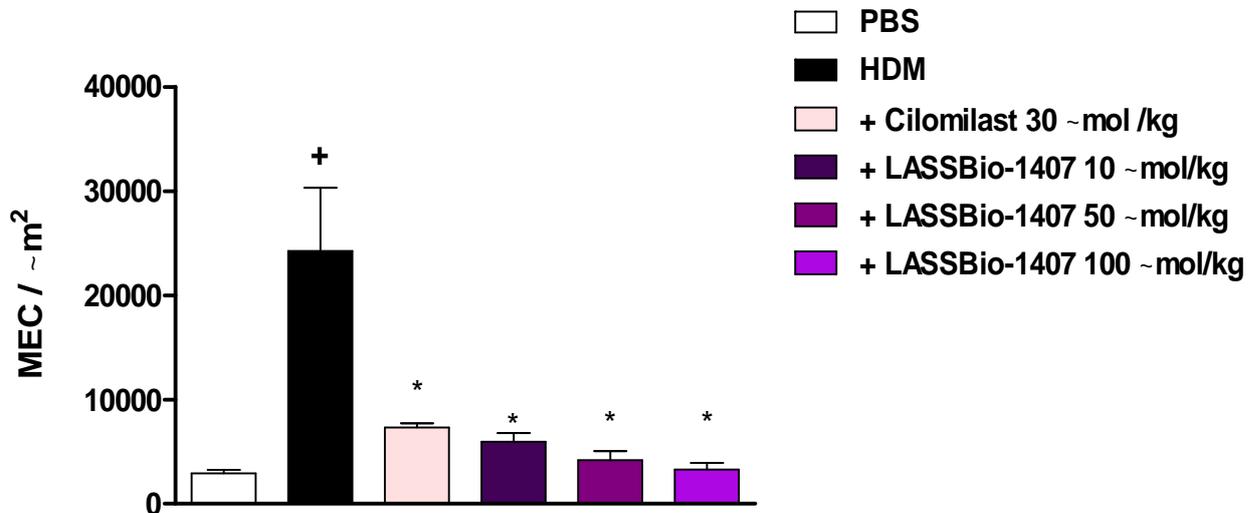


Figura 4.12. Efeito do tratamento com o LASSBio-1407 (10-100 µmol/kg) ou cilomilast (30 µmol/kg) sobre a deposição de componentes de matriz na região peribrônquiolar de camundongos desafiados com HDM. Fotomicrografias de tecido pulmonar coradas com Tricômico de Gomori. Os valores representam a média ± EPM de pelo menos 7 animais por grupo. Avaliou-se, por análise digital (image-pro®), a deposição de elementos da matriz extracelular – coloração azul - em média, 10 vias aéreas por animal. ⁺*P*<0,0001 em comparação com o grupo desafiado com PBS. **P*<0,05 em comparação com o grupo desafiado com HDM e tratado com o veículo. As micrografias são representativas de cada grupo.

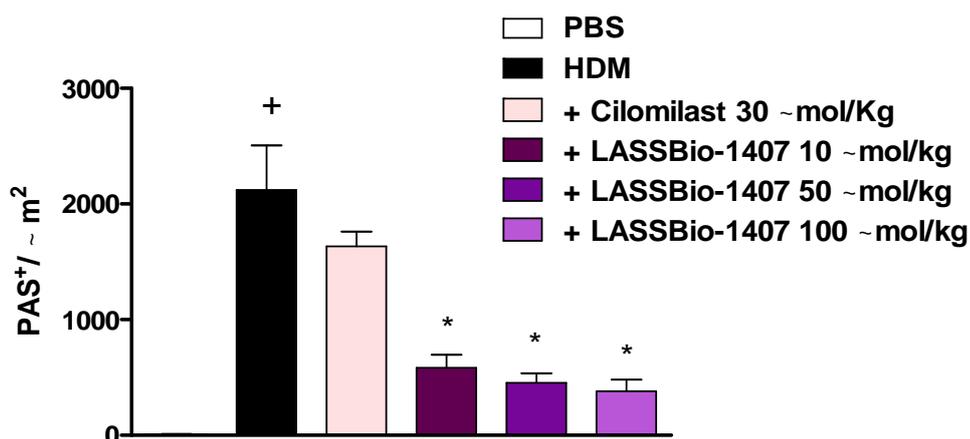
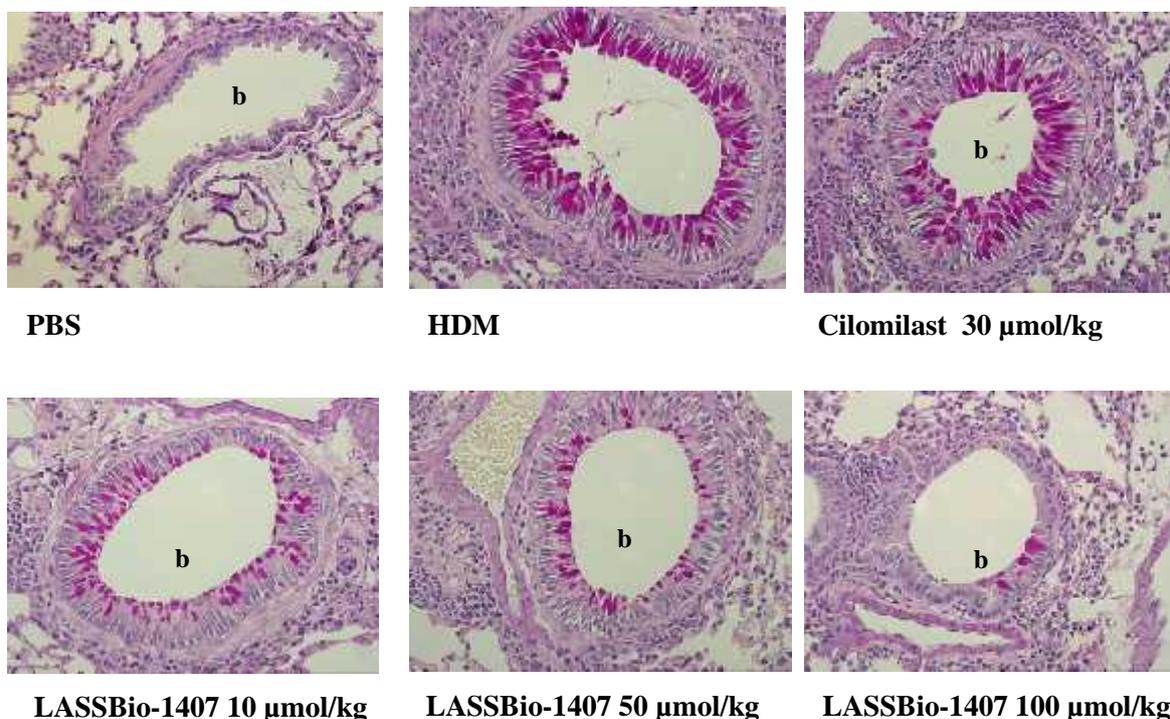


Figura 4.13. Efeito do tratamento com o LASSBio-1407 (10-100 $\mu\text{mol/kg}$) ou cilomilast (30 $\mu\text{mol/kg}$) sobre a hipersecreção de muco no modelo murino de asma induzida por HDM. Fotomicrografias de tecido pulmonar coradas com reagente de Schiff (PAS⁺). Análise quantitativa da produção de muco, em pixel por μm^2 de 6-10 vias aéreas por animal. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 7 animais por grupo. Avaliou-se, por análise digital (image-pro®), a área do epitélio ocupada por muco – coloração magenta. ⁺ $P < 0,0001$ em comparação com o grupo desafiado com PBS. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo desafiado com HDM e tratado com tween 80 0,2%. As micrografias são representativas de cada grupo.

Ademais, observamos na figura 4.14 que o tratamento por via inalatória com LASSBio-1407 (2×10^{-1} M, *aerossol*), nos últimos 6 dias de provocação alérgica, também inibiu significativamente a produção de citocinas IL-4, IL-13, IL-5 e KC; o número de células totais e eosinófilos recuperados do lavado bronco alveolar e o acúmulo de eosinófilos no tecido pulmonar (Figura 4.15), além de abolir o aumento de elastância pulmonar em resposta a concentrações crescentes de metacolina (Figura 4.15).

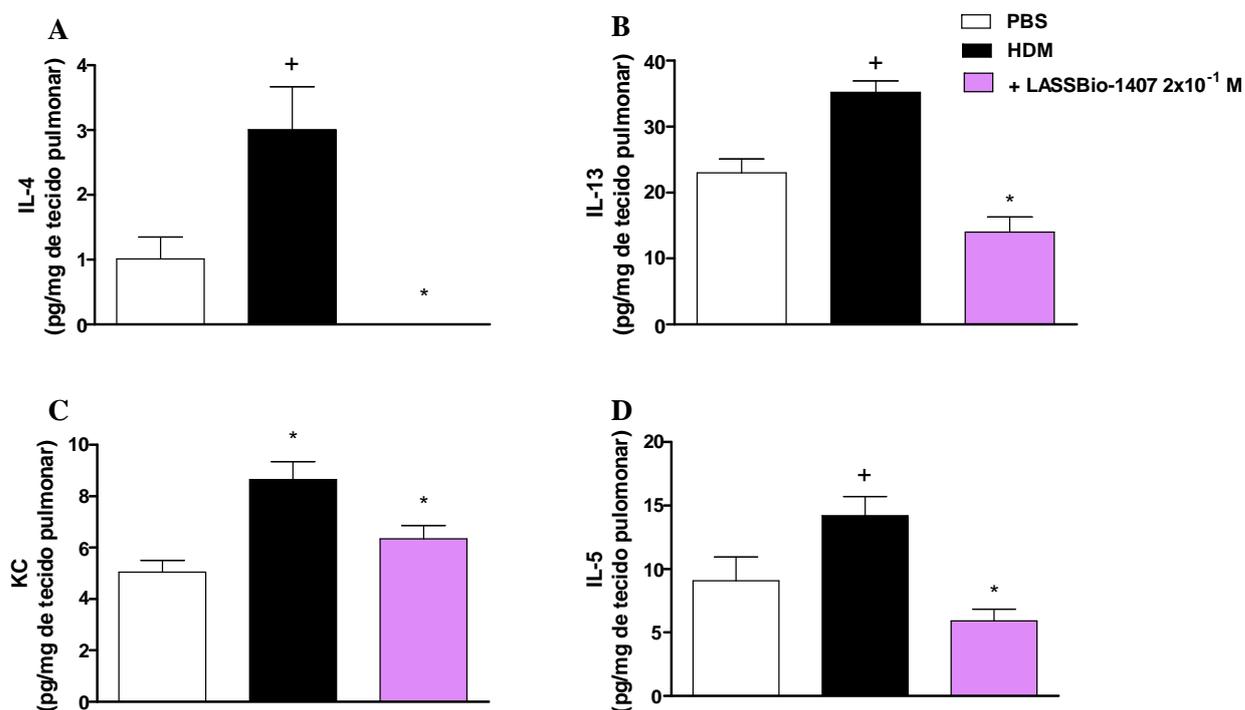


Figura 4.14 . Efeito do tratamento por via inalatória com LASSBio-1407 sobre a secreção de IL-4 (A), IL-13 (B), KC (C) e IL-5 (D) no tecido pulmonar de camundongos desafiados com extrato de HDM. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 8 animais por grupo. ⁺ $P < 0.01$ comparado ao grupo desafiado com PBS. * $P < 0.05$ comparado ao grupo desafiado com HDM e tratado com tween 80 0,2%.

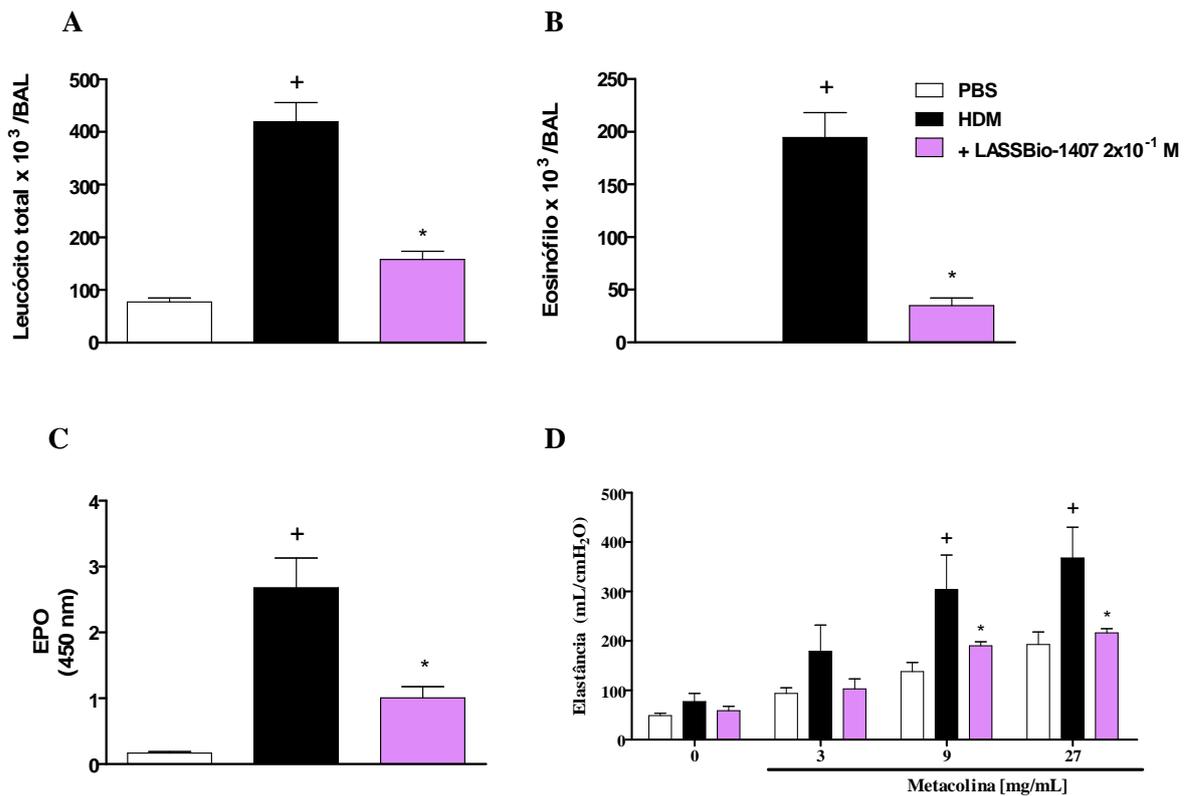


Figura 4.15. Efeito do tratamento por via inalatória com o LASSBio-1407 sobre o número de células totais (A) e eosinófilos (B) recuperados no BAL, o infiltrado eosinofílico (C) e o aumento de elastância pulmonar (D). Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos 7 animais por grupo. ⁺ $P < 0.05$ em comparação com o grupo desafiado com PBS. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo desafiado com HDM e tratado com o veículo.

4.5 – Efeito do LASSBio-1406 e LASSBio-1407 sobre a atividade de fibroblastos pulmonares *in vitro*.

A proliferação e ativação de fibroblastos no foco da lesão inflamatória é uma condição importante no estabelecimento do remodelamento adverso no tecido pulmonar e outros (Ingram, Huggins et al. 2011). Assim, determinamos o efeito do tratamento *in vitro* com LASSBio-1406 e LASSBio-1407 sobre a atividade proliferativa e secretória de fibroblastos pulmonares obtidos de pulmões de camundongos normais. Como mostrado na figura 4.16A, fibroblastos estimulados com rmIL-13 (40 ng/mL) apresentaram significativa resposta proliferativa. A estimulação com rmIL-13 aumentou também a secreção de MCP-1, comparado com o grupo não estimulado (NE) (Figura 4.16B). O tratamento com concentrações

crenças de cilomilast inibiu de forma concentração-dependente tanto a proliferação(1-100 μM) quanto a secreção de MCP-1(10-100 μM) evidenciada após estimulação com IL-13 (Figura 4.16).

Os tratamentos com os LASSBio-1406 e LASSBio-1407 (1-100 μM) reduziram a proliferação de forma concentração dependente de fibroblastos normais estimulados com rmIL-13 (Figura 4.16). A mesma figura mostra também que a função de secreção de MCP-1 foi claramente sensível aos referidos tratamentos, particularmente nas duas maiores concentrações. Ademais, a análise da viabilidade celular determinada pela técnica do MTT, mostrou que os tratamentos com os LASSBio-1406 e LASSBio-1407 nas concentrações de 1 e 10 μM foram incapazes de modificar a viabilidade dessas células. Observou-se, entretanto, um aumento de 23% e uma redução de 28% na viabilidade celular dos fibroblastos expostos à concentração mais alta (100 μM) de LASSBio-1406 e 1407, respectivamente. Por outro lado, o tratamento com cilomilast nas 3 concentrações empregadas não modificou a viabilidade celular (Figura 4.17).

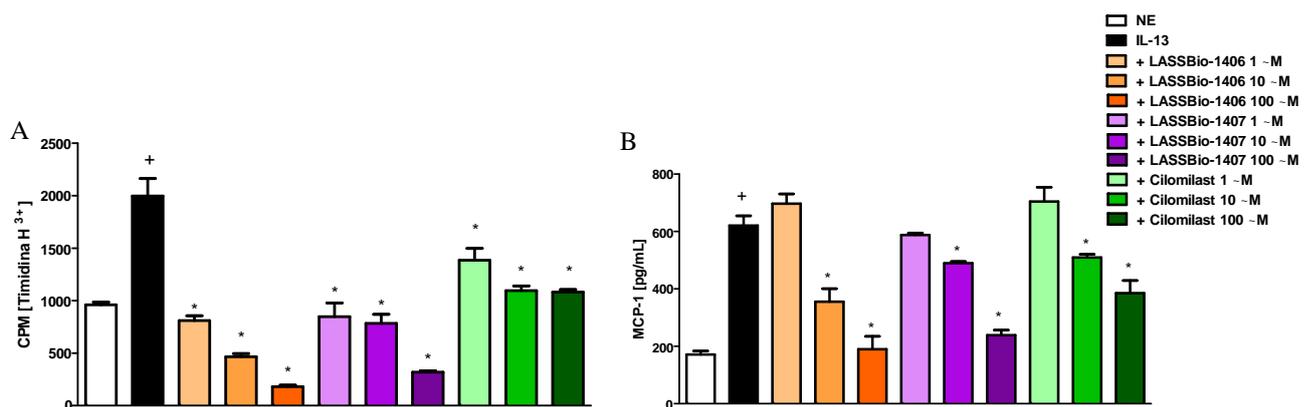


Figura 4.16. Efeito do Cilomilast, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 (1-100 μM) sobre a atividade de fibroblastos pulmonares *in vitro*. (A) taxa de proliferação de fibroblastos normais com ou sem estímulo e, na ausência ou na presença do tratamento; (B) quantidade de MCP-1 secretada *in vitro* 24 horas após o estímulo com rmIL-13. Os resultados representam a média \pm EPM de cerca de 4 poços (quadruplicada). ⁺ $P < 0,01$ em comparação com o grupo estimulado com PBS. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo estimulado com rmIL-13.

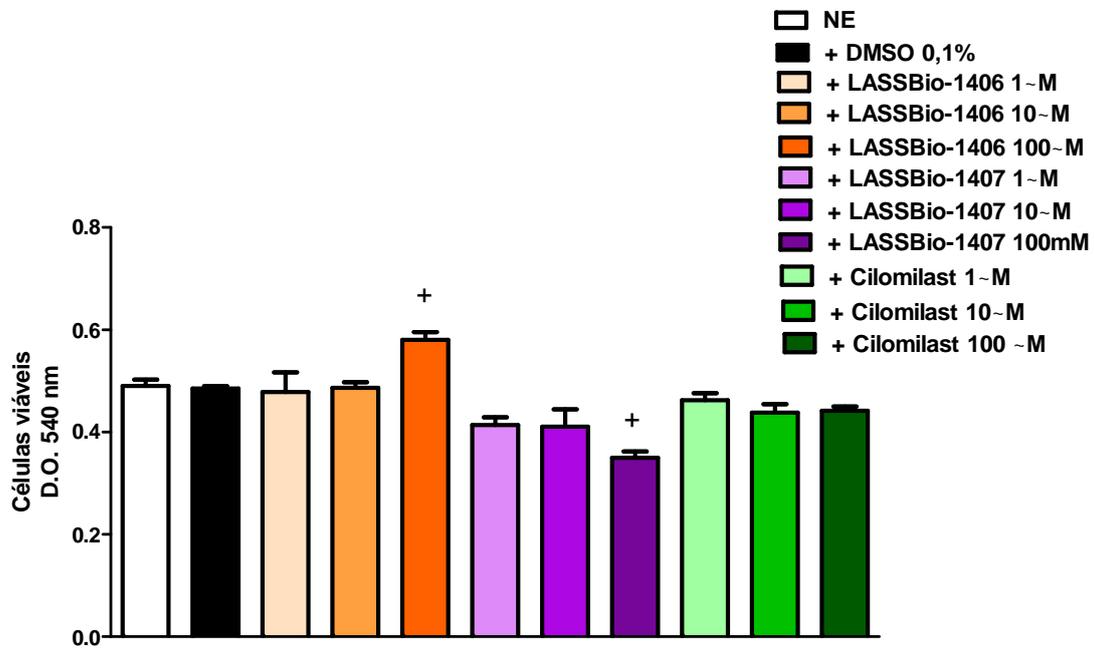


Figura 4.17. Efeito do Cilomilast, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 (1-100 μ M) sobre a viabilidade celular de fibroblastos pulmonares *in vitro*. Viabilidade celular avaliada pela redução de MTT à formosán. Células normais não-estimuladas foram incubadas com os tratamentos por 24 horas. Os resultados representam a média \pm EPM de cerca de 3 poços (triplicada). ⁺ $P < 0,05$ em comparação com o grupo estimulado DMSO 0.1 %.

4.6 – Efeito dos tratamentos com dexametasona, cilomilast, LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 sobre a função de células T *in vitro*

Células obtidas de linfonodos periféricos de camundongos DO11.10 (TCR Tg), transgênicos que expressam receptor TCR para OVA, foram utilizados na avaliação de uma potencial ação direta dos derivados NAHs sobre linfócitos. Como mostrado na figura 4.18 e tabela 4.6, o desafio com ovoalbumina aumentou significativamente a produção IL-4, IL-13, IL-5 e IFN- γ , bem como a reposta proliferativa de linfócitos. O tratamento com dexametasona (100 μ M) inibiu significativamente a produção de IL-4, IL-13, IL-5 e IFN- γ (Figura 4.18), e aboliu a resposta proliferativa de células T (Tabela 4.6).

Da mesma forma, cilomilast, LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 reduziram, de forma dependente da dose, os níveis de IL-4, IL-13, IL-5 e IFN- γ (Figura 4.18) e a resposta proliferativa de células T (Tabela 4.6). Ressalta-se que ambos LASSBio-1406 e 1407 foram mais efetivos que o cilomilast em reduzir os níveis de IL-4, IL-5 e IFN- γ , e a reposta proliferativa das células T após provocação com OVA. O tratamento com LASSBio-1406 ou LASSBio-1407, EC₅₀ 0.6 e EC₅₀ 0.7 (μ M, r^2 0.95, respectivamente), foi mais potente que o cilomilast (EC₅₀ 0.8 μ M) em inibir a reposta proliferativa de linfócitos T (Tabela 4.18).

Adicionalmente, observa-se na tabela 4.18, uma diminuição significativa da porcentagem de células T em apoptose após estimulação com OVA. O tratamento com dexametasona (100 μ M), cilomilast, LASSBio-1406 e 1407 (0.1 - 100 μ M) aumentou significativamente a porcentagem de células em apoptose após provocação antigênica. Os tratamentos com LASSBio-1406 e LASSBio-1407 foram mais potente que o cilomilast e o LASSBio-1386 em induzir a apoptose de células T (Tabela 4.18).

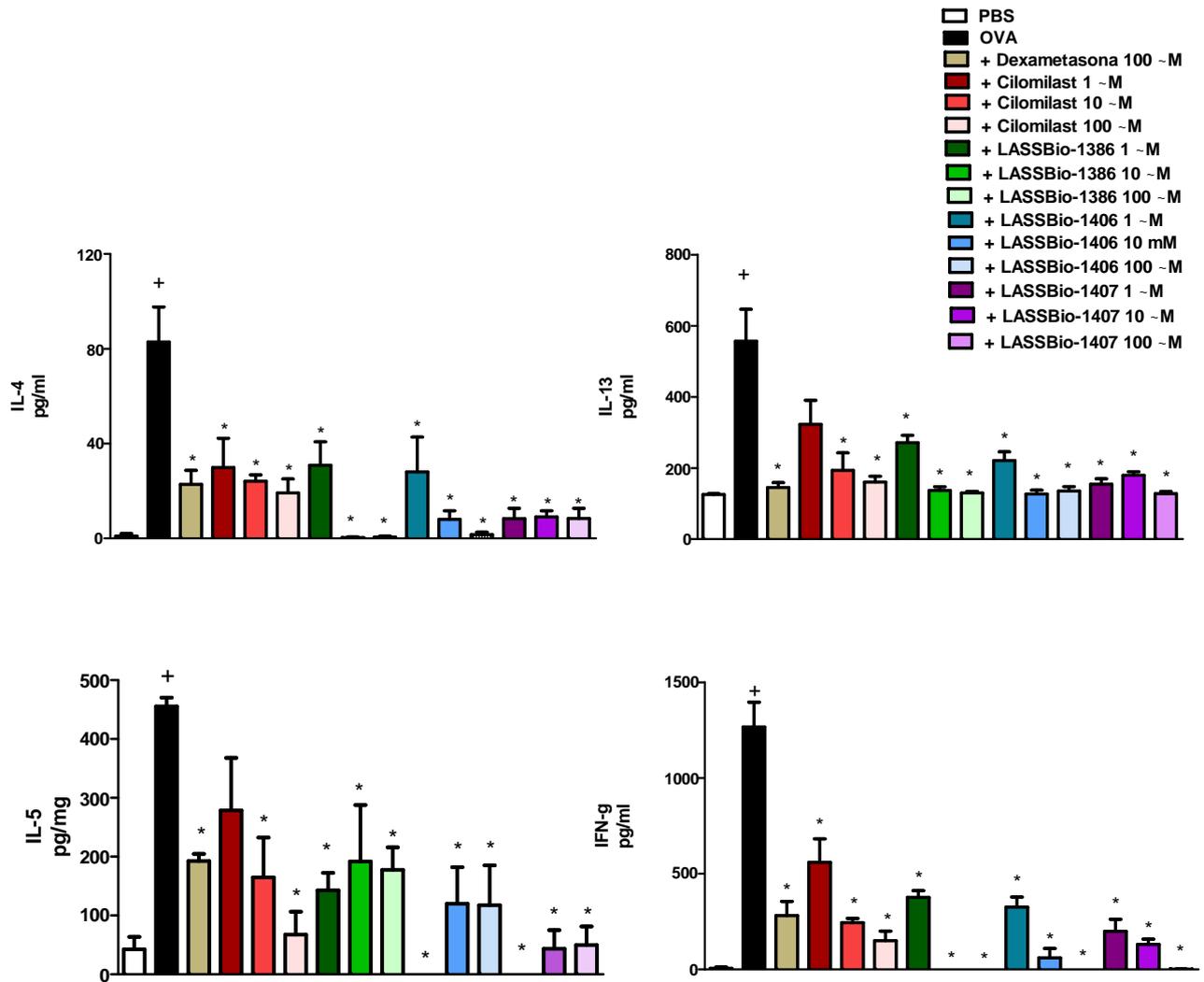


Figura 4.18. Efeito dos tratamentos *in vitro* com dexametasona, cilomilast, LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 sobre a produção de citocinas de células T naive recolhidas de nodulos linfóides de camudongos DO11.10 (transgênico) e, ativadas *in vitro* com ovoalbumina (0,5 mg/ml). Os resultados representam a média \pm EPM de células de linfonodos de 4 animais. $^+P < 0,05$ em comparação com o grupo estimulado com PBS. $*P < 0,05$ em comparação com o grupo estimulado com OVA.

Tabela 4.6. Efeito *in vitro* do tratamento com dexametasona (100 μ M), cilomilast, LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 (0.1 - 100 μ M) sobre as células T naive recolhidas de nodos linfóides de camundongos transgênicos DO11.10 e estimuladas *in vitro* ovoalbumina.

Estímulo	Tratamento	Proliferação		Apoptose	
		% de células S+G2 ^{a,b}	EC ₅₀ (nM) ^c	% de células sub-G0 ^{a,b}	EC ₅₀ (μ M) ^c
PBS	PBS	11.3 \pm 1.5	-----	86.1 \pm 2.1	-----
OVA	DMSO 0,1 %	24.4 \pm 1.1 ⁺	-----	40.0 \pm 3.3 ⁺	-----
	+ Dexametasona	8.7 \pm 0.6 [*]	-----	78.3 \pm 2.3 [*]	-----
	+ Cilomilast	7.8 \pm 1.1 [*]	0.8	77.6 \pm 3.3 [*]	1.2
	+ LASSBio-1386	7.4 \pm 1.4 [*]	2.1	83.0 \pm 4.4 [*]	3.5
	+ LASSBio-1406	6.1 \pm 1.0 [*]	0.6	85.6 \pm 1.8 [*]	0.8
	+ LASSBio-1407	6.2 \pm 1.4 [*]	0.7	82.4 \pm 1.8 [*]	0.6

^aPercentagem de células em estado proliferativo (S+G2) ou passando pela fragmentação do DNA (sub-G0) foi determinada com coloração de iodeto de propídeo (citometria de fluxo) na presença ou ausência dos tratamentos (100 μ M), 72 horas após a incubação com ovoalbumina (0.5 mg/ml);^bOs valores representam a média \pm EPM de linfonodos de pelo menos 4 animais.^cEC₅₀ foi calculada por regressão linear (coeficiente de correlação r = 0.96) e representam o valor médio de cinco determinações (0.1 - 100 μ M), o erro experimental é por volta de 10 %.⁺ P<0,01 quando comparado com o grupo de células não-estimuladas; ^{*} P<0,01 quando comparado com o grupo de células estimuladas com OVA.

4.7 – Efeito do LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 em teste de atividade pró-emética em roedores

Inibidores de PDE4 induzem vômito ativando vias noradrenérgicas no sistema nervoso central, o que levou o estabelecimento de um modelo experimental alternativo para avaliação de atividade pró-emética de compostos candidatos à fármacos em ratos e camundongos (Robichaud, Savoie et al. 2001; Robichaud, Savoie et al. 2002). A figura 4.19 mostra que, ao contrário do rolipram, os tratamentos com os derivados NAHs, LASSBio-1406, LASSBio-1407 e LASSBio-1386 (30-200 $\mu\text{mol/kg}$), não reduziram o tempo de sono induzido pela associação de ketamina e xilazina. É importante ressaltar que, nessas condições de anestesia geral, o tempo de sono está associado à diminuição dos níveis de AMPc em neurônios da região x que leva à redução da atividade da via noradrenérgica. Portanto, o aumento dos níveis de AMPc nessa região, como fazem rolipram e todos os inibidores de PDE4 disponíveis, vai no sentido contrário, reduzindo o tempo de sono dos animais. Este é o fundamento essencial do presente teste (Robichaud, Savoie et al. 2001; Robichaud, Savoie et al. 2002).

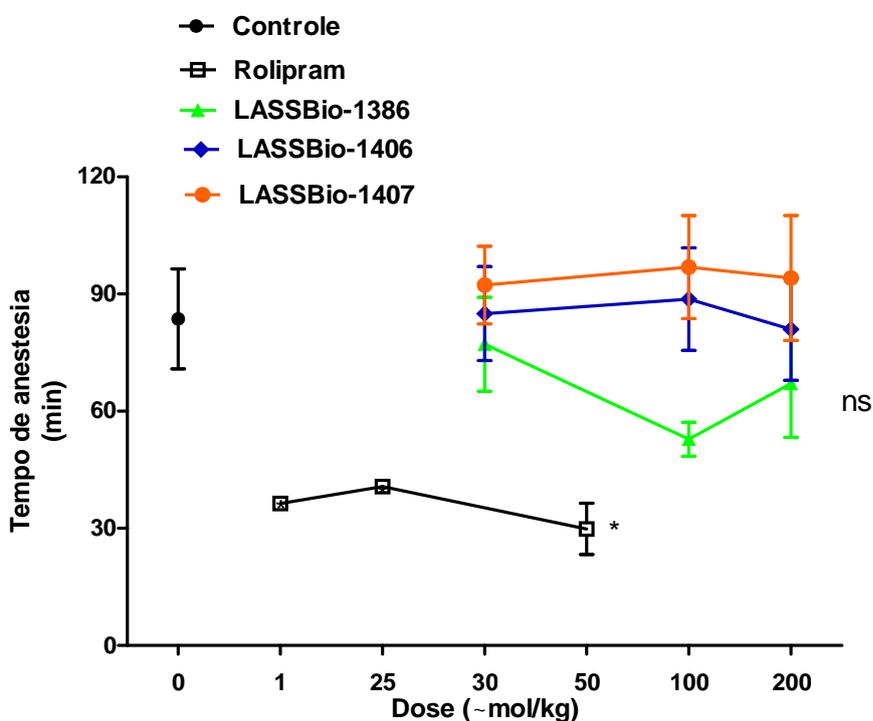


Figura 4.19. Efeito do tratamento com o LASSBio-1386, LASSBio-1393, LASSBio-1406 LASSBio-1407 (30-200 $\mu\text{mol/kg}$) ou rolipram (1-50 $\mu\text{mol/kg}$) sobre aduração da anestesia induzida pela combinação de xilazina (10 mg/kg) e ketamina (70 mg/kg). A duração da anestesia foi analisada pelo retorno dos reflexos, saindo da posição de decúbito dorsal. Os resultados representam a média \pm EPM (n=10 animais/grupo). * $P < 0,01$ em comparação com o grupo controle.

V – Discussão

Inibidores de PDE4 atuam aumentando as concentrações intracelulares de AMPc, um segundo mensageiro com várias ações anti-inflamatórias em células efetoras envolvidas na patogênese da asma e DPOC. De fato, há evidências de que tais inibidores sejam capazes de bloquear o recrutamento e ativação de diversos leucócitos, incluindo mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, macrófagos e neutrófilos, além de inibirem a hiperplasia e hipertrofia de células estruturais, o que tem atraído considerável interesse como alternativa no tratamento de doenças respiratórias (Barnes 2004; Lipworth 2005; Siddiqui, Redhu et al. 2013). Assim, nesta tese, avaliamos as propriedades farmacológicas de uma nova série de derivados *N*-metil-*N*-acilhidrazônicos (NAHs), inibidores da PDE4, em modelos experimentais de inflamação pulmonar e asma, tendo os inibidores da PDE4, rolipram e cilomilast, como fármacos de referência.

Esforços consideráveis têm sido realizados, nas últimas décadas, no sentido de se desenvolver modelos experimentais que reproduzam as alterações patológicas evidenciadas na asma e DPOC observadas em humanos. Apesar de inúmeras limitações, graças a eles, houve nas últimas décadas um incremento bastante significativo na compreensão de eventos-chaves, e identificação de potenciais alvos terapêuticos associados ao desenvolvimento de doenças inflamatórias pulmonares agudas e crônicas (Bates, Rincon et al. 2009; Corazza and Kaufmann 2012). Spond e cols. apresentaram evidências de que a inflamação pulmonar induzida por LPS resulta em um quadro de alterações fisiopatológicas marcado por neutrófilia, ativação de macrófagos e hiper-reatividade das vias aéreas. Em muitos aspectos, este quadro é bastante similar àquele notado em pacientes com DPOC (Spond, Billah et al. 2004). Em linha com esses achados, demonstramos que a provocação intranasal com LPS induziu um aumento significativo nos níveis de TNF- α e IL-6 no tecido pulmonar, combinado ao influxo de neutrófilos e hiper-reatividade das vias aéreas (Spond, Chapman et al. 2001).

O TNF- α e a IL-6 são armazenados em grânulos e liberados durante a resposta alérgica por monócitos e macrófagos (Huaux 2007). Níveis elevados de TNF- α e IL-6 são frequentemente observados no lavado broncoalveolar de pacientes com asma/DPOC e estão relacionados com a severidade do quadro. O aumento dos níveis intracelulares de AMPc em monócitos, macrófagos e mastócitos leva à inibição da secreção e síntese TNF- α e IL-6 (Deng, Xie et al. 2006; Yang, Kumar et al. 2012;

Sismanopoulos, Delivanis et al. 2013). Como esperado, os tratamentos com rolipram e o cilomilast, conhecidos inibidores da PDE4, inibiram a produção de TNF- e IL-6 (Sanz, Cortijo et al. 2007; Tang, Lu et al. 2010). Observamos também, que os tratamentos com os LASSBio-1366, LASSBio-1372, LASSBio-1379, LASSBio-1386, LASSBio-1406 e LASSBio-1407 foram tão eficazes quanto o rolipram em inibir a produção destas citocinas no tecido pulmonar induzida por LPS. É interessante notar que o ranking de potência dos compostos avaliados difere daquele observado quando os mesmos compostos foram testados *in vitro*, utilizando-se células mononucleares obtidas do sangue periférico de indivíduos saudáveis, quando o LASSBio-1393 foi o derivado mais potente (Tabela 1.1). A falta de atividade *in vivo* do LASSBio-1393, apesar da alta capacidade de inibir a enzima PDE4 e a geração de TNF- (IC₅₀ = 50 nM e EC₅₀ = 520 nM, respectivamente), pode ser devido às suas propriedades físico-químicas, incluindo permeabilidade nas células alvo e/ou biodisponibilidade.

O infiltrado de neutrófilos nas vias aéreas é um achado bastante frequente em pacientes com asma grave e DPOC, associado com o aumento da disfunção de vias respiratórias, hipersecreção de muco, dano e remodelamento tecidual (Spond, Billah et al. 2004; Mauad and Dolhnikoff 2008). Roflumilast, segunda geração de inibidores de PDE4, inibe quimiotaxia de várias células inflamatórias, ativação de leucócitos e a produção de citocinas *in vitro* e em vários modelos animais de asma e DPOC, além de reduzir o número de neutrófilos e eosinófilos presentes no escarro de pacientes com DPOC (Lipworth 2005; Boswell-Smith and Spina 2007; Giembycz and Field 2010). Nossos resultados demonstraram que o rolipram (45 µmol/kg, *v.o.*) e cilomilast (10 µmol/kg, *v.o.*) reduziram a neutrofilia pulmonar induzida por LPS em 70% e 43%, respectivamente. A inibição máxima do rolipram sobre neutrofilia pulmonar foi similar àquela evidenciada por outros potentes inibidores de PDE4, a exemplo do roflumilast, em modelos de inflamação induzida por LPS (Spond, Chapman et al. 2001; Lagente, Martin-Chouly et al. 2005). De forma similar ao observado para rolipram e cilomilast, o tratamento com os derivados NAHs inibiram significativamente o aumento no número de neutrófilos recuperados no lavado bronco alveolar (50% a 77%), além de reduzirem o número de células mononucleares e eosinófilos (dados não mostrados).

Ademais, a instilação de LPS nas vias aéreas de camundongos leva sabidamente a um quadro de hiper-reatividade pulmonar inicial que independe da produção de citocinas e infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar (Spond, Chapman et al. 2001). Mostramos que os derivados NAHs, assim como o cilomilast e

rolipram, são capazes de prevenir a hiper-reatividade induzida por LPS. Os resultados revelaram que os derivados NAHs apresentam, com pequenas distinções, respostas similares as observadas para os inibidores de PDE4 sobre a inflamação induzida por LPS (Fan Chung 2006), sugerindo que os derivados NAHs podem apresentar propriedades anti-inflamatórias similares aos compostos de referência.

A asma é frequentemente definida como uma desordem inflamatória eosinofílica associada à hiper-responsividade brônquica. A eficácia de inibidores de PDE4 em antagonizar a eosinofília induzida por múltiplos desafios foi demonstrada em diversos protocolos de pré-tratamento, porém a eficácia desses compostos em condições onde o quadro inflamatório e o remodelamento pulmonar adverso tenham sido instalados é menos estudada (Raeburn, Underwood et al. 1994; Torphy, Barnette et al. 1994; Hamid and Tulic 2009; Poon, Eidelman et al. 2012). No presente estudo, utilizamos um modelo murino de asma induzida por desafios sequenciais de ovoalbumina, no qual aspectos cruciais da patogenia da asma já estão presentes a partir da 2ª provocação antigênica que acontece em intervalo de 7 dias. Tais alterações patológicas incluem, intenso infiltrado leucocitário, hipersecreção de muco e aumento da deposição de componentes de matriz, além da hiper-responsividade das vias aéreas em resposta à metacolina (Cardozo SVS, dissertação de mestrado, 2010).

Estudos anteriores têm demonstrado a importância da secreção de citocinas e quimiocinas, como IL-4, IL-13, IL-5 e eotaxina, produzidas após estimulação antigênica no desenvolvimento da inflamação pulmonar, hiper-reatividade das vias aéreas e remodelamento tecidual (Fulkerson, Rothenberg et al. 2005; Wechsler, Fulkerson et al. 2012). Em nossas condições, observamos que o tratamento terapêutico com os derivados NAHs mostrou-se claramente mais eficiente que o rolipram em inibir a produção de citocinas e quimiocinas, bem como o influxo de eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar de camundongos desafiados com OVA. Estudos anteriores mostraram que a administração sistêmica de rolipram inibiu a liberação de citocinas e quimiocinas produzidas por células T_H2 ativadas, células epiteliais, eosinófilos, basófilos e mastócitos (Raeburn, Underwood et al. 1994; Spond, Chapman et al. 2001; Bopp, Dehzad et al. 2009). Similarmente, o tratamento com roflumilast foi capaz de reduzir a resposta de fase tardia, através da diminuição significativa da secreção de citocinas e quimiocinas no sítio da inflamação (Bundschuh, Eltze et al. 2001; Wollin, Bundschuh et al. 2006). Nas condições empregadas em nosso laboratório, o tratamento com rolipram aboliu a hiper-

reatividade das vias aéreas, mas falhou em inibir de forma significativa o influxo de eosinófilos, a deposição de componentes de matriz e a hipersecreção de muco provocada pelo desafio alergênico. Por outro lado, pudemos constatar que o tratamento com os derivados NAHs inibiram de forma significativa o influxo de eosinófilos, a deposição de componentes de matriz (exceção do LASSBio-1366) e a hiper-reatividade das vias aéreas. Contudo, apenas os compostos LASSBio-1406 e LASSBio-1407 foram capazes de reverter, de forma significativa, a hipersecreção de muco em resposta ao desafio alérgico neste modelo.

Fatores como a inflamação, espessamento da camada subepitelial, aumento da produção de muco, liberação de mediadores inflamatórios e aumento da permeabilidade vascular estão associados à hiper-responsividade e à obstrução das vias aéreas (Hamid and Tulic 2009; Poon, Eidelman et al. 2012). Estudos prévios indicam que o tratamento preventivo com o rolipram exerce um efeito direto sobre a adesão de eosinófilos nas células endoteliais inibindo o influxo dessa célula e a hiperplasia/metaplasia das células produtoras de muco em modelos de inflamação aguda (Torphy, Barnette et al. 1994; Kanehiro, Ikemura et al. 2001). Esses resultados vão de encontro aos nossos já que, em nossas condições, o rolipram mostrou-se incapaz de inibir o infiltrado eosinofílico e outras alterações patológicas, incluindo a produção de muco e fibrogênese. Essa diferença de eficácia muito provavelmente está relacionada ao fato de termos feito o tratamento depois do quadro fisiopatológico ter sido instalado. De fato, vários estudos evidenciam respostas diferentes dos inibidores de PDE4 sobre os componentes da inflamação dependendo do tratamento ocorrer de forma preventiva ou terapêutica (Germain, Bertin et al. 1998; Kumar, Herbert et al. 2003; Leclerc, Lagente et al. 2006; Nenan, Lagente et al. 2007; Spina 2008; Matera, Page et al. 2014). Ressalta-se que o tratamento terapêutico com os derivados NAHs, principalmente o LASSBio-1406 e LASSBio-1407, reduziu substancialmente a eosinofília pulmonar, a fibrose subepitelial e a hipersecreção de muco, em condições nas quais o rolipram foi ineficaz. Essas observações podem ter implicações clínicas relevantes, sugerindo que os derivados NAHs, especialmente os LASSBio-1406 e LASSBio-1407 modulam não só a migração de células para as vias aéreas, mas provavelmente também conseguem regular negativamente a sua ativação no sítio da inflamação, e/ou outros eventos decorrentes dessa ação efetora no desenvolvimento do complexo quadro patológico da reposta asmática.

Vários autores deixam claro a importância de serem utilizados, nos modelos experimentais de asma, agentes antigênicos que sejam mais relevantes do ponto de vista clínico (Corazza and Kaufmann 2012). Dentro desse aspecto, o ácaro caseiro (HDM) é reconhecidamente um dos mais importantes desencadeadores de resposta asmática em todo o mundo. A ação fortemente pró-alérgica do HDM deve-se, em grande parte, a sua atividade proteásica (Cheng, Lee et al. 1998; Ulrich, Hincks et al. 2008; Blacquiere, Hylkema et al. 2010; Fattouh, Al-Garawi et al. 2011). Observamos que a sequência de desafios intranasais com HDM durante 3 semanas promoveu inflamação das vias aéreas, evidenciada pelo aumento no número de leucócitos totais e eosinófilos recuperados no lavado broncoalveolar. O fenômeno foi acompanhado por marcada hiper-responsividade brônquica e intenso remodelamento tecidual adverso, em linha com vários outros estudos prévios (Cheng, Lee et al. 1998; Ulrich, Hincks et al. 2008; Goldklang, Perez-Zoghbi et al. 2013).

Existem poucos estudos acerca dos efeitos de inibidores de PDE4 em modelos de inflamação induzida por HDM. Underwood e cols demonstraram que o inibidor de PDE4 cilomilast (SB207499) é capaz de reduzir a broncoconstrição e o influxo de células inflamatórias após provocação com HDM (Brown 1999). Assim, baseados nos resultados obtidos até o momento, investigamos o efeito do tratamento oral com doses crescentes de LASSBio-1407 (10 - 100 $\mu\text{mol/kg}$) sobre aspectos cruciais da inflamação alérgica induzida por HDM, em comparação com o cilomilast. Observamos que o tratamento oral com o cilomilast foi capaz de inibir a produção de IL-4, IL-13 e IL-17, mas falhou em modificar os níveis de IL-5 e KC. Além de reduzir drasticamente o acúmulo de eosinófilos e neutrófilos, a hiper-reatividade das vias aéreas e a deposição de componentes de matriz extracelular. Entretanto, mostrou-se incapaz de inibir significativamente a produção aumentada de muco nas vias aéreas de camundongos desafiados com HDM. Por outro lado, o tratamento com LASSBio-1407 inibiu de forma dose-resposta a secreção de citocinas e quimiocinas, o acúmulo de eosinófilos e neutrófilos no BAL, o aumento de resistência e elastância pulmonar, além inibir significativamente a deposição de componentes de matriz na região peribrônquilar e a hipersecreção de muco.

O muco atua como um sistema de defesa primário nas vias aéreas, favorecendo a eliminação de agentes patogênicos (Lambrecht and Hammad 2012). Contudo, a excessiva produção de muco causa o declínio da função pulmonar, através da limitação do fluxo de ar em pacientes com asma. Secções de tecido pulmonar obtidas de pacientes que morreram de asma apresentam um aumento de 20 vezes do

número de células caliciformes nas vias aéreas periféricas, quando comparadas às aquelas obtidas de indivíduos saudáveis. Além disso, a quantidade de muco intraluminal mostra-se marcadamente aumentada em pacientes com asma fatal. Sabe-se que a inflamação estimula a ativação do receptor de crescimento epidermal (EGF) nas células ciliares, e juntamente com a ligação de IL-13 promove a diferenciação destas em células caliciformes através da ação coordenada de fatores de transcrição. Isto leva ao aumento da expressão de MUC5AC e de proteínas de membrana que culminam na hipersecreção de muco (Cohn, Elias et al. 2004; Jarjour, Erzurum et al. 2012; Lambrecht and Hammad 2012). Roflumilast atenua a expressão do RNA mensageiro para MUC5AC induzido por EGF em cultura de células epiteliais humanas, sugerindo que os inibidores de PDE4 possam suprimir a secreção de muco em doenças do trato respiratório (Boswell-Smith and Spina 2007). De fato, estudos mostram que o roflumilast consegue atenuar, na maioria dos casos, a hipersecreção de muco em pacientes com DPOC (Bousquet, Aubier et al. 2006). Evidenciamos que o LASSBio-1406 e LASSBio-1407 inibem a hipersecreção de muco em diferentes protocolos experimentais de inflamação pulmonar (OVA e HDM), sugerindo que estes compostos apresentam efeitos similares aos observados para vários inibidores de PDE4 na literatura. Contudo, não descartamos a hipótese de que outros mecanismos possam estar igualmente envolvidos, nos efeitos observados para esses compostos nos modelos empregados em detrimento dos demais. De fato no que diz respeito aos derivados NAHs há evidências que outros alvos poderiam estar igualmente envolvidos, o que poderia justificar a eficácia desses derivados em inibir os diferentes aspectos da resposta asmática, mesmo quando potentes inibidores de PDE4 mostram-se inativos.

Teofilina promove a apoptose de eosinófilos e neutrófilos *in vitro* através da inibição da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Fan Chung 2006). Este efeito não é mediado pela inibição de uma enzima fosfodiesterase mas, pelo menos em neutrófilos, parece ser mediado por uma ação em receptores de adenosina. Alencar e cols. evidenciaram os efeitos do LASSBio-1359 sobre a hipertensão pulmonar, deixando claro uma marcada atividade agonista no receptor de adenosina A_{2A} (Alencar, Pereira et al. 2013). A adenosina é um importante intermediário da síntese das purinas e do metabolismo energético. Vários estudos evidenciam o papel da adenosina no remodelamento tecidual pulmonar, além de importante modulador da inflamação (Hasko and Pacher 2008; Wilson 2008; Folkesson, Kuzenko et al. 2012).

Estudos mostram que substituições simples, principalmente dentro de uma mesma família de moléculas, podem transformar um agonista em antagonista, aumentar a potência, a eficácia e até aumentar ou reduzir os efeitos adversos (da Costa, Olsen et al. 2007; Romeiro, da Silva Ferreira et al. 2011; Braga, Alves et al. 2012; Kummerle, Schmitt et al. 2012), sugerindo que os derivados NAHs podem estar exercendo seus efeitos através de outros mecanismos que independem da inibição da PDE4. Ademais, o LASSBio-1406 e LASSBio-1407 inibem a PDE3 ($IC_{50} = 4.5 \mu M$ e $IC_{50} = 6.2 \mu M$, respectivamente) (Kummerle, Schmitt et al. 2012). Estudos clínicos comprovam que a combinação dual da inibição da PDE3 e da PDE4 suprime as contrações espasmogênica do músculo liso das vias aéreas de forma sinérgica em humanos (Abbott-Banner and Page 2014). Os inibidores PDE3/PDE4 ativam a secreção de CL^- mediada por um canal de cloreto (CFTR), sugerindo que eles possam ser capazes de estimular a depuração mucociliar (Abbott-Banner and Page 2014). Enfim, a maneira pela qual os LASSBio-1406 e LASSBio-1407 revertem alterações patológicas cruciais da asma, nesses modelos experimentais, precisam ser melhor investigadas no futuro.

Nas últimas décadas, a importância de células inflamatórias e estruturais na patogênese da asma tem sido cada vez mais reconhecida e o efeito inibitório dos fármacos na diferenciação, ativação e migração dessas células tornou-se um aspecto mecanístico de extrema relevância na busca de novos tratamentos, além de contribuir para o melhor entendimento de várias terapias correntes (Wark and Gibson 2006; Parulekar, Alobaidy et al. 2013). Sabe-se, por exemplo, que a proliferação e ativação de fibroblastos no foco da lesão inflamatória é uma condição importante no estabelecimento do remodelamento adverso no tecido pulmonar (Ingram, Huggins et al. 2011). No presente estudo, demonstrou-se que o tratamento com LASSBio-1406 ou LASSBio-1407 inibiu a deposição de componentes de matriz, seja em condições de provocação alérgica com ovoalbumina, seja após exposição ao HDM. Estudos prévios demonstraram que os inibidores de PDE4 cilomilast e rolipram podem atenuar o remodelamento tecidual através da inibição do recrutamento de fibroblastos e bloqueio da geração da metaloproteinase MMP-9 (Martin-Chouly, Astier et al. 2004). Em nosso estudo, os tratamentos com LASSBio-1406 e LASSBio-1407, assim como o próprio cilomilast, inibiram a resposta proliferativa de fibroblastos induzida por IL-13 *in vitro*, sem afetar a viabilidade destas células. Ademais, demonstrou-se também que os referidos compostos inibem a atividade secretória de fibroblastos em cultura, evidenciado pela redução da secreção de MCP-1, uma quimiocina chave na

quimiotaxia de macrófagos e monócitos. Esses resultados sugerem que a inibição da fibrose peribrônquica observada após tratamento com LASSBio-1406 e LASSBio-1407 está, muito provavelmente, relacionada à inibição direta dos mecanismos de recrutamento e ativação de fibroblastos no tecido pulmonar.

Tendo em vista o impacto fisiopatológico das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 no contexto da asma, fica evidente o entendimento de que os tratamentos farmacológicos capazes de inibir a produção de tais citocinas têm potencialidade terapêutica no contexto da doença (Hamid and Tulic 2009). Os linfócitos CD4 T_h2 infiltrantes no foco da lesão são as principais fontes dessas citocinas, e vários tratamentos exitosos em modelos experimentais de asma estão relacionados, direta ou indiretamente, relacionados com a capacidade de reduzir ou abolir a produção de citocinas de perfil T_h2 (Caramori, Ito et al. 2004). O fármaco teofilina induz a apoptose de linfócitos T através de um mecanismo dependente da inibição PDE4 (Barnes 2010). Vale notar que a inibição da função de células T_h2 não é o único mecanismo pelo qual esses inibidores atuam. Eles agem também aumentando a capacidade supressora de células Treg.

A ativação antigênica do receptor de células T (TCR) promove aumento transitório dos níveis de AMPc, o que inibe a sinalização a menos que haja co-estimulação, reduzindo os níveis intracelulares de AMPc, permitindo a amplificação da sinalização induzida pelo antígeno. Estudos demonstram que o aumento dos níveis intracelulares de AMPc reduz a proliferação e secreção de citocinas pela célula T, além de aumentar a expressão de molécula inibidora CTLA-4, aumentando anergia de células T em repouso. O contínuo aumento de AMPc, também está associado com a ativação de caspase-8 (Jin and Conti 2002; Bjorgo and Tasken 2006; Bopp, Dehzad et al. 2009). No presente estudo, utilizando células dos linfonodos dos camundongos DO11.10 desafiadas antigenicamente *in vitro*, demonstramos que os compostos LASSBio-1406 e LASSBio-1407, assim como cilomilast, foram capazes de inibir a resposta proliferativa e a secreção de citocinas de linfócitos T, além de intensificar a apoptose dessas células ativadas antigenicamente *in vitro*. Em conjunto, esses achados sugerem que pelo menos parte dos efeitos antiasmáticos evidenciados pelos compostos LASSBio-1406 e LASSBio-1407 passam pelo bloqueio da função e sobrevivência de células T.

O inibidor de PDE4 roflumilast, único representante da classe empregado na clínica, apresenta eficácia reconhecida no tratamento da asma e DPOC, mas a sua utilização em larga escala é limitada pelos efeitos adversos de náuseas e vômitos (Fan

Chung 2006). O principal desafio no desenvolvimento de uma nova geração de inibidores de PDE4 é, sem dúvida, melhorar o índice terapêutico desses compostos (Lipworth 2005). Várias abordagens visando a otimização dessa classe de fármacos vêm sendo empregadas, dentre elas o desenho de inibidores seletivos para os subtipos de PDE4 (Kodimuthali, Jabarís et al. 2008). Dados da literatura demonstraram que camundongos deficientes de PDE4D apresentam redução do tempo de indução do sono na anestesia induzida por ketamina e xilazina, comportamento correlacionado com os efeitos eméticos em roedores e com o antagonismo de alfa-2 adrenérgico no sistema nervoso central. O fenômeno não é reproduzido em camundongos deficientes da isoforma PDE4B, principal subtipo associado aos efeitos anti-inflamatórios (Robichaud, Savoie et al. 2002; Robichaud, Stamatiou et al. 2002; Fan Chung 2006), sugerindo a possibilidade efetiva de dissociação entre efeitos desejáveis e indesejáveis. Por outro lado, os inibidores de PDE4 desenvolvidos até o momento, incluindo rolipram, cilomilast e roflumilast, apresentam igual afinidade de ligação nos 4 subtipos do PDE4 já caracterizados (Kodimuthali, Jabarís et al. 2008). Ao contrário, de forma bastante interessante, os derivados NAHs mostraram-se incapazes de alterar significativamente o tempo de anestesia induzido por ketamina e xilazina, sugerindo que esses compostos seriam desprovidos de atividade pró-emética, o que lhes agrega grande vantagem terapêutica quando comparados aos agentes inibidores de PDE4 desenvolvidos até o momento.

Outro aspecto interessante que pode minimizar efeitos colaterais adversos relacionados ao uso clínico de inibidores de PDE4 é o emprego do tratamento localizado na via aérea (Currie, Alluri et al. 2007; Currie, Butler et al. 2008). Observamos que o tratamento com o composto LASSBio-1407 aerossolizado inibiu de forma significativa a produção de citocinas, o influxo de eosinófilos no BAL e no tecido pulmonar, bem como a hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos desafiados com HDM. Esses achados abrem, portanto, a perspectiva interessante de se utilizar esse composto em condições de aerossolização, minimizando ainda mais possíveis efeitos adversos que possam estar associados a esse tratamento.

Neste estudo, investigamos as propriedades farmacológicas de uma nova série de derivados NAHs em diferentes modelos experimentais de asma, visando definir o potencial terapêutico desses derivados no controle da asma. O tratamento com os derivados NAHs, principalmente o LASSBio-1406 e o LASSBio-1407, bloqueou eventos cruciais da patogênese da asma nos diferentes modelos experimentais empregados provavelmente pela redução da liberação de citocinas T_H2 e a inibição

das funções e sobrevivência de linfócitos T e fibroblastos. Os LASSBio-1406 e LASSBio-1407 apresentaram propriedades terapêuticas similares às observadas para os clássicos inibidores de PDE4, com potencial pró-emético minimizado, sugerindo que estes compostos possam ser úteis, tanto como candidatos a terapias antiasmáticas, quanto como protótipos para o desenvolvimento de novos compostos líderes de interesse no tratamento de doenças inflamatórias pulmonares crônicas.

VI – Conclusões

Nossos resultados possibilitaram destacar que:

- Os derivados NAHs estudados nessa tese são ativos no bloqueio e reversão de alterações patológicas cruciais na asma, com propriedades comparáveis a de potentes inibidores de PDE4.
- Dentro da abordagem proposta, foi possível selecionar-se dois compostos, LASSBio-1406 e LASSBio-1407, únicos dentre os 8 compostos avaliados com capacidade de inibir todos os parâmetros estudados.
- Os efeitos exercidos pelos LASSBio-1406 e LASSBio-1407 em parte é mediado por ações supressoras da função de linfócitos T e fibroblastos, e pela capacidade de intensificar a apoptose de linfócitos T *in vitro*.
- Por último, os achados sugerem que LASSBio-1406 e LASSBio-1407 não apresentam perfil de atividade pró-emética, o que representa uma vantagem farmacológica importante em relação aos inibidores de PDE4 clássicos.

Nossos resultados reforçam a importância dos inibidores de PDE4 no controle terapêutico da asma e sugerem que o LASSBio-1406 e LASSBio-1407 possam ter mercado potencial como verdadeiros protótipos moleculares de medicamentos de interesse no tratamento de doenças inflamatórias pulmonares.

VI – Referências Bibliográficas

- Abbott-Banner, K. H. and C. P. Page (2014). "Dual PDE3/4 and PDE4 inhibitors: novel treatments for COPD and other inflammatory airway diseases." Basic Clin Pharmacol Toxicol **114**(5): 365-376.
- Adcock, I. M. and P. J. Barnes (2008). "Molecular mechanisms of corticosteroid resistance." Chest **134**(2): 394-401.
- Adcock, I. M., J. Marwick, et al. (2010). "Mechanisms of corticosteroid resistance in severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)." Curr Pharm Des **16**(32): 3554-3573.
- Alencar, A. K., S. L. Pereira, et al. (2013). "Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." Br J Pharmacol **169**(5): 953-962.
- Bai, T. R. (2010). "Evidence for airway remodeling in chronic asthma." Curr Opin Allergy Clin Immunol **10**(1): 82-86.
- Barnes, P. J. (1998). "Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms." Clin Sci (Lond) **94**(6): 557-572.
- Barnes, P. J. (2002). "Glucocorticoids and asthma." Ernst Schering Res Found Workshop(40): 1-23.
- Barnes, P. J. (2004). "New drugs for asthma." Nat Rev Drug Discov **3**(10): 831-844.
- Barnes, P. J. (2006). "Corticosteroid effects on cell signalling." Eur Respir J **27**(2): 413-426.
- Barnes, P. J. (2010). "Theophylline." Pharmaceuticals (Basel, Switzerland) **3**: 725-747.
- Barnes, P. J. (2011). "Biochemical basis of asthma therapy." J Biol Chem **286**(38): 32899-32905.
- Barnes, P. J. (2011). "Pathophysiology of allergic inflammation." Immunological reviews **242**(1): 31-50.
- Barnes, P. J. (2011). "Pathophysiology of allergic inflammation." Immunol Rev **242**(1): 31-50.
- Barnes, P. J. (2013). "Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease." J Allergy Clin Immunol **131**(3): 636-645.
- Barrett, N. A. and K. F. Austen (2009). "Innate Cells and T Helper 2 Cell Immunity in Airway Inflammation." Immunity Review - Federation of American Health Systems **31**: 421-437.
- Bates, J. H., M. Rincon, et al. (2009). "Animal models of asthma." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(3): L401-410.

- Bjorgo, E. and K. Tasken (2006). "Role of cAMP phosphodiesterase 4 in regulation of T-cell function." Crit Rev Immunol **26**(5): 443-451.
- Blacquiere, M. J., M. N. Hylkema, et al. (2010). "Airway inflammation and remodeling in two mouse models of asthma: comparison of males and females." Int Arch Allergy Immunol **153**(2): 173-181.
- Bopp, T., N. Dehzad, et al. (2009). "Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression." J Immunol **182**(7): 4017-4024.
- Bosnjak, B., B. Stelzmueller, et al. (2011). "Treatment of allergic asthma: modulation of Th2 cells and their responses." Respir Res **12**: 114.
- Boswell-Smith, V. and D. Spina (2007). "PDE4 inhibitors as potential therapeutic agents in the treatment of COPD-focus on roflumilast." Int J Chron Obstruct Pulmon Dis **2**(2): 121-129.
- Bousquet, J., M. Aubier, et al. (2006). "Comparison of roflumilast, an oral anti-inflammatory, with beclomethasone dipropionate in the treatment of persistent asthma." Allergy **61**(1): 72-78.
- Braga, R. C., V. M. Alves, et al. (2012). "Combination of docking, molecular dynamics and quantum mechanical calculations for metabolism prediction of 3,4-methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazone." J Mol Model **18**(5): 2065-2078.
- Brown, W. (1999). "Ariflo (SmithKline Beecham plc)." IDrugs **2**(9): 915-924.
- Bundschuh, D. S., M. Eltze, et al. (2001). "In vivo efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor." J Pharmacol Exp Ther **297**(1): 280-290.
- Caramori, G., K. Ito, et al. (2004). "Targeting Th2 cells in asthmatic airways." Current drug targets. Inflammation and allergy **3**(3): 243-255.
- Carson, F. L., J. H. Martin, et al. (1973). "Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation." Am J Clin Pathol **59**(3): 365-373.
- Cheng, K. C., K. M. Lee, et al. (1998). "House dust mite-induced sensitivity in mice." J Allergy Clin Immunol **101**(1 Pt 1): 51-59.
- Chu, E. K. and J. M. Drazen (2005). "Asthma: one hundred years of treatment and onward." Am J Respir Crit Care Med **171**(11): 1202-1208.
- Cohn, L., J. A. Elias, et al. (2004). "Asthma: mechanisms of disease persistence and progression." Annu Rev Immunol **22**: 789-815.
- Corazza, N. and T. Kaufmann (2012). "Novel insights into mechanisms of food allergy and allergic airway inflammation using experimental mouse models." Allergy.
- Cortijo, J., A. Iranzo, et al. (2009). "Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury." British journal of pharmacology **156**(3): 534-544.

- Currie, G. P., R. Alluri, et al. (2007). "Montelukast and theophylline: no use or some use in persistent asthma?" Am J Respir Crit Care Med **175**(10): 1094; author reply 1094-1095.
- Currie, G. P., C. A. Butler, et al. (2008). "Phosphodiesterase 4 inhibitors in chronic obstructive pulmonary disease: a new approach to oral treatment." Br J Clin Pharmacol **65**(6): 803-810.
- da Costa, J. C., P. C. Olsen, et al. (2007). "JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats." J Allergy Clin Immunol **119**(1): 219-225.
- Deng, Y. M., Q. M. Xie, et al. (2006). "Effects of ciclamilast, a new PDE 4 PDE4 inhibitor, on airway hyperresponsiveness, PDE4D expression and airway inflammation in a murine model of asthma." Eur J Pharmacol **547**(1-3): 125-135.
- Duarte, C. D., E. J. Barreiro, et al. (2007). "Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates." Mini Rev Med Chem **7**(11): 1108-1119.
- Eisenbarth, S. C. and R. A. Flavell (2009). "Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome." EMBO Mol Med **1**(2): 92-98.
- Erle, D. J. and D. Sheppard (2014). "The cell biology of asthma." The Journal of Cell Biology **205**(5): 621-631.
- Fan Chung, K. (2006). "Phosphodiesterase inhibitors in airways disease." Eur J Pharmacol **533**(1-3): 110-117.
- Fattouh, R., A. Al-Garawi, et al. (2011). "Eosinophils are dispensable for allergic remodeling and immunity in a model of house dust mite-induced airway disease." American journal of respiratory and critical care medicine **183**(2): 179-188.
- Folkesson, H. G., S. R. Kuzenko, et al. (2012). "The adenosine 2A receptor agonist GW328267C improves lung function after acute lung injury in rats." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **303**(3): L259-271.
- Fraga, C. A. and E. J. Barreiro (2006). "Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs." Curr Med Chem **13**(2): 167-198.
- Fulkerson, P. C., M. E. Rothenberg, et al. (2005). "Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma." Clin Exp Allergy **35**(10): 1251-1253.
- Galli, S. J., M. Tsai, et al. (2008). "The development of allergic inflammation." Nature **454**(7203): 445-454.
- Genovese, T., A. Rossi, et al. (2008). "Effects of zileuton and montelukast in mouse experimental spinal cord injury." Br J Pharmacol **153**(3): 568-582.

- Germain, N., B. Bertin, et al. (1998). "Selective phosphodiesterase inhibitors modulate the activity of alveolar macrophages from sensitized guinea-pigs." Eur Respir J **12**(6): 1334-1339.
- Giembycz, M. A. and S. K. Field (2010). "Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD." Drug Des Devel Ther **4**: 147-158.
- GINA (2014). "GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA."
- Gold, L. S., F. Montealegre, et al. (2014). "Asthma Control and Cost in Latin America." VALUE IN HEALTH REGIONAL ISSUES **5C**: 25 – 22 28
- Goldklang, M. P., J. F. Perez-Zoghbi, et al. (2013). "Treatment of experimental asthma using a single small molecule with anti-inflammatory and BK channel-activating properties." FASEB J.
- Hamelmann, E., J. Schwarze, et al. (1997). "Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography." Am J Respir Crit Care Med **156**(3 Pt 1): 766-775.
- Hamid, Q. and M. Tulic (2009). "Immunobiology of asthma." Annu Rev Physiol **71**: 489-507.
- Hasko, G. and P. Pacher (2008). "A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals." J Leukoc Biol **83**(3): 447-455.
- Hirose, R., H. Manabe, et al. (2007). "Correlation between emetic effect of phosphodiesterase 4 inhibitors and their occupation of the high-affinity rolipram binding site in *Suncus murinus* brain." Eur J Pharmacol **573**(1-3): 93-99.
- Holgate, S. T. (2012). "Innate and adaptive immune responses in asthma." Nat Med **18**(5): 673-683.
- Holgate, S. T., H. S. Arshad, et al. (2010). "A new look at the pathogenesis of asthma." Clin Sci (Lond) **118**(7): 439-450.
- Holgate, S. T. and R. Polosa (2008). "Treatment strategies for allergy and asthma." Nat Rev Immunol **8**(3): 218-230.
- Houslay, M. D. and G. S. Baillie (2005). "Beta-arrestin-recruited phosphodiesterase-4 desensitizes the AKAP79/PKA-mediated switching of beta2-adrenoceptor signalling to activation of ERK." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1333-1336.
- Houslay, M. D., G. S. Baillie, et al. (2007). "cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling." Circ Res **100**(7): 950-966.
- Hoymann, H. G., L. Wollin, et al. (2009). "Effects of the phosphodiesterase type 4 inhibitor roflumilast on early and late allergic response and airway hyperresponsiveness in *Aspergillus-fumigatus*-sensitized mice." Pharmacology **83**(3): 188-195.

- Huaux, F. (2007). "New developments in the understanding of immunology in silicosis." Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology **7**(2): 168-173.
- Ingram, J. L., M. J. Huggins, et al. (2011). "Airway fibroblasts in asthma manifest an invasive phenotype." Am J Respir Crit Care Med **183**(12): 1625-1632.
- Jarjour, N. N., S. C. Erzurum, et al. (2012). "Severe asthma: lessons learned from the National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program." Am J Respir Crit Care Med **185**(4): 356-362.
- Jin, S. L. and M. Conti (2002). "Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF-alpha responses." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(11): 7628-7633.
- Kandeel, M., M. Balaha, et al. (2013). "Current and future asthma therapies." Drugs Today (Barc) **49**(5): 325-339.
- Kanehiro, A., T. Ikemura, et al. (2001). "Inhibition of phosphodiesterase 4 attenuates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a model of secondary allergen challenge." Am J Respir Crit Care Med **163**(1): 173-184.
- Kodimuthali, A., S. S. Jabaris, et al. (2008). "Recent advances on phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease." J Med Chem **51**(18): 5471-5489.
- Kroegel, C. (2009). "Global Initiative for Asthma (GINA) guidelines: 15 years of application." Expert Rev Clin Immunol **5**(3): 239-249.
- Kumar, R. K., C. Herbert, et al. (2003). "Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma." J Pharmacol Exp Ther **307**(1): 349-355.
- Kummerle, A. E., M. Schmitt, et al. (2012). "Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of N-Acylhydrazones and Novel Conformationally Constrained Compounds as Selective and Potent Orally Active Phosphodiesterase-4 Inhibitors." J Med Chem.
- Lagente, V., C. Martin-Chouly, et al. (2005). "Selective PDE4 inhibitors as potent anti-inflammatory drugs for the treatment of airway diseases." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **100 Suppl 1**: 131-136.
- Lai, C. K., R. Beasley, et al. (2009). "Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)." Thorax **64**(6): 476-483.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad (2012). "The airway epithelium in asthma." Nat Med **18**(5): 684-692.
- Lazaar, A. L. and R. A. Panettieri (2004). "Pathogenesis and treatment of asthma: recent advances." Drug Discovery Today Disease Mechanisms **1**(1): 111-116.

- Leclerc, O., V. Lagente, et al. (2006). "Involvement of MMP-12 and phosphodiesterase type 4 in cigarette smoke-induced inflammation in mice." Eur Respir J **27**(6): 1102-1109.
- Lima, L. M., C. B. Ormelli, et al. (1999). "Synthesis and antiplatelet evaluation of novel aryl-sulfonamide derivatives, from natural safrole." Pharm Acta Helv **73**(6): 281-292.
- Lima, P. C., L. M. Lima, et al. (2000). "Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhyazones and isosters, derived from natural safrole." Eur J Med Chem **35**(2): 187-203.
- Lipworth, B. J. (2005). "Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Lancet **365**(9454): 167-175.
- Lipworth, B. J. (2007). "Long-acting beta2-adrenoceptor agonists: a smart choice for asthma?" Trends Pharmacol Sci **28**(6): 257-262.
- Lloyd, C. M. and E. M. Hessel (2010). "Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells." Nat Rev Immunol **10**(12): 838-848.
- Lloyd, C. M. and D. N. Robinson (2007). "Allergen-induced airway remodelling." European Respiratory Journal **29**: 1020-1032.
- Lloyd, C. M. and S. Saglani (2013). "T cells in asthma: influences of genetics, environment, and T-cell plasticity." J Allergy Clin Immunol **131**(5): 1267-1274; quiz 1275.
- Lugnier, C., P. Schoeffter, et al. (1986). "Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta." Biochem Pharmacol **35**(10): 1743-1751.
- Lukacs, N. W., C. Hogaboam, et al. (2001). "Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis." Chest **120**(1 Suppl): 5S-8S.
- Lynch, K. R., G. P. O'Neill, et al. (1999). "Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor." Nature **399**(6738): 789-793.
- Lynch, M. J., G. S. Baillie, et al. (2007). "cAMP-specific phosphodiesterase-4D5 (PDE4D5) provides a paradigm for understanding the unique non-redundant roles that PDE4 isoforms play in shaping compartmentalized cAMP cell signalling." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 938-941.
- Martin-Chouly, C. A., A. Astier, et al. (2004). "Modulation of matrix metalloproteinase production from human lung fibroblasts by type 4 phosphodiesterase inhibitors." Life Sci **75**(7): 823-840.
- Marwick, J. A., K. Ito, et al. (2007). "Oxidative stress and steroid resistance in asthma and COPD: pharmacological manipulation of HDAC-2 as a therapeutic strategy." Expert Opin Ther Targets **11**(6): 745-755.

- Matera, M. G., C. Page, et al. (2014). "PDE inhibitors currently in early clinical trials for the treatment of asthma." Expert Opin Investig Drugs **23**(9): 1267-1275.
- Matthews, J. G., K. Ito, et al. (2004). "Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients." J Allergy Clin Immunol **113**(6): 1100-1108.
- Mauad, T. and M. Dolhnikoff (2008). "Pathologic similarities and differences between asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Current opinion in pulmonary medicine **14**(1): 31-38.
- Maurice, D. H., H. Ke, et al. (2014). "Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases." Nat Rev Drug Discov **13**(4): 290-314.
- Moore, P. E., M. M. Calder, et al. (2003). "Effect of dexamethasone on beta2-adrenergic desensitization in airway smooth muscle: role of the ARG19 polymorphism." Chest **123**(3 Suppl): 368S-369S.
- Nenan, S., V. Lagente, et al. (2007). "Metalloelastase (MMP-12) induced inflammatory response in mice airways: effects of dexamethasone, rolipram and marimastat." Eur J Pharmacol **559**(1): 75-81.
- Parulekar, A. D., A. Alobaidy, et al. (2013). "Asthma outcomes revisited." Curr Opin Pulm Med **19**(1): 6-12.
- Pelaia, G., A. Vatrella, et al. (2012). "The potential of biologics for the treatment of asthma." Nature Reviews: Drug Discovery **11**: 958-971.
- Poon, A. H., D. H. Eidelman, et al. (2012). "Pathogenesis of severe asthma." Clin Exp Allergy **42**(5): 625-637.
- Raeburn, D., S. L. Underwood, et al. (1994). "Anti-inflammatory and bronchodilator properties of RP 73401, a novel and selective phosphodiesterase type IV inhibitor." British journal of pharmacology **113**(4): 1423-1431.
- Ribeiro-Filho, J., A. S. Calheiros, et al. (2013). "Curine inhibits eosinophil activation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma." Toxicol Appl Pharmacol.
- Robichaud, A., C. Savoie, et al. (2002). "Assessing the emetic potential of PDE4 inhibitors in rats." British journal of pharmacology **135**(1): 113-118.
- Robichaud, A., C. Savoie, et al. (2001). "PDE4 inhibitors induce emesis in ferrets via a noradrenergic pathway." Neuropharmacology **40**(2): 262-269.
- Robichaud, A., P. B. Stamatiou, et al. (2002). "Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens alpha(2)-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioral correlate of emesis." The Journal of clinical investigation **110**(7): 1045-1052.
- Rolph, M. S., M. Sisavanh, et al. (2006). "Clues to asthma pathogenesis from microarray expression studies." Pharmacology & Therapeutics **109**: 284-294.

- Romeiro, L. A., M. da Silva Ferreira, et al. (2011). "Discovery of LASSBio-772, a 1,3-benzodioxole N-phenylpiperazine derivative with potent alpha 1A/D-adrenergic receptor blocking properties." Eur J Med Chem **46**(7): 3000-3012.
- Romeiro, N. C., G. Aguirre, et al. (2009). "Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates." Bioorg Med Chem **17**(2): 641-652.
- Sanz, M. J., J. Cortijo, et al. (2007). "Roflumilast inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, expression of adhesion molecules and microvascular permeability." British journal of pharmacology **152**(4): 481-492.
- Siddiqui, S., N. S. Redhu, et al. (2013). "Emerging airway smooth muscle targets to treat asthma." Pulm Pharmacol Ther **26**(1): 132-144.
- Silva, A. G., G. Zapata-Sudo, et al. (2005). "Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues." Bioorg Med Chem **13**(10): 3431-3437.
- Singh, P., M. Daniels, et al. (2003). "Phenotypic comparison of allergic airway responses to house dust mite in three rat strains." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(4): L588-598.
- Sismanopoulos, N., D. A. Delivanis, et al. (2013). "Do mast cells link obesity and asthma?" Allergy **68**(1): 8-15.
- Spina, D. (2008). "PDE4 inhibitors: current status." Br J Pharmacol **155**(3): 308-315.
- Spond, J., M. M. Billah, et al. (2004). "The role of neutrophils in LPS-induced changes in pulmonary function in conscious rats." Pulmonary pharmacology & therapeutics **17**(3): 133-140.
- Spond, J., R. Chapman, et al. (2001). "Comparison of PDE 4 inhibitors, roflumilast and SB 207499 (ariflo), in a rat model of pulmonary neutrophilia." Pulmonary pharmacology & therapeutics **14**(2): 157-164.
- Tang, H. F., J. J. Lu, et al. (2010). "Action of a Novel PDE4 inhibitor ZL-n-91 on lipopolysaccharide-induced acute lung injury." International immunopharmacology **10**(4): 406-411.
- Torphy, T. J., M. S. Barnette, et al. (1994). "Phosphodiesterase IV inhibitors as therapy for eosinophil-induced lung injury in asthma." Environ Health Perspect **102 Suppl 10**: 79-84.
- Tributino, J. L., C. D. Duarte, et al. (2009). "Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: orally effective anti-inflammatory drug candidates." Bioorg Med Chem **17**(3): 1125-1131.
- Ulrich, K., J. S. Hincks, et al. (2008). "Anti-inflammatory modulation of chronic airway inflammation in the murine house dust mite model." Pulmonary pharmacology & therapeutics **21**(4): 637-647.

- van den Berge, M., N. H. Ten Hacken, et al. (2013). "Treatment of the bronchial tree from beginning to end: targeting small airway inflammation in asthma." Allergy **68**(1): 16-26.
- Virtala, R., A. K. Ekman, et al. (2011). "Airway inflammation evaluated in a human nasal lipopolysaccharide challenge model by investigating the effect of a CXCR2 inhibitor." Clin Exp Allergy.
- Wark, P. A. and P. G. Gibson (2006). "Asthma exacerbations . 3: Pathogenesis." Thorax **61**(10): 909-915.
- Wechsler, M. E., P. C. Fulkerson, et al. (2012). "Novel targeted therapies for eosinophilic disorders." J Allergy Clin Immunol **130**(3): 563-571.
- Wilson, C. N. (2008). "Adenosine receptors and asthma in humans." Br J Pharmacol **155**(4): 475-486.
- Wollin, L., D. S. Bundschuh, et al. (2006). "Inhibition of airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation by roflumilast and other PDE4 inhibitors." Pulm Pharmacol Ther **19**(5): 343-352.
- Yang, M., R. K. Kumar, et al. (2012). "Emerging roles of pulmonary macrophages in driving the development of severe asthma." J Leukoc Biol.
- Yim, R. P. and A. C. Koumbourlis (2012). "Steroid-resistant asthma." Paediatr Respir Rev **13**(3): 172-176; quiz 176-177.

Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of *N*-Acyhydrazones and Novel Conformationally Constrained Compounds as Selective and Potent Orally Active Phosphodiesterase-4 Inhibitors

Arthur E. Kümmerle,^{†,‡,||} Martine Schmitt,[§] Suzana V. S. Cardozo,^{∇,¶} Claire Lugnier,[△] Pascal Villa,[#] Alexandra B. Lopes,^{†,‡} Nelilma C. Romeiro,[▼] Hélène Justiniano,[△] Marco A. Martins,[∇] Carlos A. M. Fraga,^{†,¶} Jean-Jacques Bourguignon,^{§,⊥} and Eliezer J. Barreiro^{†,⊥}

[†]Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 68023, RJ 21944-971, Brazil

[‡]Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

[§]Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR7200, CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 Route du Rhin, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

[∇]Laboratório de Inflamação, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

[¶]Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

[△]Biophotonique et Pharmacologie, UMR7213, CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 Route du Rhin, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

[#]Plate-forme de Chimie Biologie Intégrative de Strasbourg (PCBIS), UMR3286, CNRS, Université de Strasbourg, Ecole Supérieure de Biotechnologie et Faculté de Pharmacie, Boulevard Sébastien Brant, 67412 Illkirch-Graffenstaden, France

[▼]Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)-Macaé-Rua Aluísio da Silva Gomes, 50 Granja dos Cavaleiros, 27930-560 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: Among a small series of tested *N*-acylhydrazones (NAHs), the compound **8a** was selected as a selective submicromolar phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor associated with anti-TNF- α properties measured both *in vitro* and *in vivo*. The recognition pattern of compound **8a** was elucidated through molecular modeling studies based on the knowledge of the 3D-structure of **zardaverine**, a PDE4 inhibitor resembling the structure of **8a**, cocrystallized with the PDE4. Based on further conformational analysis dealing with *N*-methyl-NAHs, a quinazoline derivative (**19**) was designed as a conformationally constrained NAH analogue and showed similar *in vitro* pharmacological profile, compared with **8a**. In addition, **19** was found active when tested orally in LPS-evoked airway hyperreactivity and fully confirmed the working hypothesis supporting this work.



INTRODUCTION

Phosphodiesterases (PDEs) play a critical role in maintaining the cellular levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP).^{1–4} Cellular biological responses such as secretion, contraction, metabolism, and growth are mediated by levels of these ubiquitous second messengers.⁵

PDEs are responsible for the hydrolysis of phosphodiester bonds in cAMP and cGMP,⁶ and in humans, PDEs can be

subdivided into 11 different groups or isozymes, PDE1 to PDE11.^{7,8}

Among these, the multigene phosphodiesterase-4 (PDE4)^{9,10} family has attracted considerable attention over the past decade because PDE4 is found in many cell types and tissues, including leukocytes, airway and vascular smooth muscle, vascular endothelium, and brain.⁹ The involvement of PDE4 in

Received: April 11, 2012

Chart 1. Chemical Structures of Different PDE4 Inhibitors

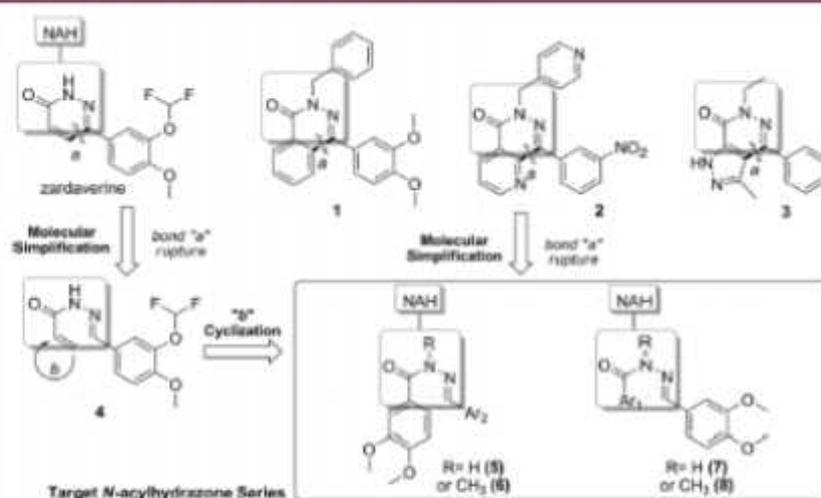
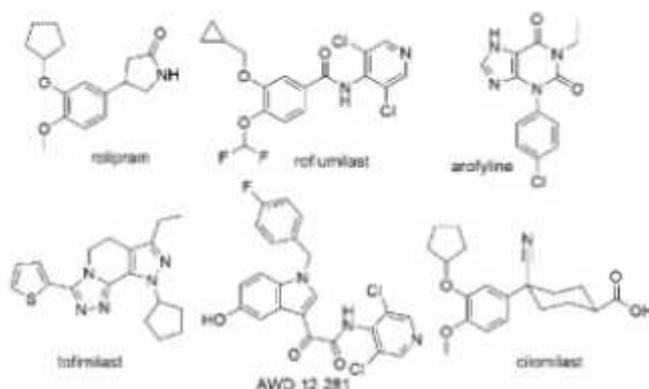


Figure 1. Structural design of the target NAH series 5–8.

pathological processes associated with these tissues suggests a great potential for pharmacological intervention in a variety of inflammatory, vascular, angiogenic, and neurological disorders through modulation of cAMP levels.^{7,9} Potential therapeutic use of PDE4 inhibitors deal with various therapies including asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), rheumatoid arthritis, psoriasis, Crohn's disease, cancer, Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, Parkinson's disease, schizophrenia, and depression.^{11–19}

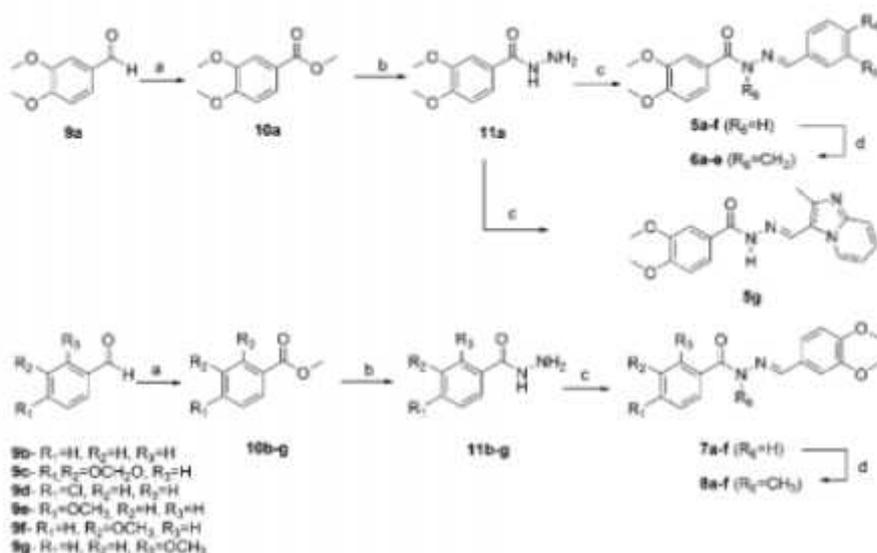
Over the past decade, the number of studies dealing with the modulation of cAMP or cGMP levels through the action of PDE have increased dramatically; the relevance of modulating PDE activity has been demonstrated by the high number of selective PDE inhibitory drug candidates that have been synthesized and tested in clinical trials for different inflammatory disorders such as asthma and COPD (Chart 1).²⁰

While some of these drugs appeared to be promising (e.g., roflumilast^{21–24} and tofinilast²⁵), many were discontinued from development because of the potential overlap of efficacy and undesired side effects such as nausea and emesis.²⁶ These adverse side effects were thought to be due to the inhibition of

PDE4 in nontarget tissues, notably in the CNS and the gut.²⁶ It was further hypothesized that these side effects were either caused by activating emetic centers within the CNS or by binding at a high-affinity allosteric binding site on PDE4 (called the rolipram binding site)²⁷ affecting gastric acid-secreting cells in the gut. Another proposal emphasized inhibition of a specific PDE4 gene, most probably PDE4D, as the source of emetic effects of PDE4 inhibitors.^{17,26,28,29}

Despite possible side effects, the lack of alternative treatments for inflammatory disorders such as COPD continues to stimulate research efforts leading to discovery of new safer PDE4 inhibitors, which have been further encouraged by the recent approval of roflumilast for use in treating this disease.³⁰

In this paper, we describe the design, synthesis, pharmacological profile, and molecular modeling of a novel combinatory class of *N*-acylhydrazone (NAH) derivatives and a number of NAH structurally related heterocyclic compounds that may act as PDE4 inhibitors. NAH derivatives have been extensively described by our group³¹ as potent anti-inflammatory, antinociceptive, antiplatelet, and vasoactive compounds and characterized as a privileged structure.³²

Scheme 1^a

^aReagents and conditions: (a) $I_2, KOH, MeOH, 0\text{ }^\circ\text{C}, 2\text{ h}, 83\text{--}92\%$; (b) $NH_2NH_2 \cdot H_2O, EtOH, 70\text{ }^\circ\text{C}, 3\text{ h}, 82\text{--}92\%$; (c) $Ar\text{-CHO}, EtOH, HCl_{ac}, rt, 1.5\text{ h}, 71\text{--}97\%$; (d) $CH_2I_2, K_2CO_3, acetone, 50\text{ }^\circ\text{C}, 24\text{ h}, 75\text{--}99\%$.

Previously, our group described the strategy of molecular simplification of PDE inhibitors³³ using a simple bond rupture between positions 5 and 6 of the central pyridazinone ring, which allowed us to identify the structural similarities between these cardioactive compounds and NAH derivatives.³⁴ These studies led to the discovery of LASSBio-294, a potent positive cardio-inotropic agent that increases Ca^{2+} accumulation in the sarcoplasmic reticulum (SR)³⁵ and acts as a vasodilating agent in aortic rings. These effects are mediated through the guanylate cyclase/cyclic guanylate monophosphate pathway.³⁶

Because the *N*-acylhydrazone chemotype has a bioisosteric relationship with the pyridazinone ring, which is shared by the PDE4 inhibitors zardaverine and compounds 1–3,^{37,38} the same strategy of molecular simplification, represented by a simple bond rupture in a and a cyclization step in b, was used for the design of this novel series (Figure 1). The pharmacophoric elements needed for PDE4 activity, that is, the catechol ring, was successively linked to both to the acyl (Ar_1 , compounds 5 and 6) and the imine (Ar_2 , compounds 7 and 8) groups. Finally, we selected a set of aryl groups Ar_1 and Ar_2 , including phenyl, 3,4-dimethoxyphenyl, 4-chlorophenyl, 2-, 3-, or 4-methoxyphenyl, 4-hydroxyphenyl, and 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridinyl. The selection was based on the following physical criteria: σ -Hammett constant (-0.4 to $+0.3$), molar refractivity ($25\text{--}39\text{ cm}^3/\text{mol}$), lipophilic profile, and ability to be an acceptor or donor of hydrogen. The 3,4-methylenedioxyphenyl group was also selected to test potential bioisosterism with the catechol moiety. We also explored the influence of *N*-methyl substitution ($R = H$ or Me) on activity. This strategy was later successfully utilized by our group to synthesize a potent vasodilatory NAH,^{39,40} which confirmed that the *N*-methyl group markedly changed the conformation of *N*-acylhydrazone group.³⁹

RESULTS AND DISCUSSION

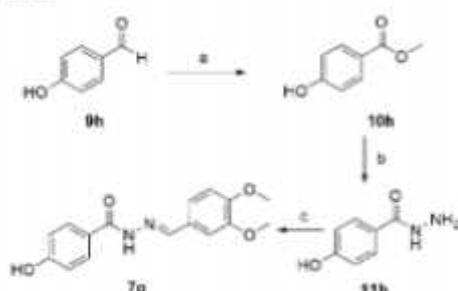
Chemistry. The synthesis of the target NAH series 5–8 was carried out according to the procedures depicted in Schemes 1–3. The compounds 5a–g and 7a–f were synthesized from the corresponding acylhydrazines 11a–g that were obtained from the oxidative processing of aldehydes 9a–g, as described by Yamada,⁴¹ who used iodide in potassium hydroxide methanolic solution followed by a hydrazinolysis reaction using hydrazine hydrate in ethanol and resulted in global yields ranging from 70% to 93%.⁴¹ Thus, the compounds 5a–g and 7a–f were prepared via acid-catalyzed condensation of 11a–g with the corresponding aromatic aldehydes with high yields of 71% to 97% (Scheme 1).

The phenolic NAH derivative 7g was obtained by trying a number of successive classical functional group interconversions on aldehyde 9b, which could not be converted to the corresponding ester by the previously employed Yamada's oxidation.⁴¹ Thus, the treatment of 9b with sodium cyanide and manganese oxide in methanol at room temperature⁴² provided the ester 10b with a 71% yield. The hydrazinolysis of the methyl ester 10b afforded the corresponding hydrazide 11b in 80% yield. Condensation of 11b with 3,4-dimethoxybenzaldehyde furnished the new NAH derivative 7g in 61% yield (Scheme 2).

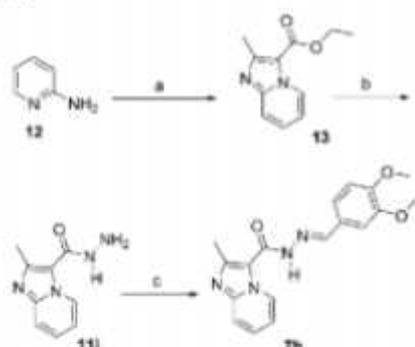
Finally, the 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridinyl derivative NAH 7h was synthesized through the synthesis sequence shown in Scheme 3, resulting in a high overall yield. The imidazo[1,2-*a*]pyridine derivative 13 was obtained with a 79% yield using regioselective cyclocondensation of 2-aminopyridine 12 with ethyl 2-chloro-acetoacetate in absolute ethanol at reflux (Scheme 3).^{44,45} The successive hydrazinolysis and acid-catalyzed condensation of 12 with 3,4-dimethoxybenzaldehyde gave the desired 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridinyl NAH 7h with a 72% yield, as previously described. It is worth mentioning that some compounds of the 5 and 7 series described herein can be

C

dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00000 | J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

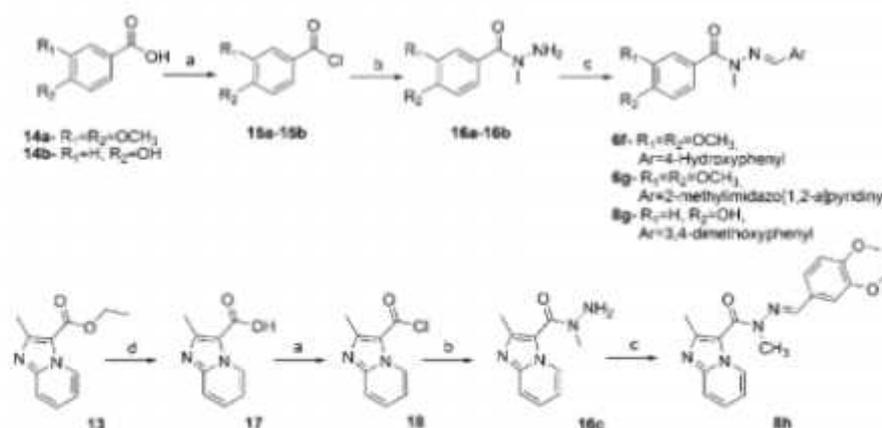
Scheme 2^a

^aReagents and conditions: (a) MnO_2 , NaCN , MeOH , 24 h, rt, 71%; (b) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH , 70 °C, 3 h, 80%; (c) 3,4-dimethoxybenzaldehyde, EtOH , HCl_{cat} , rt, 1.5 h, 61%.

Scheme 3^a

^aReagents and conditions: (a) ethyl 2-chloroacetate, EtOH , reflux, 20 h, 79%; (b) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH , 70 °C, 3 h, 84%; (c) 3,4-dimethoxybenzaldehyde, EtOH , HCl_{cat} , rt, 1.5 h, 72%.

found in other studies with different routes of synthesis and biological activities distinct from those intended here.^{46–48}

Scheme 4^a

^aReagents and conditions: (a) SOCl_2 , DMF_{over} , 70 °C, 4 h; (b) CH_3NHNH_2 , CH_2Cl_2 , 0 °C, 3 h, 79–91% (global yield a, b); (c) Ar-CHO , EtOH , HCl_{cat} , rt, 1.5 h, 82–90%; (d) KOH , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 70 °C, 5 h, 98%.

Careful analysis of the ^1H NMR spectra of the NAH derivatives 5a–g and 7a–h allowed us to detect the formation of a single isomer based on the presence of a single imino hydrogen signal, which was attributed to the (*E*)-isomer. Several previous reports by our group described this configuration of bioactive *N*-acylhydrazone derivatives, as determined through ^1H NMR and crystallographic analyses.^{35,49–51}

Next, the *N*-methyl-NAH series 6a–e and 8a–f were synthesized in yields ranging from 75% to 98% using selective *N*-methylation of the corresponding *N*-acylhydrazones 5a–e and 7a–f following treatment with potassium carbonate in acetone and the addition of methyl iodide (Scheme 1).^{30,52}

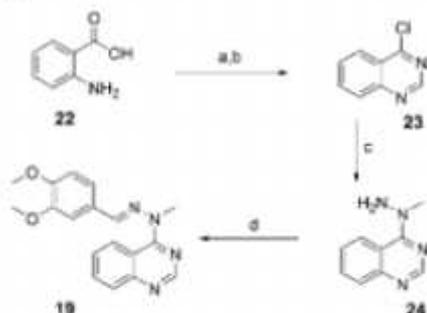
^1H NMR analysis confirmed the selective *N*-alkylation based on the absence of signal relative to the NH amide of *N*-acylhydrazones and by the presence of a *N*-methyl singlet signal ranging from δ 3.52 to δ 3.58.

The *N*-methyl phenolic (6f, 6g, 8g) and 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridinyl (8h) NAHs could not be synthesized by the previously described *N*-methylation method due to the presence of other groups presenting other nucleophilic groups. These *N*-methyl-NAH were obtained from the corresponding *N*-methylhydrazides 16a–c and were synthesized in good yields (82–90%) by slowly adding a diluted solution of acid chloride 15a–c (0.15 M in dichloromethane) in a solution 10 equiv of *N*-methylhydrazine in dichloromethane at 0 °C (Scheme 4).⁵³ The ^1H NMR analysis facilitated the confirmation of the regioselective formation of *N*-methyl-benzohydrazides 16a–c based on the lack of characteristic signal normally associated with the amide NH proton, around δ 9.0 to 10.0. This is typical of unmethylated hydrazides, as observed for 11a–i, in addition to the presence of signal associated with the hydrazide amino group, which accounts for two hydrogens ranging from δ 3.91 to δ 4.85.

Careful analysis of the ^1H NMR spectra of the new *N*-acylhydrazone derivatives described herein allowed us to detect a unique regioisomer, based on the presence of a single *N*-methyl signal and the presence of only one imino hydrogen signal, which was attributed to the (*K*)-isomer, as described in

several previous reports by our group identifying the configuration of bioactive *N*-acylhydrazone derivatives.^{36,42}

The heterocyclic compounds 19–21 were obtained as depicted in Schemes 5–7. The quinazoline derivative 19 was

Scheme 5^a

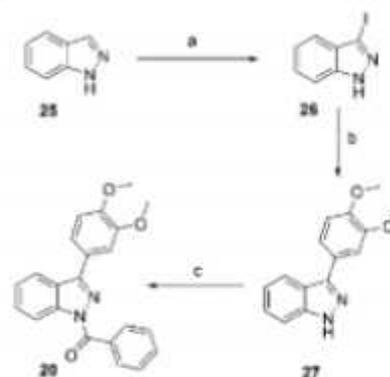
^aReaction conditions: (a) formamidine acetate, EtOH, microwave, 130 °C, 40 min, 89%; (b) POCl₃, 110 °C, 2 h, 86%; (c) CH₃NHNH₂, CH₂Cl₂, 0 °C, 3 h, 96%; (d) 3,4-dimethoxybenzaldehyde, EtOH, HCl_{sat}, 1.5 h, 81%.

synthesized starting from the cyclization of anthranilic acid 22 with formamidine acetate under microwaves, followed by a chlorination reaction with phosphorus oxychloride yielding the 4-chloroquinazolinone 23. Hydrazinolysis of 23 with a diluted solution of *N*-methylhydrazine at 0 °C, as previously described,⁵³ afforded the compound 24, which was subsequently condensed with 3,4-dimethoxybenzaldehyde in ethanol and gave the desired quinazolinone 19 with a 81% yield. The presence of only one imino hydrogen signal at δ 7.92 in its ¹H NMR spectrum supported the formation of the single (*E*)-isomer.

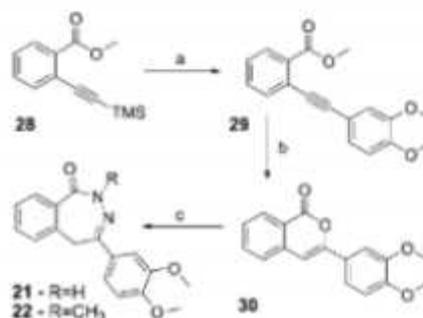
Halogenation of the indazole 25 with iodine in presence of potassium hydroxide led to the formation of 3-iodoindazole 26, which was subsequently reacted with 3,4-dimethoxyphenylboronic acid under microwaves, in a Suzuki cross-coupling reaction using tetrakis palladium as a catalyst (Scheme 6). A regioselective acylation of 27 was performed with benzoyl chloride in pyridine solution to yield the desired indazolyl derivative 20.

The benzo[1,2-*d*]- κ -azepin-1-one derivative 21 was obtained as described in Scheme 7. The 2-trimethylsilyl-ethylbenzoate 28 was prepared according to a previously published procedure,⁵⁴ followed by a Sonogashira cross-coupling reaction with 4-bromo-1,2-dimethoxybenzene using bis-(triphenylphosphine)palladium(II) chloride as a catalyst under microwave irradiation. This procedure yielded the acetylene 29,^{54,55} which was then cyclized with trifluoroacetic acid in a 6-*endo-dig* mechanism leading to the isocoumarone 30.⁵⁵ Finally 30 was reacted with hydrazine hydrate or methylhydrazine to produce the final 2,3-benzodiazepinones 21 or 22, respectively.

PDE4 inhibition. The different *N*-acylhydrazones and their structurally related compounds were tested for their capacity to inhibit PDE4. The activity was measured using PDE4 isolated from the media layer of bovine aorta, according to a previously reported method with modifications, which was shown to be similar to the PDE4 isolated from human aorta.^{56,57} PDE4 activity was measured using a previously described⁵⁸ two-step

Scheme 6^a

^aReagents and conditions: (a) I₂, KOH, DMF, 1 h, 89%; (b) 3,4-dimethoxyphenylboronic acid, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, DME/H₂O, microwave, 155 °C, 30 min, 64%; (c) benzoyl chloride, pyridine, 8 h, 74%.

Scheme 7^a

^aReagents and conditions: (a) 4-bromo-1,2-dimethoxybenzene, PdCl₂(PPh₃)₂, PPh₃, CuI, piperidine, K₂CO₃, THF/MeOH (7:1), 80 °C, 15 h, 85%; (b) TFA, rt, 0.5 h, 91%; (c) NH₂NH₂·H₂O or CH₃NHNH₂, *n*-BuOH, 90 °C, 5 h, 87% and 82%.

assay at 1 μ M cAMP. The results are summarized in Tables 1 and 2.

The nonmethylated NAH compounds 5a–g and 7a–h showed almost no inhibition of PDE4 catalytic activity ($IC_{50} > 10 \mu$ M) (Tables 1 and 2). Conversely, *N*-methylation of these compounds yielding the *N*-methyl-NAH series 6 and 8 has led to quite different results. Among these *N*-methyl-NAH derivatives, the PDE4 inhibitory activity was strongly modulated by substituent effects at both Ar₁ and Ar₂. SAR analysis also allowed us to reach a number of other comments:

- Within the compound 6 series (Ar₂ = 3,4-dimethoxyphenyl), the inhibitory activity emerged when Ar₁ was another 3,4-dimethoxyphenyl group (6b, $IC_{50} = 0.3 \mu$ M), whereas all the other *para*-derivatives (6a, 6c–6e) were inactive. Only the *para*-methoxy derivative 6e showed some inhibitory activity with an IC_{50} close to 10 μ M.
- When the compound 8 is considered, the second series of *N*-methyl-NAH was the most promising and showed compounds with IC_{50} 's ranging from 50 to 290 nM. Interestingly the derivative 8a bearing a nonsubstituted Ar₁ ring was relatively potent. These results clearly highlighted the critical role played by the 3,4-

Table 1. PDE4 Inhibition of NAH Derivatives from Series 5 and 6

compd	R	R ₁	R ₂	PDE4	
				% inhib ^a	IC ₅₀ ^b (nM)
rolipram					
5a	H	H	H	5.8	c
5b	H	OCH ₃	OCH ₃	10.7	c
5c	H	OCH ₂ O		10.5	c
5d	H	Cl	H	6.4	c
5e	H	OCH ₃	H	6.6	c
5f	H	OH	H	1.5	c
5g	H			7.7	c
6a	CH ₃	H	H	22.8	c
6b	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	95.8	300
6c	CH ₃	OCH ₂ O		19.8	c
6d	CH ₃	Cl	H	40.4	c
6e	CH ₃	OCH ₃	H	45.8	c
6f	CH ₃	OH	H	27.0	c
6g	CH ₃			23.7	c

^aPercent inhibition of PDE4 activity after incubation with the target compound at a drug concentration of 10 μ M. ^bThe IC₅₀ was calculated by nonlinear regression and represents the mean value of three measurements; the experimental error is approximately 15%. ^cIC₅₀ was not determined when % inhibition was <50% at 10 μ M.

dimethoxyphenyl fragment when it was located close to the imine function (Ar₂) and the importance of the N-methylation of the NAH series. As previously demonstrated, the N-methylation of amides in NAH leads to conformational changes that may markedly modify pharmacological behavior,^{39,40} as shown by our results.

- (ii) Within the same series, the presence of a *para*-phenolic OH group on Ar₁ slightly increased the potency (one-third of magnitude order), yielding a compound **8g** with an IC₅₀ of 50 nM, when compared with **8a**.

The two most active compounds in inhibiting PDE4 in bovine aorta extract were **8d** and **8g**. Based on the existence of four isoforms of PDE4, that is, PDE4A, PDE4B, PDE4C, and PDE4D, these two compounds were evaluated for their selectivity against the human PDE4 subtypes. From the IC₅₀ values shown in Table 3, neither **8d** nor **8g** presented any significant selectivity profile, in particular, PDE4B/PDE4D profile.

According to Housley et al.,⁹ PDE4 isoforms are involved in various physiological processes. Although PDE4B is likely related to the modulation of TNF- α biosynthesis, the PDE4D isoform and, to some extent, the PDE4A isoform are primarily implicated in the positive regulation of pulmonary hyper-reactivity induced by allergens.⁹ According to a recent review by Kodimuthal,²⁰ the PDE4C isoform is not normally found in pro-inflammatory cells. Thus, the increased activity of these compounds against subtypes B and D, as observed with **8d** and **8g**, may represent an important characteristic profile for anti-inflammatory effects.

On the other hand, PDE4 inhibitors cause undesirable effects such as nausea and vomiting, which strongly limit their

Table 2. PDE4 Inhibition of NAH Derivatives from Series 7 and 8

compd	R	R ₁	R ₂	R ₃	PDE4	
					% inhib ^a	IC ₅₀ ^b (nM)
rolipram						
7a	H	H	H	H	13.1	c
7b	H	OCH ₂ O		H	16.0	c
7c	H	Cl	H	H	7.5	c
7d	H	OCH ₃	H	H	9.7	c
7e	H	OH	H	H	13.6	c
7f	H			H	41.5	c
8a	CH ₃	H	H	H	97.1	140
8b	CH ₃	OCH ₂ O		H	96.3	110
8c	CH ₃	Cl	H	H	97.0	150
8d	CH ₃	OCH ₃	H	H	98.3	105
8e	CH ₃	H	OCH ₃	H	98.1	290
8f	CH ₃	H	H	OCH ₃	97.8	210
8g	CH ₃	OH	H	H	98.4	50
8h	CH ₃			H	45.9	c

^aPercent inhibition of PDE4 activity after incubation with the target compound at a drug concentration of 10 μ M. ^bThe IC₅₀ was calculated by nonlinear regression and represents the mean value of three measurements; the experimental error is approximately 15%. ^cIC₅₀ was not determined when % inhibition was <50% at 10 μ M.

Table 3. PDE4 Recombinant Isoform Inhibition (IC₅₀, nM) for Selected Compounds **8d** and **8g**

compd	PDE4A	PDE4B	PDE4C	PDE4D
rolipram, 23	162	231	390	622
8d	159	53	505	74
8g	64	47	206	31

therapeutic potential.⁶⁰ In ferrets, established as an appropriate animal species to assess emetic response in preclinical settings, PDE4 inhibitors induce vomiting reflex via a noradrenergic pathway in the central nervous system.⁶¹ Reversal of the hypnotic effect of the α 2-adrenoceptor agonist xylazine has proven to be a useful alternative model to evaluate the emetic potential of PDE4 inhibitors in nonvomiting species such as rodents.^{36,62} In the current study, we noted that compounds **8d** and **8g** did not reduce the duration of anesthesia triggered by the xylazine/ketamine association in A/J mice, different from what was observed following rolipram treatment as shown in Figure 2. These results confirm previous findings pointing out the pro-emetic profile of the prototype compound rolipram in this system⁶¹ and strongly suggest that the class of *N*-methyl-*N*-acylhydrazones, represented by **8d** and **8g**, shows much promise for an anti-inflammatory therapeutic application: their inhibitory effects on PDE4B and PDE4D associated with a lack of effect on xylazine-induced anesthesia, which is an indicative of the low potential to trigger emesis.

Because PDE exists as 11 different families or isozymes involved in various physiological processes,^{7,8} the selective inhibition of PDE4 is important to consider when trying to minimize possible side effects. Thus we carried out selectivity

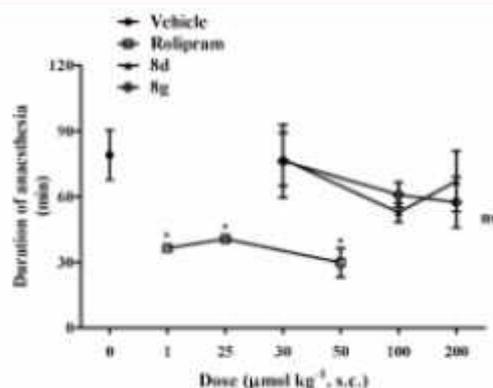


Figure 2. Effect of subcutaneous administration of **8d** or **8g** (30–200 $\mu\text{mol/kg}$), rolipram (1–50 $\mu\text{mol/kg}$), or vehicle (0.2% Tween 80) on the duration of anaesthesia induced by the combination of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (70 mg/kg) in A/J mice. Values are represented as mean \pm SEM from at least six mice. * $P < 0.05$ compared with the vehicle group.

profiling of compounds **6b** and **8a–g** toward the PDE1–PDE6 isoforms (Table 4). Data revealed that all compounds displayed a minimal selectivity index ranging from 16- to 182-fold, calculated from the highest IC_{50} found with the PDE1, PDE2, PDE3, PDE5, and PDE6 isoforms in comparison to the IC_{50} obtained for the PDE4 isoform.

A literature analysis dealing with structural diversity of known PDE inhibitors showed that several classes possessed the 3,4-dimethoxyphenyl fragment in their structure, which was also associated with moderate PDE4/PDE3 selectivity. Controlling the selectivity toward PDE3 was generally found to be the most challenging but may be significantly increased by small substituent effects as shown in our series of NAH, when **8a** and **8b** or **8g** are compared. Interestingly, compound **8d** ($\text{Ar}_1 = 4\text{-MeO-Ph}$) was active toward both the PDE4 and PDE5 with IC_{50} 's close to 100 nM.

TNF- α inhibition. Among the growing list of pro-inflammatory mediators known to be involved in pathologies such as arthritis,⁶³ AIDS, and asthma, tumor necrosis factor- α (TNF- α) may be of particular importance in initiating chronic inflammation through its promotion of cytokine secretion from a variety of cells.^{64,65} TNF- α is mainly produced by cells of the monocyte/macrophage lineage. PDE4 inhibitors have been shown to inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α

production in monocytes.⁶⁶ In addition, the archetypal selective PDE4 inhibitor rolipram and other PDE4 inhibitors display inhibitory effects on LPS-induced TNF- α release in human whole blood.⁶⁷

We selected compounds **6b** and **8a–g** to further evaluate their *in vitro* anti-inflammatory activities by examining the suppression of TNF- α release by lipopolysaccharide (LPS)-activated peripheral blood mononuclear cells from healthy donors (Table 5). These compounds dictated strong inhibition of TNF- α release with EC_{50} 's ranging from 0.52 (**8g**) to 1.75 μM (**8a**).

Table 5. Suppression of TNF- α Release by LPS for Selected Compounds

compd	% inhibition of TNF- α at 10 μM	EC_{50}^a (μM)
rolipram		0.11
6b	92	1.18 \pm 0.10
8a	91	1.75 \pm 0.82
8b	90	0.54 \pm 0.04
8c	88	1.01 \pm 0.1
8d	84	1.45 \pm 0.21
8e	81	1.27 \pm 0.14
8f	80	1.59 \pm 0.14
8g	83	0.52 \pm 0.04

^aThe EC_{50} was calculated by linear regression (correlation coefficient $r = 0.95$) and represents the mean value of three measurements; the experimental error is approximately 15%.

The compound **8g** has been identified as more potent in inhibiting both PDE4 activity and the TNF- α release. No correlation was found between PDE4 inhibition and TNF- α inhibition for compounds **6b** and **8a–f**. Although **8d** and **8g** displayed similar potency in inhibiting PDE4D, with IC_{50} 's of 53 and 47 nM, respectively, **8g** was almost 3-fold more potent than **8d** in inhibiting TNF- α production. These findings may be attributed to the differences in the physicochemical properties between these compounds, such as cell permeability or water solubility, or they may suggest that accumulation of cAMP is an important mechanism in decreasing TNF- α secretion but is certainly not the only one. In particular, the kinome often numerous protein kinases involved in multiple transduction signaling pathways in cells.

It is noteworthy that many protein kinase inhibitors acting as ATP competitors may present strong pharmacophoric similarities with PDE4 inhibitors, in particular an H-bond

Table 4. Selectivity Profile of NAH Derivatives **6b** and **8a–g** against PDE Subtypes

compd	% inhibition ^a at 10 μM or IC_{50}^b					fold selectivity (PDE3/PDE4)
	PDE1	PDE2	PDE3	PDE5	PDE6	
6b	38.7%	40.8%	18.8 μM	30.9%	17.6 μM	59
8a	0%	23.5%	19.6 μM	22.3%	31.2%	140
8b	0%	4.0%	19.4%	5.1%	0.6%	>90
8c	17.7%	26.6%	6.7 μM	27.5%	34.0%	45
8d	25.1%	35.5%	6.7 μM	0.15 μM	35.2%	1.5
8e	18.5%	40.4%	4.5 μM	29.1%	39.5%	16
8f	11.0%	16.8 μM	6.2 μM	13.9%	11.0%	26
8g	28.3%	39.3%	11.8 μM	27.9%	9.1 μM	182

^aPercent inhibition of the PDE1, PDE2, PDE3, PDE5 and PDE6 isoform activities after incubation with the target compound at a drug concentration of 10 μM . ^bThe IC_{50} was calculated by nonlinear regression and represents the mean value of three measurements; the experimental error is approximately 15%.

Table 6. Effect of a Single Oral Administration of Either 45 $\mu\text{mol/kg}$ Rolipram (10 mg/kg) or Selected Compounds (100 $\mu\text{mol/kg}$, 30–35 mg/kg, Oral) on the LPS-Induced Generation of TNF- α and IL-6 in the Lung Tissue 18 h Postchallenge (*in Vivo*)

stimulus	treatment	TNF- α^a (pg/mg)	inhibition (%)	IL-6 ^a (pg/mg)	inhibition (%)
saline	vehicle	5.3 \pm 1.4		7.5 \pm 1.7	
LPS	vehicle	17.0 \pm 1.8 ^b		37.0 \pm 3.0 ^b	
	+ rolipram	8.9 \pm 1.3 ^c	69	20.9 \pm 2.8 ^c	54
	+ 6b	6.3 \pm 0.3 ^c	74	17.7 \pm 2.6 ^c	65
	+ 8a	11.6 \pm 1.4 ^c	46	21.2 \pm 2.3 ^c	53
	+ 8b	7.6 \pm 1.7 ^c	80	10.0 \pm 1.8 ^c	92
	+ 8c	10.7 \pm 1.6 ^c	54	19.7 \pm 3.7 ^c	59
	+ 8d	11.0 \pm 1.1 ^c	51	23.8 \pm 2.7 ^c	45
	+ 8e	8.2 \pm 2.8 ^c	75	25.8 \pm 4.1 ^c	38
	+ 8f	5.3 \pm 0.8 ^c	100	7.9 \pm 1.5 ^c	99
+ 8g	12.9 \pm 2.4	35	35.2 \pm 2.7	6	

^aValues represent the mean \pm SEM from at least four animals. LPS (25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$) was administered intranasally. ^b $P < 0.05$ compared with saline-stimulated and saline-treated mice. ^c $P < 0.05$ compared with LPS-stimulated and saline-treated mice.

Table 7. Effect of a Single Oral Administration of Either 45 $\mu\text{mol/kg}$ Rolipram (10 mg/kg) or Selected NAH Derivatives (100 $\mu\text{mol/kg}$, 30–35 mg/kg, Oral) on LPS-Induced Accumulation of Total Leukocytes and Neutrophils in the Bronchoalveolar Space 18 h Postchallenge

stimulus	treatment	total leukocytes ^a ($\times 10^3/\text{BAL}$)	inhibition (%)	neutrophils ^a ($\times 10^3/\text{BAL}$)	inhibition (%)
saline	vehicle	65.8 \pm 3.9		3.1 \pm 1.0	
LPS	vehicle	480.5 \pm 46.2 ^b		416.0 \pm 40.7 ^b	
	+ rolipram	191.3 \pm 39.7 ^c	70	128.1 \pm 30.0 ^c	70
	+ 6b	262.5 \pm 10.0 ^c	53	209.2 \pm 6.7 ^c	50
	+ 8a	177.1 \pm 14.5 ^c	73	136.2 \pm 14.5 ^c	68
	+ 8b	222.9 \pm 32.5 ^c	62	158.3 \pm 23.4 ^c	67
	+ 8c	192.9 \pm 26.6 ^c	69	193.1 \pm 31.5 ^c	54
	+ 8d	145.0 \pm 9.7 ^c	81	136.6 \pm 7.9 ^c	68
	+ 8e	179.7 \pm 17.6 ^c	73	99.4 \pm 11.2 ^c	77
	+ 8f	264.6 \pm 23.5 ^c	52	197.0 \pm 11.3 ^c	53
+ 8g	211.9 \pm 28.4 ^c	65	167.2 \pm 26.4 ^c	60	

^aValues represent the mean \pm SEM from at least five animals. ^b $P < 0.05$ compared with saline-stimulated and saline-treated mice. LPS (25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$) was administered intranasally. ^c $P < 0.05$ compared with LPS-stimulated and saline-treated mice.

acceptor–donor system (NAH) surrounded by aromatic groups (Ar_1 and Ar_2). This comment supports the hypothesis that some of our compounds may act as multitarget drugs.

***In Vivo* Pulmonary Hyperreactivity Assays.** Compounds presenting the most favorable pharmacological *in vitro* profiles were then investigated *in vivo*. A murine model of acute lung inflammation and airway hyperresponsiveness was used to conduct a primary screening of the oral activity of the selected compounds in an efficacy comparison to rolipram.⁶⁸ A/J mice were challenged intranasally with LPS (25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$) and were given 100 $\mu\text{mol/kg}$ (30–35 mg/kg) of compounds 6b and 8a–g by gavage 1 h before provocation. The reference compound rolipram (10 mg/kg), cilomilast (3 mg/kg), and the vehicle (0.2% Tween-80) were also tested under the same conditions. As expected from previous findings,⁶⁹ rolipram inhibited LPS-induced TNF- α and IL-6 production in lung tissue by 69% and 54%, respectively, whereas 6b inhibited these cytokines by 74% and 65%, respectively (Table 6). Moreover, cilomilast almost abolished TNF- α and IL-6 generation (84% and 100% inhibition, respectively; Table S1, see Supporting Information). Concerning the tested compounds, higher inhibitory potency was exhibited by compounds 8f and 8b for both TNF- α (100% and 80%) and IL-6 (99% and 80%), respectively (Table 6). Since it is not feasible to increase the rolipram dosing in A/J mice without inducing significant toxic effects, our findings suggest that the selected *N*-methyl-NAH derivatives (6b, 8f,

and 8b) are more effective than rolipram and as effective as cilomilast in the *in vivo* setting. We also found that compounds 8a and 8c–f provided protective effects comparable to those of rolipram, whereas 8g failed to prevent TNF- α and IL-6 production in the lung tissue. This finding differs from that obtained *in vitro* by using the PBMC system, in which 8g was the most potent compound (Table 5). The lack of *in vivo* activity of 8g, despite the marked PDE4 inhibitory capacity and anti-TNF- α potency ($\text{IC}_{50} = 50 \text{ nM}$ and $\text{EC}_{50} = 520 \text{ nM}$, respectively; Tables 2 and 5), is likely due to physicochemical properties, including cell permeability and water solubility of this compound. Further investigation in this area is ongoing.

Intranasal administration of LPS induces strong lung inflammation, with macrophage activation and recruitment of neutrophils to the interstitium, alveoli, and airways of mice.^{70,71} As shown in Table 7, LPS stimulation led to a significant accumulation of leukocytes in the bronchoalveolar space, characterized predominantly by neutrophil infiltration (87%). Mononuclear cells and eosinophils were also present but in lower proportions (8% and 5%, respectively; data not shown). Significant neutrophil infiltration of the lungs of A/J mice following LPS stimulation has been documented in prior studies.⁷² This result is also consistent with findings in other mouse models^{73,74} and in other species, including rats,⁷⁴ rabbits,⁷¹ dogs,⁷⁵ pigs,⁷⁶ sheep,⁷⁷ and primates.⁷⁸ Lung neutrophilia induced by LPS is associated with the upregulation

Table 8. Effect of a Single Oral Administration of Either 45 $\mu\text{mol/kg}$ Rolipram (10 mg/kg) or Selected NAH Derivatives (100 $\mu\text{mol/kg}$, 30–35 mg/kg, Oral) on LPS-Evoked Airway Hyperreactivity (Changes in Lung Resistance and Lung Elastance) 18h Postchallenge Following Provocation with Increasing Aerosolized Concentrations of Methacholine (0, 3, 9, and 27 mg/mL)

stimulus	treatment	resistance ^a (AUC _{0–27})	inhibition (%)	elastance ^a (AUC _{0–27})	inhibition (%)
saline	vehicle	202.0 \pm 21.0		9676 \pm 1150	
LPS	vehicle	496.0 \pm 260 ^b		25677 \pm 5976 ^b	
	+ rolipram	218.1 \pm 289 ^c	95	10315 \pm 2123 ^c	96
	+ 6b	234.5 \pm 467 ^c	92	13101 \pm 2479 ^c	79
	+ 8a	325.2 \pm 358 ^c	58	17410 \pm 1199 ^c	51
	+ 8b	332.8 \pm 283 ^c	56	15376 \pm 570 ^c	64
	+ 8c	400.5 \pm 234 ^c	33	14189 \pm 1606 ^c	72
	+ 8d	318.4 \pm 472 ^c	61	15753 \pm 2862 ^c	62
	+ 8e	290.2 \pm 308 ^c	70	14704 \pm 3738 ^c	69
	+ 8f	316.4 \pm 326 ^c	61	16249 \pm 1941 ^c	59
	+ 8g	392.1 \pm 386 ^c	36	15863 \pm 3170 ^c	61

^aValues are shown as area under the curve formed following treatment with a aerosolized methacholine, containing concentrations ranging from 0 to 27 mg/mL (AUC_{0–27}), capturing both lung resistance and elastance. Values represent the mean \pm SEM from at least four animals. LPS (25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$) was administered intranasally. ^b $P < 0.05$ compared with saline-stimulated and saline-treated mice. ^c $P < 0.05$ compared with LPS-stimulated and saline-treated mice.

of vascular cell adhesion molecules and increased discharge of neutrophilic granules. This system has been used to study intervention strategies for several pathologies including sepsis, acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, asthma, and COPD.^{78–80} In the present study, we showed that 10 mg/kg rolipram caused a inhibition of 70% in LPS-induced neutrophilia (Table 7) and also reduced mononuclear and eosinophil numbers (data not shown). In another set of experiments, 3 mg/kg cilomilast led to a 43% blockade of the LPS-induced neutrophil infiltration into the airway space (Table S1, see Supporting Information). The maximum inhibition of LPS-induced neutrophilia by rolipram was similar to that observed with other highly potent PDE4 inhibitors such as GSK256065 and roflumilast in LPS models of lung inflammation.^{81,82} Similar to rolipram, 6b and 8a–g significantly inhibited (50–77%) LPS-induced lung neutrophilia. Some of these compounds, 8a, 8d, and 8e inhibited the total leukocyte and neutrophil infiltration to a greater degree than the reference compounds rolipram (Table 7) and cilomilast (Table S1, see Supporting Information).

Bronchial hyperreactivity, defined as increased airway responsiveness to nonspecific bronchoconstrictor agents, is a pivotal characteristic of asthma and a well-established marker of the severity of this disease. Administration of LPS into the airways of mice leads to early bronchopulmonary hyperreactivity, which is independent of both TNF- α synthesis and neutrophil infiltration into murine lungs.⁸³ To examine the effect of 6b and 8a–g on LPS-induced airway hyperreactivity, we measured airway resistance and elastance in anesthetized and mechanically ventilated mice using the invasive whole-body plethysmography technique. Provocation with aerosolized methacholine of mice subjected to LPS-intranasal instillation clearly upregulated lung baseline levels of airway resistance and elastance, and these changes were clearly sensitive to cilomilast (100–93% inhibition) and rolipram (95–96% inhibition), as shown in Table S1 (Supporting Information) and Table 8, respectively. Compound 6b was shown to be almost as effective as the references in preventing LPS induced airway hyperreactivity; all selected compounds, including 8g, showed significant inhibition of this parameter.

Molecular Modeling. Molecular modeling studies were carried out to examine the molecular basis of PDE4 inhibitory

activity by *N*-methyl-NAH compounds and to investigate the pharmacophoric role of the 3,4-dimethoxyphenyl group connected to the imine function. This study was performed with compound 8a, because it does not have substituents on the phenyl ring linked to the imine function and it shows no significant difference in its IC₅₀ compared with the other compounds (higher than 1 or 2 orders of magnitude). Only *E*-isomers were evaluated in this study because of the experimental evidence of the configuration of the substituents on the imine group.

Molecular Docking. The binding interactions were determined by docking the inhibitors in the active site. The FlexX molecular docking program⁸⁴ interfaced with Sybyl 7.3 (tripos.com) on a Linux Red Hat v.5 workstation was employed to find possible interactions of *N*-methyl-NAH inhibitors and the PDE4 active site. FlexX is an automated docking program based on incremental construction that accounts for ligand flexibility by changing the conformations of the ligand in the active site while making the protein rigid.

The crystal structure of zardaverine bound to human PDE4D was used (PDB ID code 1XOR; resolution 1.54 Å).⁸⁵ The choice of this PDE4D was based on the direct correlation of its cocrystallized compound (zardaverine) and our NAH series, and the highly conserved amino acid sequence of both PDE4 genes (B and D). Although the compounds have been tested on bovine smooth muscle PDE4, the high homology among PDE4s in mammals including PDE4A, B, C, D genes led us to expect similar results for human PDE4, which was confirmed in the current study. Amber F99 charges⁸⁶ and hydrogen atoms were assigned in the Biopolymer module, available in Sybyl 7.3. The active site was defined at approximately 8.0 Å from the cocrystallized ligand, zardaverine, and care was taken to cover the important residues Gln369 and Phe372 and also the Zn²⁺ and Mg²⁺ metal ions. The default FlexX scoring function was used to rank order the docked conformational groups, and the best-docked result for each group was then used to analyze the binding interactions.

Molecular Conformation Considerations. The 30 best ranked poses observed for 8a and PDE4 presented score values ranging from –24.44 to –199.0 kJ/mol and showed some similarities in the conformational diversity. Thus, they have been split into three major groups of conformers (Figure 3),

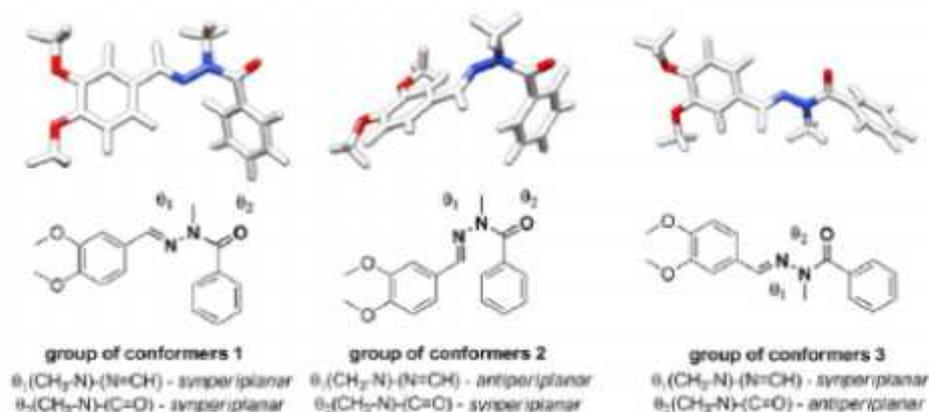


Figure 3. Groups of conformers obtained through visual analysis from the molecular docking study.

and their best energies for each group and for zardaverine are depicted in Table 9. There were only small free energy

Table 9. FlexX Scores for Groups 1–3 on PDE4D

compound	FlexX score ^a	IC ₅₀ ^b (nM)
zardaverine	-29.55	800
8a (group 1)	-21.87	140
8a (group 2)	-24.44	140
8a (group 3)	-22.12	140

^aFlexX score in kJ/mol. ^bThe IC₅₀ was calculated by nonlinear regression and represents the mean value of three independent measurements. The experimental error is approximately 15%.

differences observed among the three groups of conformations, and there was no direct correlation between potency and FlexX score obtained for zardaverine and 8a, indicating that no group could be excluded.

The first group presented the methyl bridged to the amide function in a *synperiplanar* position related to the carbonyl oxygen and the methylene of the imine. In the second group, the methyl was in a *synperiplanar* position with respect to oxygen and in an *antiperiplanar* position to the imine methylene. In the third group, the methyl was *antiperiplanar* to the methyl and *synperiplanar* compared with methylene (Figure 3).

Analysis of the Binding Cavity Access. Binding cavity access analysis was conducted to observe the binding modes and to correlate them with enzyme inhibition.

Group 1 binds to the enzyme and blocks the entrance of the catalytic site, including the region where catalytic water molecules and metal ions are located (Figure 4). Judging from visual inspection of the inhibitor–PDE4 complex, the insertion of substituents in the aromatic ring linked to the carbonyl group would not jeopardize the interaction of the *N*-methyl-NAH function with amino acid residues in the active site, thereby supporting the inhibition profile of these compounds.

Group 2 shows a binding position around the catalytic site but without a complete blockage of the catalytic water molecules and metal ions (Figure 4). Nevertheless, it could be hypothesized that this position would be effective in blocking cAMP entrance, because this conformation is bulky

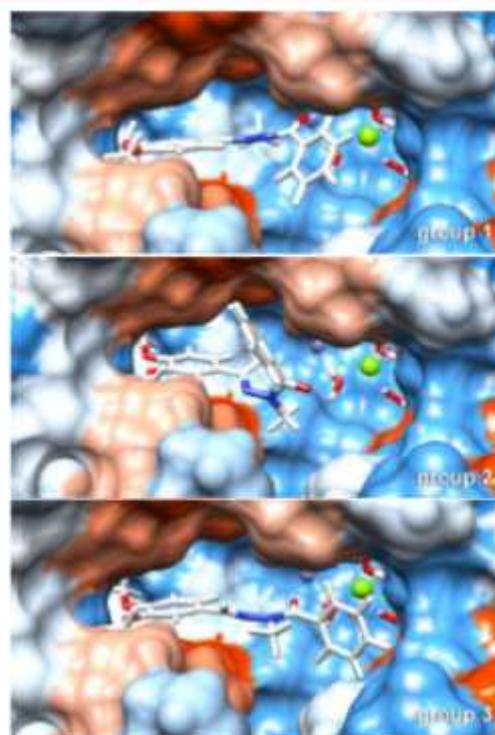


Figure 4. Binding cavity of PDE4D with the docked groups 1, 2, and 3. Docking studies were performed by using the program FlexX.³⁴

and the interior of the binding site is closely associated with the *N*-methyl-NAH chain.

The analysis of group 3 shows an excellent hypothetical interaction with the binding site of PDE4. However, the introduction because of the aromatic ring linked to the carbonyl would not be tolerated because they would lie in a sterically hindered region, unavailable for new substituents (Figure 4). Additionally, the *antiperiplanar* orientation of the methyl group related to the oxygen carbonyl is not considered to be stable for *N*-methyl-NAH compounds, as observed in X-ray crystallography of methylated compounds.^{35,37} Finally, the *antiperiplanar*

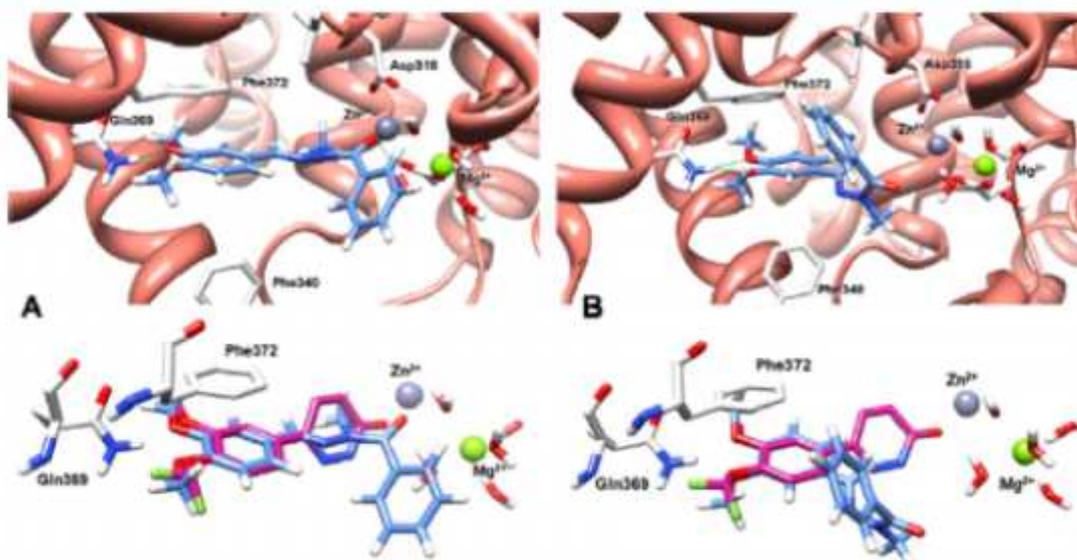


Figure 5. (A) Binding interactions of group 1 of **8a** (blue) with PDE4D (top) and its superposition with zardaverine (violet) inside the catalytic site (bottom). (B) Binding interactions of group 2 of **8a** (blue) with PDE4D (top) and its superposition with zardaverine (violet) inside the catalytic site (bottom). Docking studies were performed by using the program FlexX.⁸⁴

orientation is more favorable in compounds that present secondary amide bonds, such as observed in NAH **5a–g** and **7a–f**. However, these compounds have not shown any significant PDE4 inhibition. Therefore we can conclude that group 3 compounds could not be real.

Molecular Basis of the Interactions of Conformers from Groups 1 and 2 with PDE4. Molecular docking allowed us to compare the binding interactions of the conformer groups 1 and 2 and of zardaverine and their surroundings by the amino acid residues in the catalytic site. A 3D analysis shows that group 1 conformers have a significant superimposition with zardaverine (Figure 5A), in which the 3,4-dimethoxyphenyl and acylhydrazide groups of group 1 and zardaverine occupy the same space in the catalytic site and are involved in the same type of interactions. Both ether oxygen atoms of the 3,4-dimethoxyphenyl moiety of zardaverine and the group 1 conformers are involved in bifurcated hydrogen bonds to the side chain of Gln369 and perform π -stacking with Phe372. Additionally, the carbonyl group of **8a** interacts with Zn²⁺ via a water molecule, while zardaverine chelates the metal ion directly (Figure 5A).

Group 2 conformers interact in the binding site of PDE4D in a similar manner as the conformers from group 1, characterized by hydrogen bonding of the 3,4-dimethoxyphenyl group and Gln369 and π -stacking with Phe372 (Figure 5B). However, different from group 1, group 2 does not fill the binding pocket in the same region as the acylhydrazide chain of zardaverine. Instead, the *N*-methyl-NAH chain is oriented to the exterior, positioning the aromatic ring linked to the carbonyl group at the entrance of the catalytic site. Thus, the carbonyl does not interact with the metal ions, which is mandatory for inhibitory activity, and the aromatic ring is located in a sterically open region, which might be occupied by substituted aromatic rings without interfering in the activity profile.

The two binding modes considered so far may be correlated to the inhibitory activities toward PDE4 *in vitro* (Table 9). As

observed by docking studies, all *para*-substituents in Ar₁ fall into a region without steric hindrance, where they cannot perform new interactions with the catalytic site (see Ar₁ *para*-position on Figures 4 and 5). Perhaps the differences in activities found between these compounds is due to the effects of solvation and desolvation or electronic effects generated on the carbonyl group, which is responsible for interaction with the water in the region of the metal. Apparently, donor groups such as –OH and –OMe led to an increase in activity with respect to –H, while –Cl slightly reduced the activity. Substituents *ortho*- and *meta*-OMe in Ar₂, in turn, could find regions with slightly more steric hindrance, as is visible in Figures 4 and 5, and also could result in reorientation of the aromatic ring, which slightly reduces its activity but does not perceptibly change the theoretical results. In fact, the binding mode evaluation of other compounds in the series with similar inhibition profiles has shown similar docking poses (data in Supporting Information).

Design of Conformationally Restricted NAHs and Their Pharmacological Evaluation. Based on the molecular docking studies of **8a**, two possible interactions with the catalytic site were proposed (Figure 5). There are two possible bioactive conformations, as previously described by our group.⁸⁸ We have designed a set of four different NAH structurally related compounds to validate the theoretical results and propose new scaffolds for PDE4i activity (Figures 6 and 7).

As illustrated in Figure 6, the semifolded conformation from group 1 provided the quinazoline **19** by bridging the carbonyl oxygen onto the *ortho* position of the benzamide (mode a) and the indazole **20** resulted from the incorporation of the hydrazine into a pyrazole ring system (mode b). Conversely, because of the folded conformation from group 2, the 2,3-benzodiazepinones **21** and **22** were designed by bridging the imine carbon onto the *ortho* position of benzamide through a methylene group (mode c) (Figure 7).

K

doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00000

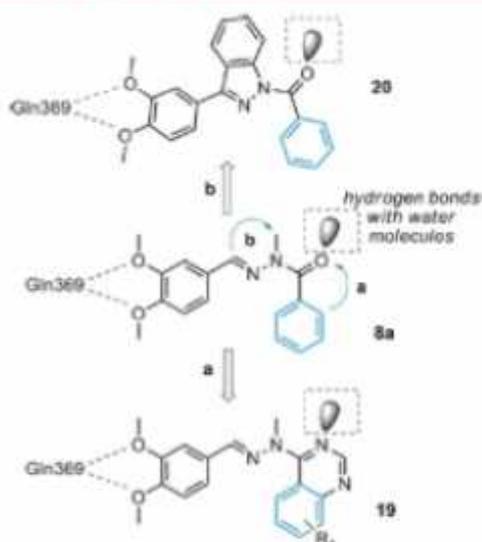


Figure 6. Design of conformationally constrained derivatives 19 and 20.

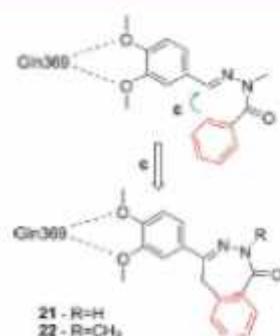


Figure 7. Design of conformationally restricted derivatives 21 and 22.

The conformationally restricted compounds (19–22) were screened for their PDE4 activity, as previously described. The results are shown in Table 10 and reveal that only the quinazolinone 19 ($IC_{50} = 190$ nM) was as potent as the prototype 8a ($IC_{50} = 140$ nM), suggesting that group 1 could represent the actual bioactive conformation. The lowest activity for 20

Table 10. PDE4 and TNF- α Inhibition of NAH-Mimetic Heterocyclic Compounds

compd	PDE4		TNF- α IC_{50}^b (μ M)
	% inh ^a	IC_{50}^b (μ M)	
8a	97.1	0.14	1.75 ± 0.82
19	96.0	0.19	1.90 ± 0.17
20	81.2	4.1	c
21	78.8	5.2	14% at 10 μ M
22	76.5	7.3	20% at 10 μ M

^aPercent inhibition of the PDE4 activity after incubation with the target compound at a drug concentration of 10 μ M. ^bThe IC_{50} and IC_{50} were calculated by nonlinear regression and d represents the mean value of three measurements; the experimental error is approximately 15%. ^cNot determined.

($IC_{50} = 4.1$ μ M), which was also designed from group 1, could be attributed to steric hindrance introduced by the indanole ring in the catalytic site.

Because of the similar *in vitro* pharmacological profile between 8a and 19, we investigated the *in vivo* pharmacological profile for this new quinazolinone derivative (Table 11 and Figure 8). As shown in Table 11, LPS stimulation of A/J mice yielded a significant increase in total leukocyte number detected in BAL fluid samples 18 h postchallenge. This deviation was marked by a significant increase in the number of neutrophils. These changes were clearly sensitive to treatment with 19 (100 μ mol/kg). However, 8a inhibited the increase in numbers of total leukocyte and neutrophils by 62% and 67%, respectively, while 19 was less effective and displayed inhibition of only 47% and 49%, respectively. Additionally, LPS increased the TNF- α and IL-6 levels approximately 4-fold, 18 h after challenge, and this increase was inhibited by treatment with 19 by 70% and 86%, respectively. This inhibition was similar to the response observed with 8a treatment (Table 6).

LPS exacerbated airway resistance and elastance lung response to inhaled methacholine (3–27 mg/mL) compared with control mice challenged with saline (Figure 8A,B, respectively). Figure 8 also shows that treatment with 19 inhibited airway resistance and elastance in mice subjected to LPS challenge by 82% and 66%, respectively (AUC), while treatment with 8a inhibited by 56% and 64%, respectively (AUC). These results suggest that molecular restriction performed in 19 can serve as a tool for further development of new PDE4 inhibitors with relevant *in vivo* activities.

CONCLUSION

This study described a novel pharmacological profile for N-methyl-NAH derivatives. When this important chemotype was flanked by two substituted aromatic ring systems (Ar_1 and Ar_2), it provided a novel series of PDE inhibitors. The selectivity for different PDE isoforms was driven by the following specific substituent effects: (i) The N-methylation and substitution at Ar_2 was critical. In particular, the presence of methoxy groups in both *meta* and *para* positions oriented the selective inhibition toward PDE4 (submicromolar). (ii) Substitution at Ar_1 increased potency toward PDE4 (e.g., compound 8g), increased the selectivity profile toward other isoenzymes (e.g., compound 8b), or completely reoriented the selectivity profile to other PDE subtypes (e.g., compound 8d). The SAR analysis highlighted the most effective compounds, which displayed both *in vitro* and *in vivo* anti-TNF- α properties.

Based on both the conformational analysis of N-methyl-NAH derivatives and the 3D molecular docking studies showing the prototypical PDE4 inhibitor ranlaverine in the active site of PDE4, novel heterocyclic NAH-mimetic compounds were designed, synthesized, and tested *in vitro*. The quinazolinone derivative (19) appeared as a conformationally restricted NAH mimetic, showing similar effects of both PDE4 inhibition and anti-TNF- α properties, when compared with the corresponding free rotating NAH derivative 8a.

Our working hypothesis was very efficient because it started with rapid identification of a valuable hit (8a) originated from a versatile chemical library (NAHs), followed by rational design of a novel class of heterocyclic NAH-mimetics (19 as representative) with potent *in vitro* and presenting oral activity.

11a with 4-chlorobenzaldehyde, as a powder with mp 195–196 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.76 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.74 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz), 7.59–7.49 (m, 4H), 7.08 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 3.94 (s, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.6, 151.8, 148.4, 145.9, 134.4, 133.4, 128.9, 128.9, 128.6, 125.4, 121.1, 111.0, 55.6. IR (KBr) 3442, 3221, 1649, 1599, 1269, 1016. MS *m/z* [*M*⁺] 320 (*M*⁺, 1%), 318 (*M*⁺, 3%), 181 (22%), 165 (100%), 139 (4%), 137 (14%). Anal. Calcd for C₁₆H₁₅ClN₂O₂: C, 60.29; H, 4.74; N, 8.79. Found: C, 60.33; H, 4.71; N, 8.69.

(*E*)-*N*-(4-Methoxybenzylidene)-3,4-dimethoxybenzohydrazide (5e). The title compound was obtained in 97% yield, by condensing **11a** with 4-methoxybenzaldehyde, as a powder with mp 173–174 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.58 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.67 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.56 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.49 (s, 1H), 7.10–7.00 (m, 3H), 3.83 (s, 6H), 3.80 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.5, 160.8, 151.7, 148.4, 147.2, 128.6, 127.0, 125.6, 120.9, 114.4, 111.0, 55.6, 55.3. IR (KBr) 3248, 1647, 1609, 1256, 1020. MS *m/z* [*M*⁺] 314 (*M*⁺, 3%), 181 (32%), 165 (100%), 137 (5%), 133 (5%). Anal. Calcd for C₁₇H₁₉N₂O₄: C, 64.96; H, 5.77; N, 8.91. Found: C, 64.62; H, 5.81; N, 8.78.

(*E*)-*N*-(4-Hydroxybenzylidene)-3,4-dimethoxybenzohydrazide (5f). The title compound was obtained in 93% yield, by condensing **11a** with 4-hydroxybenzaldehyde, as a powder with mp 225–227 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.52 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.56 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.54–7.49 (m, 3H), 7.07 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 3.83 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.4, 159.4, 151.6, 148.4, 147.7, 128.8, 125.7, 125.5, 120.9, 115.8, 111.0, 55.7, 55.6. IR (KBr) 3278, 3182, 1647, 1603, 1271, 1026. MS *m/z* [*M*⁺] (N,O-CH₃ derivatization) 328 (*M*⁺, 5%), 195 (11%), 165 (100%), 137 (4%), 133 (7%). Anal. Calcd for C₁₇H₁₇N₂O₄: C, 63.99; H, 5.37; N, 9.33. Found: C, 63.80; H, 5.41; N, 9.14.

(*E*)-3,4-Dimethoxy-*N*-(2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)methylene)benzohydrazide (5g). The title compound was obtained in 73% yield, by condensing **11a** with 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine-3-carbaldehyde, as a powder with mp 235–236 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.75 (s, 1H), 9.62 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz), 8.82 (s, 1H), 7.70–7.47 (m, 4H), 7.23 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz), 7.09 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 2.50 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.1, 151.7, 148.4, 147.1, 145.0, 137.5, 128.0, 127.5, 125.4, 120.8, 115.9, 115.8, 114.1, 111.1, 110.8, 55.7, 13.1. IR (KBr) 3421, 3203, 1633, 1612, 1267, 1026. MS *m/z* [*M*⁺] 338 (*M*⁺, 3%), 181 (25%), 165 (100%), 157 (3%), 137 (6%). Anal. Calcd for C₁₉H₁₉N₄O₂: C, 63.89; H, 5.36; N, 16.56. Found: C, 63.78; H, 5.39; N, 16.51.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)benzohydrazide (7a). The title compound was obtained in 71% yield, by condensing **11b** with 3,4-dimethoxybenzaldehyde, as a powder with mp 171–172 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.78 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.90 (d, 2H, *J* = 6.7 Hz), 7.59–7.48 (m, 3H), 7.38 (s, 1H), 7.20 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.02 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 3.81 (s, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.2, 150.9, 149.2, 148.2, 133.6, 131.8, 128.6, 127.7, 127.1, 122.0, 111.6, 108.3, 55.6. IR (KBr) 3225, 1645, 1599, 1267, 1026. MS *m/z* [*M*⁺] 284 (*M*⁺, 4%), 163 (5%), 121 (30%), 105 (100%). Anal. Calcd for C₁₆H₁₆N₂O₃: C, 67.59; H, 5.67; N, 9.85. Found: C, 67.51; H, 5.68; N, 9.88.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)benzo[d][1,3]dioxole-5-carbohydrazide (7b). The title compound was obtained in 83% yield, by condensing **11c** with 3,4-dimethoxybenzaldehyde, as a powder with mp 182–183 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.65 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.48 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.41 (s, 2H), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.04–6.97 (m, 2H), 6.09 (s, 2H), 3.79 (s, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 151.0, 150.5, 149.3, 148.2, 147.7, 127.4, 127.3, 123.1, 122.4, 111.7, 108.5, 108.4, 107.8, 102.1, 55.9, 55.8. IR (KBr) 3230, 1651, 1599, 1267, 1034. MS *m/z* [*M*⁺] 328 (*M*⁺, 7%), 165 (32%), 163 (15%), 149 (100%), 121 (13%). Anal. Calcd for C₁₉H₁₆N₂O₅: C, 62.19; H, 4.91; N, 8.53. Found: C, 62.16; H, 4.94; N, 8.43.

(*E*)-4-Chloro-*N*-(3,4-dimethoxybenzylidene)benzohydrazide (7c). The title compound was obtained in 73% yield, by condensing **11d**

with 3,4-dimethoxybenzaldehyde, as a powder with mp 159–160 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.16 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.92 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.59 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.37 (s, 1H), 7.20 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.01 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 3.80 (s, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.1, 150.9, 149.2, 148.5, 136.6, 132.1, 129.6, 128.7, 126.9, 122.2, 111.6, 108.4, 55.6. IR (KBr) 3423, 3226, 1640, 1605, 1269, 1026. MS *m/z* [*M*⁺] 320 (*M*⁺, 3%), 318 (*M*⁺, 8%), 163 (100%), 148 (20%), 139 (60%), 111 (22%). Anal. Calcd for C₁₆H₁₅ClN₂O₂: C, 60.29; H, 4.74; N, 8.79. Found: C, 60.20; H, 4.72; N, 8.81.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-4-methoxybenzohydrazide (7d). The title compound was obtained in 72% yield, by condensing **11e** with 3,4-dimethoxybenzaldehyde, as a powder with mp 169–170 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.61 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.90 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.33 (s, 1H), 7.18 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 7.04 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.01 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 3.82 (s, 9H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.4, 161.9, 150.6, 149.1, 147.4, 129.4, 127.1, 125.6, 121.6, 113.6, 111.5, 108.2, 55.4. IR (KBr) 3443, 3225, 1645, 1605, 1252, 1022. MS *m/z* [*M*⁺] 314 (*M*⁺, 5%), 163 (22%), 151 (25%), 135 (100%), 107 (7%). Anal. Calcd for C₁₇H₁₉N₂O₄: C, 64.96; H, 5.77; N, 8.91. Found: C, 64.83; H, 5.79; N, 8.77.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-4-hydroxybenzohydrazide (7g). The title compound was obtained in 61% yield, by condensing **11h** with 3,4-dimethoxybenzaldehyde, as a powder with mp 234–235 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.53 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.80 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.32 (s, 1H), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.01 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 6.86 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 3.80 (s, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.7, 160.6, 150.6, 149.1, 147.1, 129.6, 127.3, 124.0, 121.6, 115.0, 111.5, 108.2, 55.5. IR (KBr) 3271, 3064, 1651, 1605, 1261, 1016. MS *m/z* [*M*⁺] (N,O-CH₃ derivatization) 328 (*M*⁺, 7%), 165 (15%), 163 (7%), 135 (100%), 107 (7%). Anal. Calcd for C₁₉H₁₇N₂O₄: C, 63.99; H, 5.37; N, 9.33. Found: C, 63.73; H, 5.32; N, 9.12.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine-3-carbohydrazide (7h). The title compound was obtained in 72% yield, by condensing **11i** with 3,4-dimethoxybenzaldehyde, as a powder with mp 223–225 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.41 (s, 1H), 8.85 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.25 (s, 1H), 7.60 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.41 (dd, 1H, *J*_{ax} = 7.1 Hz, *J*_{bx} = 8.5 Hz), 7.28 (s, 1H), 7.18 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.07–6.99 (m, 2H), 6.86 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 3.80 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 2.57 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 50.7, 149.0, 146.3, 145.3, 127.2, 126.9, 126.8, 121.6, 116.2, 115.2, 113.0, 111.5, 108.2, 55.6, 15.7. IR (KBr) 3211, 1634, 1601, 1269, 1026. MS *m/z* (*N*-methyl derivative) [*M*⁺] 352 (*M*⁺, 7%), 189 (3%), 163 (6%), 159 (100%), 131 (1%). Anal. Calcd for C₁₉H₁₉N₄O₂: C, 63.89; H, 5.36; N, 16.56. Found: C, 63.52; H, 5.30; N, 16.42.

General Procedure for Selective *N*-Methylation of 5a–e and 7a–f (Compounds 6a–e and 8a–f). The corresponding *N*-acylhydrazones derivative (1.0 mmol) and potassium carbonate (3.0 mmol) were suspended in 5 mL of acetone. The suspension was thoroughly mixed under vigorous stirring for 5 min, and then methyl iodide (3.0 mmol) was added. The reaction was heated at 50 °C and maintained under stirring for 24 h. Afterward, the reaction was evaporated under reduced pressure; the residual solid was suspended in 2 mL of ethanol and then poured into cold water containing a small amount of sodium bisulfite. Purification was achieved by simple filtration, washing of the crude material (water, petroleum ether), and drying under reduced pressure to afford the desired *N*-methyl-NAH derivatives 6a–e and 8a–f.

(*E*)-*N*-Benzylidene-3,4-dimethoxy-*N*-methylbenzohydrazide (6a). The title compound was obtained in 87% yield, by *N*-alkylation of **5a** with methyl iodide, as a powder with mp 99–100 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (s, 1H), 7.55 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz), 7.47 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.40–7.33 (m, 4H), 7.08 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 3.96 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.57 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 151.1, 147.8, 139.0, 135.0, 129.7, 128.9, 127.1, 127.0, 124.4, 113.9, 109.8, 56.0, 29.2. IR (KBr) 2960, 2912, 1645, 1601, 1261, 1024. MS *m/z* [*M*⁺] 298 (*M*⁺, 6%), 195 (10%), 165 (100%), 137 (5%), 103 (8%). Anal. Calcd for C₁₇H₁₉N₂O₃: C, 68.44; H, 6.08; N, 9.39. Found: C, 68.21; H, 6.06; N, 9.21.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-3,4-dimethoxy-*N*-methylbenzohydrazide (**6b**). The title compound was obtained in 91% yield, by *N*-alkylation of **5b** with methyl iodide, as a powder with mp 115–116 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (s, 1H), 7.44 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.38 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.06 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 6.92–6.81 (m, 2H), 3.96–3.78 (m, 12H), 3.54 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.3, 150.9, 150.6, 149.5, 147.8, 138.6, 128.2, 127.6, 124.3, 121.7, 113.9, 110.9, 109.6, 108.2, 56.1, 55.8, 29.0. IR (KBr) 2958, 2918, 1647, 1599, 1269, 1020. MS *m/z* [M⁺] 358 (M⁺, 4%), 195 (12%), 165 (100%), 163 (4%), 137 (5%). Anal. Calcd for C₂₀H₂₆N₂O₆: C, 63.67; H, 6.19; N, 7.82. Found: C, 63.52; H, 6.22; N, 7.75.

(*E*)-*N*-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-3,4-dimethoxy-*N*-methylbenzohydrazide (**6c**). The title compound was obtained in 93% yield, by *N*-alkylation of **5c** with methyl iodide, as a powder with mp 189–190 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (s, 1H), 7.44 (dd, 1H, *J*_{ax} = 8.6 Hz, *J*_{bx} = 2.1 Hz), 7.38 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 7.08 (s, 1H), 6.99 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 6.90 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 3.95 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.53 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.3, 151.0, 149.1, 148.5, 147.9, 138.8, 129.7, 127.4, 124.3, 123.3, 113.8, 109.8, 108.4, 105.7, 101.5, 56.1, 29.2. IR (KBr) 2966, 2914, 1641, 1601, 1269, 1029. MS *m/z* [M⁺] 342 (M⁺, 3%), 195 (15%), 165 (100%), 147 (13%), 146 (22%), 137 (5%). Anal. Calcd for C₁₉H₂₀N₂O₆: C, 63.15; H, 5.30; N, 8.18. Found: C, 62.94; H, 5.31; N, 7.99.

(*E*)-*N*-(4-Chlorobenzylidene)-3,4-dimethoxy-*N*-methylbenzohydrazide (**6d**). The title compound was obtained in 97% yield, by *N*-alkylation of **5d** with methyl iodide, as a powder with mp 109–110 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 11.76 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.74 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz), 7.59–7.49 (m, 4H), 7.08 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 3.84 (s, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.5, 151.2, 148.0, 137.6, 135.5, 133.6, 129.2, 128.4, 127.2, 124.4, 113.8, 109.9, 56.1, 29.2. IR (KBr) 2960–2935, 1660, 1601, 1269, 1026. MS *m/z* [M⁺] 334 (M⁺, 1%), 332 (M⁺, 3%), 195 (6%), 165 (100%), 139 (3%), 137 (13%). Anal. Calcd for C₁₇H₁₇ClN₂O₄: C, 61.36; H, 5.15; N, 8.42. Found: C, 61.11; H, 5.15; N, 8.26.

(*E*)-3,4-Dimethoxy-*N*-(4-methoxybenzylidene)-*N*-methylbenzohydrazide (**6e**). The title compound was obtained in 98% yield, by *N*-alkylation of **5e** with methyl iodide, as a powder with mp 57–58 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (s, 1H), 7.49 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 7.45 (dd, 1H, *J*_{ax} = 8.2 Hz, *J*_{bx} = 1.6 Hz), 7.38 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz), 6.90 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 6.86 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 3.94 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.55 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.3, 160.9, 151.0, 147.8, 138.9, 128.7, 127.8, 127.5, 124.3, 114.3, 113.9, 109.8, 56.0, 55.5, 29.1. IR (KBr) 2962–2935, 1637, 1609, 1261, 1022. MS *m/z* [M⁺] 328 (M⁺, 3%), 195 (20%), 165 (100%), 137 (5%), 133 (10%). Anal. Calcd for C₁₉H₂₀N₂O₆: C, 65.84; H, 6.14; N, 8.53. Found: C, 65.69; H, 6.26; N, 8.23.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-*N*-methylbenzohydrazide (**6a**). The title compound was obtained in 93% yield, by *N*-alkylation of **7a** with methyl iodide, as a powder with mp 105–106 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (s, 1H), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.42–7.36 (m, 3H), 7.09 (s, 1H), 7.20 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.82 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 3.88 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.55 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 171.0, 150.5, 149.4, 138.5, 135.6, 130.0, 129.8, 128.0, 127.2, 121.8, 110.7, 107.8, 56.0, 55.6, 28.6. IR (KBr) 2956–2914, 1640, 1603, 1269, 1026. MS *m/z* [M⁺] 298 (M⁺, 18%), 293 (12%), 163 (98%), 134 (11%), 105 (100%), 77 (57%). Anal. Calcd for C₁₇H₁₈N₂O₄: C, 68.44; H, 6.08; N, 9.39. Found: C, 68.22; H, 6.03; N, 9.23.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-*N*-methylbenzo[d][1,3]dioxole-5-carbonylhydrazide (**6b**). The title compound was obtained in 92% yield, by *N*-alkylation of **7b** with methyl iodide, as a powder with mp 204–205 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (s, 1H), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.27 (s, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.98 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.83 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.80 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.03 (s, 2H), 5.98 (s, 2H), 3.52 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 162.9, 150.3, 148.0, 148.0, 134.4, 130.1, 128.9, 128.9, 127.2, 122.9, 108.1, 107.7, 101.9, 29.2. IR (KBr) 2964–2918, 1647, 1607, 1269/1033. MS *m/z* [M⁺] 342 (M⁺, 6%), 179 (12%), 162 (5%), 149

(100%), 121 (13%). Anal. Calcd for C₁₉H₂₀N₂O₆: C, 63.15; H, 5.30; N, 8.18. Found: C, 62.80; H, 5.28; N, 7.99.

(*E*)-4-Chloro-*N*-(3,4-dimethoxybenzylidene)-*N*-methylbenzohydrazide (**6c**). The title compound was obtained in 93% yield, by *N*-alkylation of **7d** with methyl iodide, as a powder with mp 119–120 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.70 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.68 (s, 1H), 7.40 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.04 (s, 1H), 7.02 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 6.83 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 3.93 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.53 (s, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.0, 150.8, 149.5, 139.1, 136.2, 134.1, 131.5, 127.9, 127.5, 121.8, 110.9, 108.0, 56.1, 55.7, 28.7. IR (KBr) 2956–2935, 1657, 1605, 1271, 1053. MS *m/z* [M⁺] 334 (M⁺, 4%), 332 (M⁺, 12%), 193 (17%), 178 (9%), 163 (100%), 139 (70%), 111 (25%). Anal. Calcd for C₁₉H₁₉ClN₂O₄: C, 61.36; H, 5.15; N, 8.42. Found: C, 61.53; H, 5.09; N, 8.25.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-*N*-methylbenzohydrazide (**6d**). The title compound was obtained in 85% yield, by *N*-alkylation of **7e** with methyl iodide, as a powder with mp 92–93 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.80 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.67 (s, 1H), 7.17 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 7.03 (dd, 2H, *J*_{ax} = 8.3 Hz, *J*_{bx} = 1.7 Hz), 6.90 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.83 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 3.88 (s, 9H), 3.83 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.52 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.2, 161.3, 150.4, 149.3, 138.2, 132.4, 128.2, 127.4, 121.6, 112.4, 110.7, 108.0, 55.9, 55.6, 55.3, 28.7. IR (KBr) 2956–2916, 1609, 1607, 1267, 1254, 1049, 1026. MS *m/z* [M⁺] 328 (M⁺, 8%), 165 (15%), 163 (6%), 135 (100%), 107 (7%). Anal. Calcd for C₁₉H₂₀N₂O₆: C, 65.84; H, 6.14; N, 8.53. Found: C, 65.82; H, 6.04; N, 8.20.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-3-methoxy-*N*-methylbenzohydrazide (**6e**). The title compound was obtained in 75% yield, by *N*-alkylation of (*E*)-*N*-(3,4-dimethoxybenzylidene)-3-methoxybenzohydrazide with methyl iodide, as a powder with mp 62–63 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.61 (s, 1H), 7.25–7.04 (m, 3H), 6.95 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 6.92–6.81 (m, 2H), 6.74 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 3.81 (s, 9H), 3.74 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.50 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.6, 156.2, 150.4, 149.2, 137.8, 129.9, 128.2, 127.2, 121.6, 120.1, 110.5, 110.4, 107.4, 55.9, 55.7, 55.5, 28.0. IR (KBr) 2999, 2970, 2935, 2837, 1626, 1603, 1577, 1516, 1269, 1240, 1040, 1030. MS *m/z* [M⁺] 328 (M⁺, 11%), 164 (35%), 135 (100%), 107 (35%), 92 (8%), 77 (22%). Anal. Calcd for C₁₉H₂₀N₂O₆: C, 65.84; H, 6.14; N, 8.53. Found: C, 65.78; H, 6.23; N, 8.49.

(*E*)-*N*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-2-methoxy-*N*-methylbenzohydrazide (**6f**). The title compound was obtained in 91% yield, by *N*-alkylation of (*E*)-*N*-(3,4-dimethoxybenzylidene)-2-methoxybenzohydrazide with methyl iodide, as a powder with mp 103–104 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.53 (s, 1H), 7.31–7.20 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 6.86–6.87 (m, 3H), 6.69 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 3.78 (s, 9H), 3.67 (s, 3H), 3.56 (s, 3H), 3.43 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.8, 158.7, 150.6, 149.4, 138.6, 136.8, 128.2, 128.0, 122.3, 121.8, 115.9, 115.1, 110.6, 107.8, 55.9, 55.5, 55.3, 28.6. IR (KBr) 3080, 3001, 2945, 2910, 2837, 1668, 1604, 1512, 1261, 1034, 1018. MS *m/z* [M⁺] 328 (M⁺, 8%), 163 (11%), 135 (100%), 92 (9%), 77 (18%). Anal. Calcd for C₁₉H₂₀N₂O₆: C, 65.84; H, 6.14; N, 8.53. Found: C, 65.88; H, 6.12; N, 8.28.

General Procedure for the Preparation of *N*-Methyl-NAH Compounds **6fg and **8g**h.** To a solution of the corresponding *N*-methylbenzohydrazide derivative **16a–c** (0.83 mmol), prepared as described previously,¹⁹ in absolute ethanol (7 mL) containing one drop of 37% hydrochloric acid was added 0.87 mmol of the corresponding aldehyde derivative. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. Next, the solvent was partially concentrated at reduced pressure, and the resulting mixture was poured into ice. After neutralization with 10% aqueous sodium bicarbonate solution, the precipitate formed was collected by filtration and dried under vacuum to afford the desired *N*-methyl-NAH derivatives **6f**g and **8g**h.

(*E*)-*N*-(4-Hydroxybenzylidene)-3,4-dimethoxy-*N*-methylbenzohydrazide (**6f**). The title compound was obtained in 72% yield, by condensing **16a** with 4-hydroxybenzaldehyde, as a powder with mp 164–165 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.74 (s, 1H), 7.48–7.37 (m, 5H), 6.90 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 3.83 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.8, 158.3, 151.1, 147.8, 140.1,

mmol) were added, and the resulting suspension was heated to reflux. MeOH (2 mL) was added dropwise to this resulting mixture, which was heated for 15 min. The reaction was then cooled at room temperature and diluted with MeOH (10 mL). The mixture was filtered on Celite and concentrated under reduced pressure. The obtained crude oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc 10% to 25% in heptane) to afford **29** as a brown oil in 89% yield. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.63 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.48 (dd, 1H, *J* = 7.5, 7.5 Hz), 7.35 (dd, 1H, *J* = 7.5, 7.5 Hz), 7.19 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.08 (s, 1H), 6.85 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 3.96 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.90 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.8, 149.3, 148.2, 133.2, 131.2, 131.0, 129.9, 127.0, 124.7, 123.5, 114.9, 113.8, 110.6, 91.3, 86.6, 55.2, 55.2, 51.4. IR (KBr) 2924, 2852, 2360, 2341, 2206, 1727, 1593, 1513, 1248, 1133, 1078, 1024, 759, 699, 527.

3-(3,4-Dimethoxyphenyl)isocoumarin (30) A solution of **29** (550 mg, 1.86 mmol) in trifluoroacetic acid (2 mL) was stirred for 1 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was partitioned between EtOAc (20 mL) and water (20 mL). The organic layer was further washed with brine (2 × 20 mL), dried (Na₂SO₄), evaporated *in vacuo*, and subsequently purified by column chromatography on silica gel (AcOEt 30% to 50% in heptane) to afford **30** as a white powder in 91% yield, mp = 110–112 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.21 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.66 (ddd, 1H, *J* = 1.0, 7.8, 8.3 Hz), 7.40 (ddd, 3H, *J* = 2.0, 8.3, 8.6 Hz), 7.30 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 6.86 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 6.82 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.88 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 163.9, 153.9, 151.1, 149.5, 138.4, 135.6, 130.0, 128.3, 126.2, 124.9, 120.0, 118.9, 111.6, 108.5, 101.3, 56.4, 56.3. IR (KBr) 2932, 2836, 2352, 1722, 1631, 1600, 1512, 1463, 1262, 1215, 1169, 1142, 1070, 808, 756, 537.

(E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2,5-dihydro-1H-benzo[d][1,2]diazepin-7-one (21) Within a flask was dissolved the isocoumarin **30** (100 mg, 0.35 mmol) in 5 mL of *n*-BuOH. Then was added hydrazine hydrate (41 mg, 0.89 mmol), and the mixture was heated to 100 °C for 5 h. At the end of reaction, the solvent was evaporated at reduced pressure to half of initial volume, and the residual solution was taken to an ice bath. After 6 h, the precipitate formed was filtered under vacuum on Büchner funnel furnishing the benzodiazepine **21** in 87% yield, as a solid with mp = 206–207 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.89 (s, 1H), 7.96 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.45 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.34 (m, 3H), 7.21 (m, 2H), 6.82 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 3.97 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 167.8, 160.1, 151.4, 149.3, 137.3, 133.4, 131.6, 130.9, 127.8, 127.7, 127.1, 120.3, 110.5, 109.5, 56.0, 35.3. IR (KBr) 3437, 3275, 3190, 3065, 2914, 1657, 1601, 1517, 1425, 1275, 1022. MS *m/z* [M⁺] 296 (M⁺, 91%), 267 (100%), 252 (16%), 165 (20%). Anal. Calcd for C₁₇H₁₈N₂O₃: C, 68.91; H, 5.44; N, 9.45. Found: C, 68.90; H, 5.49; N, 9.33.

(E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-methyl-2,5-dihydro-1H-benzo[d][1,2]diazepin-7-one (22) To a solution of isocoumarin **30** (100 mg, 0.35 mmol) in 5 mL of *n*-BuOH was added methylhydrazine (41 mg, 0.89 mmol), and the resulting mixture was heated to 100 °C for 5 h. At the end of reaction, the volatiles were evaporated at reduced pressure to half of initial volume, and the residual solution was taken to an ice bath. After 1 h, the precipitate was filtered under vacuum on Büchner funnel furnishing the benzodiazepine **22** in 82% yield, as a solid with mp = 147–149 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.91 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.34 (m, 4H), 7.17 (m, 2H), 6.82 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 3.89 (s, 2H), 3.85 (s, 6H), 3.57 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 166.1, 160.9, 151.4, 149.3, 137.5, 132.4, 130.8, 128.9, 127.6, 126.3, 120.4, 110.5, 109.5, 56.0, 39.2, 35.3. IR (KBr) 3437, 3275, 3190, 3065, 2914, 1657, 1601, 1517, 1425, 1275, 1022. IR (KBr) 2932, 2836, 2352, 1722, 1631, 1600, 1512, 1463, 1262, 1215, 1169, 1142, 1070, 808, 756, 537. MS *m/z* [M⁺] 310 (M⁺, 80%), 281 (100%), 266 (12%). Anal. Calcd for C₁₈H₂₀N₂O₃: C, 69.66; H, 5.85; N, 9.03. Found: C, 69.65; H, 5.87; N, 8.99.

Pharmacological Evaluation. PDE Inhibition. PDE4 was isolated from the media layer of bovine aorta according to a modification of the previously reported method.⁵⁶ PDE activities were measured by the two-step assay previously described⁵⁶ at a [³H]-cAMP or [³H]-cGMP concentration of 1 μM substrate in a buffer solution of 50 mM of Tris-

HCl at pH 7.5, containing 2 mM of magnesium acetate and 1 mg mL⁻¹ of BSA. PDE4 was assayed at 1 μM cAMP, 1 mM EGTA. To prevent the influence of reciprocal cross-contamination between PDE3 and PDE4, the studies were always carried out in the presence of 50 μM cGMP for PDE4. PDE1, PDE3, and PDE5 were isolated by anion-exchange chromatography from bovine aortic smooth muscle cytosolic fraction as previously described.⁵⁶ PDE2 was isolated from human platelets.⁵⁷ Purified PDEs were stored at aliquots at -80 °C until use. PDE inhibitors were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final concentration of 1%. At this concentration, DMSO had no significant effect on PDE activity. The concentration of drugs that produced 50% inhibition of substrate hydrolysis (IC₅₀) was calculated by nonlinear regression analysis from concentration response curves and included different concentrations of inhibitors. The results represent the mean of three determinations obtained for three different enzymatic preparations. The experimental error is about 15%.

TNF-α Inhibition. Subjects. Healthy donors who had no clinical history were selected for this study. This work was approved by the local ethics committee (CCPRB d'Alsace no. 1) and carried out according to national guidelines.

Peripheral Blood Mononuclear Cells. PBMCs from healthy subjects were separated as previously described.⁵² Briefly, peripheral blood diluted with Hank's balanced salt solution, Ca²⁺ and Mg²⁺ free, containing 100 IU/mL heparin was layered over Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and centrifuged for 30 min at 400g (20 °C). Cells harvested from the interface were washed three times in HBSS-CMP and resuspended at a final concentration of 2 × 10⁶ mL⁻¹ in a culture medium. Human PBMCs were incubated with increasing doses of the tested drugs ranging from 10⁻⁸ to 10⁻³ M, with or without activation by lipopolysaccharide from *Salmonella abortus equi* (Sigma, L'Isle d'Alsace Chemin, France) in 24 well culture plates (Falcon, Poly Labo, Strasbourg, France) for 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. After incubation, supernatants were removed and stored at -80 °C until ELISA. Cell viability was assessed by the Trypan blue exclusion test.

Immunoassays for TNF-α. Culture supernatants were assayed with two-site ELISAs specific for human interleukin: TNFα antibodies (Antibody Solutions, HaF Moon Bay, CA, USA). Quantitative evaluation of TNFα secreted by PBMCs was achieved by ELISA using conditions as previously described.⁵⁸ Poly(vinyl chloride) plates (Costar, no. 2596) were coated with 50 mL per well of antibodies (15 μg mL⁻¹) and incubated overnight at 4 °C. After the usual wash and non-specific saturation steps, 25 mL of standard or sample was added to 25 mL of biotinylated monoclonal antibody (2 μg mL⁻¹) for 2 h at room temperature. Following washing steps, 50 mL of peroxidase streptavidin dilution (1:3000 in PBS) was added (1 h at room temperature). A colorimetric reaction (O.D. at 450 nm) using *O*-phenylenediamine as peroxidase substrate was performed ensuring four washing steps. Concentrations (pg/mL) of unknown samples were computed by interpolation with a standard curve run on each plate using four parameters logistics analysis. Standard human recombinant protein, h-TNFα, was purchased from R&D Systems Europe (Abingdon, U.K.).

In Vivo Assays. Animals. Female A/J mice, 4–6 weeks old, were used in the experiments. All animals were obtained from Oswaldo Cruz Foundation and maintained in the animal-housing facilities at a controlled room temperature (22–25 °C) and a 12 h (6 a.m. to 6 p.m.) light–dark cycle. Procedures involving the care and use of laboratory animals were examined and approved by the Animal Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (L-0028/06 CEUA-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil).

LPS-Induced Lung Inflammation. Female A/J mice were anesthetized with aerosolized halothane for provocation by nasal instillation with LPS (25 μg/25 μL) or saline (negative control), 18 h before assays. Rolipram (Sigma) and compounds **6b** and **8a–g** were dissolved in 0.2% Tween 80 (vehicle) and dosed orally 1 h before LPS. Cilomilast (Axon MedChem) (1.6 mg) was dissolved in 1 M NaOH (about 80 μL), made up to 600 μL of distilled water, and then neutralized with 1 N HCl. All treatments were performed orally 1 h before LPS challenge.

Invasive Assessment of Respiratory Mechanics. Airway responsiveness was assessed as a change in airway function 18 h after provocation with aerosolized methacholine in a FinePoint R/C Buxco Platform (Buxco Electronics, Sharon, CT, USA). Mice were anaesthetized with nembatal (60 mg/kg). Neuromuscular activity was blocked with bromide pancuronium (1 mg/kg). Tracheostomized mice were mechanically ventilated and lung function was assessed. The trachea was cannulated and the cannula was connected to a pneumotachograph. Airflow and transpulmonary pressure were recorded using a Buxco pulmonary mechanics processing system (Buxco Electronics, Wilmington, NC, USA). This instrument was used to calculate lung resistance (cm H₂O/(mL·s)) and elastance (cm H₂O/mL) in each breath cycle. Analog signals from the computer were digitized using a Buxco analog/digital converter (Buxco Electronics). Mice were allowed to stabilize for 5 min, and increasing concentrations of methacholine (3, 9, and 27 mg/ml) were aerosolized for 5 min each. Baseline pulmonary parameters were assessed with aerosolized phosphate-buffered saline (PBS). Expressed results comprised the mean absolute values of the responses of lung resistance and elastance collected during 5 min after the administration of methacholine aerosol.

Bronchoalveolar Lavage. After evaluation of ARH, mice were killed, and bronchoalveolar lavage (BAL) was performed twice by intratracheal instillation of 800 μ L of PBS and EDTA (10 mM). The lavage fluid was centrifuged, and cell pellets were resuspended in PBS, final volume 250 μ L. The number of leukocytes in BAL fluid was estimated in a Neubauer chamber. Cytospin slides were prepared from BAL fluid and stained with Giemsa stain. At least 100 cells were counted per slide under light microscopy, and they were differentiated according to standard morphological criteria.

ELISA. ELISA measurement of TNF- α and IL-6 was performed on lung tissue lysates of A/J mice provoked with LPS or saline. Briefly, microwell strips were coated with an anti-TNF α or an anti-IL-6 murine monoclonal antibody (R&D Systems) overnight. Samples were then added to the wells and incubated with the biotinylated antibody (R&D Systems) for 2 h at room temperature. HRP-conjugated streptavidin was applied on samples before signal revelation.

Duration of Anesthesia Induced by the Association of Xylazine and Ketamine. These experiments were done following procedures previously described.^{29,62} In distinct animal groups, 8d or 8g (30–200 μ mol/kg), ropipran (1–50 μ mol/kg), or vehicle (0.2% Tween 80) was subcutaneously administered into 8–12-week-old female A/J mice, 30 min prior to an intraperitoneal injection of a mixed solution of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (70 mg/kg). The duration of anesthesia (i.e., period in which the animal remained on its back spontaneously) was measured as the end point.

Statistical Analyses. Statistical analyses were carried out with ANOVA followed by the Newman–Keuls–Student test. P<0.05 (two-tailed test) was considered significant.

Docking Studies. *General.* All calculations have been performed on a PC running under Linux Red Hat v5.0 workstation. Structural manipulations were performed using Sybyl 7.3.⁹⁴

Preparation of the Ligands. The ligands were built in Spartan '08 (Wavefunction Inc.). After preliminary minimization with the MMFF force field,⁹⁵ it was submitted to full-energy minimization with the semiempirical method AM1,⁹⁶ also in Spartan '08. A systematic conformational search was performed on the rotatable bonds using default angles. The lowest-energy conformation was selected for further AM1 geometry optimization, and Gasteiger–Hückel charge was assigned for docking studies, as required by the docking software.

Selection of Protein Crystal Structures. Ligand-bound crystallographic structures of PDE4 are available in the Protein Data Bank. The crystal structure of zardaverine bound to human PDE4D was used (PDB ID code 1XOR; resolution 1.54 Å).⁸⁵ The active recognition site of the ensemble has been defined as the collection of residues within 8.0 Å of the bound inhibitor and comprised the union of all ligands of the ensemble. All atoms located less than 8.0 Å from any ligand atom were considered, covering the important residues Gln369 and Phe372 and also the Zn²⁺ and Mg²⁺ metal ions. Proteins were prepared for the

docking studies using the Biopolymer module of Sybyl 7.3. Amber F99⁸⁵ charges were attributed to the protein atoms.

Next, Biopolymer protein analysis tool was used, in a stepwise process of analysis and correction of geometry parameters. For each structure, the description of an ensemble contains the definition of the protein atoms (via chain identifiers and hetero groups), the resolution of ambiguities in the PDB file (alternate location indicators, etc.), the location of hydrogen atoms at hetero atoms, and the definition of the active site atoms. The assignment of hydrogen positions has been made on the basis of default rules except for the definition of the hydrogen positions inside the histidine side chain. The side chains of lysine and arginine and the carboxylate groups of aspartic and glutamic acid have been modeled in their ionized states. Water molecules contained in the catalytic site of the PDB file have been maintained. The default FlexX scoring function was used to rank order the docked conformational groups, and the best-docked result for each group was then used to analyze the binding interactions.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

¹H and ¹³C NMR spectra of all *N*-acylhydrazones, *N*-methyl-*N*-acylhydrazones, and their constrained heterocyclic analogues and the effects of clemast in LPS-induced airway hyper-reactivity. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +55-21-2562-6644. Fax: +55-21-2562-6478. E-mail: ejbarreiro@ccsdecania.ufrj.br.

Present Address

[†]Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465, Km7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil.

Author Contributions

[‡]These authors contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to CAPES-COFECUB (2260/06-9), INCT-INOFAR (BR, Grant No. 573.564/2008-6), PRONEX (B.R., Grant No. E-26/110.367/2010), CNPq (B.R.), and FAPERJ (B.R.) for financial support and fellowships.

■ ABBREVIATIONS USED

NAH, *N*-acylhydrazone; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; IL, interleukin; Gln369, glutamine 369; Phe372, phenylalanine 372; PDE4i, phosphodiesterase 4 inhibition; BAL, bronchoalveolar lavage

■ REFERENCES

- Beavo, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 1995, 75, 725–748.
- Conti, M.; Jin, S. L. The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res. Mol Biol.* 1999, 63, 1–38.
- Houslay, M. D. Adaptation in cyclic AMP signalling processes: A central role for cyclic AMP phosphodiesterases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1998, 9, 161–167.
- Keravis, T.; Lugnier, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: Benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br. J. Pharmacol.* 2012, 165, 1288–1305.

- (5) Francis, S. H.; Turko, I. V.; Corbin, J. D. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Relating structure and function. *Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2000**, *65*, 1–52.
- (6) Manalack, D.; Hughes, R.; Thompson, P. The next generation of phosphodiesterase inhibitors: Structural clues to ligand and substrate selectivity of phosphodiesterases. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3449–3462.
- (7) Lagnier, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *109*, 366–398.
- (8) Menniti, F. S.; Faraci, W. S.; Schmidt, C. J. Phosphodiesterases in the CNS: Targets for drug development. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 660–670.
- (9) Houslay, M. D.; Schafer, P.; Zhang, K. Y. J. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1501–1519.
- (10) Wang, D. G.; Deng, C. J.; Bugaj-Gaweda, B.; Kwan, M.; Gunwalden, C.; Leonard, C.; Xin, X. N.; Hu, Y. H.; Unterbeck, A.; De Vivo, M. Cloning and characterization of novel PDE4D isoforms PDE4D6 and PDE4D7. *Cell Signalling* **2003**, *15*, 883–891.
- (11) Castro, A.; Jerez, M. J.; Gil, C.; Martinez, A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in immunomodulatory responses: Advances in the development of specific phosphodiesterases inhibitors. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 229–244.
- (12) Banner, K. H.; Trevelick, M. A. PDE4 inhibition: A novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 430–436.
- (13) Draheim, R.; Egenland, U.; Rundfeldt, C. Anti-inflammatory potential of the selective phosphodiesterase 4 inhibitor *N*-(3,5-dichloro-pyrid-4-yl)-[1-(4-fluorobenzyl)-5-hydroxy-indole-3-yl]-glyoxylic acid amide (AWD 12-281), in human cell preparations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *308*, 555–563.
- (14) Jeffery, P. Phosphodiesterase 4-selective inhibition: Novel therapy for the inflammation of COPD. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2005**, *18*, 9–17.
- (15) O'Donnell, J. M.; Zhang, H. Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 158–163.
- (16) Spina, D. The potential of PDE4 inhibitors in respiratory disease. *Curr. Drug Targets: Inflammation Allergy* **2004**, *3*, 231–236.
- (17) O'Byrne, P. M.; Gauvreau, G. Phosphodiesterase-4 inhibition in COPD. *Lancet* **2009**, *374*, 665–667.
- (18) Pages, L.; Gavalda, A.; Lehner, M. D. PDE4 inhibitors: A review of current developments (2005–2009). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19*, 1501–1519.
- (19) Page, C. P.; Spina, D. Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12*, 1–12.
- (20) Kodumuthak, A.; Jabari, S. S. L.; Pal, M. Recent advances on phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5471–5489.
- (21) Anschler, H. Fluoroalkoxy-substituted benzamides and their use as cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. US Patent 5,712,298, 1998.
- (22) Fabbrì, L. M.; Calverley, P. M. A.; Inquiere-Alonso, J. L.; Bundschuh, D. S.; Brosse, M.; Martinez, F. J.; Rabe, K. F. Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: Two randomized clinical trials. *Lancet* **2009**, *374*, 695–703.
- (23) Hatzelmann, A.; Mercillo, E. J.; Lungarella, G.; Adnot, S.; Sanjar, S.; Beume, R.; Scholt, C.; Tenor, H. The preclinical pharmacology of roflumilast - A selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2010**, *23*, 235–256.
- (24) Calverley, P. M. A.; Rabe, K. F.; Goehring, U. M.; Kristiansen, S.; Fabbrì, L. M.; Martinez, F. J. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: Two randomized clinical trials. *Lancet* **2009**, *374*, 685–694.
- (25) Duplantier, A. J.; Bacht, E.; Cheng, J.; Cohen, V.; Jenkinson, T.; Kraus, K.; McKechney, M.; Pillar, J.; Watson, J. SAR of a series of 5,6-dihydro-(9H)-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridines as potent inhibitors of human eosinophil phosphodiesterase. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 344–349.
- (26) Robichaux, A.; Stamatou, P. B.; Jin, C.; Lachance, N.; MacDonald, D.; Laliberté, F.; Liu, S.; Hwang, Z.; Conti, M.; Chan, C. C. Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens α 2-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioural correlate of emesis. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 1045–1052.
- (27) Dal Piaz, V.; Giovannoni, M. P. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 463–480.
- (28) Houslay, M. D.; Adams, D. R. Putting the lid on phosphodiesterase 4. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 38–40.
- (29) Gienbycz, M. A. 4D or not 4D - the emetogenic basis of PDE4 inhibitors uncovered! *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 548.
- (30) Gienbycz, M. A.; Field, S. K. Roflumilast: The first in class phosphodiesterase 4 inhibitor approved for the treatment of COPD. *Drug Disc. Dev. Ther.* **2010**, *4*, 147–158.
- (31) Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Medicinal chemistry of *N*-acylhydrazones: New lead-compounds of analgesic, anti-inflammatory and antithrombotic drugs. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 167–198.
- (32) Duarte, C. D.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Privileged structures: A useful concept for the rational design of new lead drugs candidates. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1108–1119.
- (33) Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Cardiotônicos: Histórico e perspectivas de uma antiga e importante classe de agentes terapêuticos. *Quim. Nova* **1996**, *19*, 182–189.
- (34) Barreiro, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: A descoberta de novo agente cardiotônico. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1172–1180.
- (35) Sudo, R. T.; Zapata-Sudo, G.; Barreiro, E. J. LASSBio 294, a novel cardiotropic agent, increases the calcium content in the sarcoplasmic reticulum of saponin-skinned cardiac fibres. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 603–613.
- (36) Silva, C. L. M.; Noel, F.; Barreiro, E. J. Vasodilatory properties of LASSBio 294 and its dependence on cGMP increase. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *135*, 293–298.
- (37) Dal Piaz, V.; Giovannoni, M.; Castellana, C.; Palacios, J.; Beleta, J.; Domenich, T.; Segarra, V. Hetero-cyclic-fused 3(2H)-pyridazinones as potent and selective PDE IV inhibitors: Further structure-activity relationships and molecular modelling studies. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1417–1421.
- (38) Lima, L. M.; Barreiro, E. J. Bioisosterism, an useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23–49.
- (39) Kümmerle, A. E.; Raimundo, J. M.; Leal, C. M. da Silva, G. S.; Ballano, T. L.; Pereira, M. A.; de Simone, C. A.; Sudo, R. T.; Zapata-Sudo, G.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene *N*-acylhydrazones derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4004–4009.
- (40) Silva, A. G.; Zapata-Sudo, G.; Kümmerle, A. E.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; Sudo, R. T. Synthesis and vasodilatory activity of new *N*-acylhydrazones derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3431–3437.
- (41) Yamada, S.; Morizono, D.; Yamamoto, K. Mild oxidation of aldehydes to the corresponding carboxylic acids and esters: Alkaline iodine oxidation revisited. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4329–4332.
- (42) Lima, P. C.; Lima, L. M.; da Silva, K. C. M.; Lida, P. H. O.; de Miranda, A. L. P.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Synthesis and analgesic activity of novel *N*-acylhydrazones and isomers, derived from natural safrole. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 187–203.
- (43) Lai, G.; Anderson, W. K. A simplified procedure for the efficient conversion of aromatic aldehydes into esters. *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 1281–1283.
- (44) Kaminski, J. J.; Bristol, J. A.; Puchalski, C.; Lovey, R. G.; Elliott, A. J.; Guzík, H.; Solomon, D. M.; Conn, D. J.; Domalski, M. S.

- Antitumor agents. I. Gastric antisecretory and cytoprotective properties of substituted imidazo[1,2-a]pyridines. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 876–892.
- (45) Ribeiro, I. G.; da Silva, K. C. M.; Parrini, S. C.; de Miranda, A. L. P.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Synthesis and antinociceptive properties of new structurally planned imidazo[1,2-a]pyridine 3-acylhydrazones derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 225–235.
- (46) Patel, J. M.; Dave, M. P.; Langalia, N. A.; Thaker, K. A. Studies on antitubercular agents preparation of 1-(4-methoxybenzoyl)-2-benzaldehyde and 2-aryl-3-(4-methoxybenzamido)-5-carboxymethyl-4-thiazolidinone. *J. Indian Chem. Soc.* **1985**, *62*, 254–255.
- (47) Kumar, P.; Narasimhan, B.; Sharma, D.; Judge, V.; Narang, R. Hansch analysis of substituted benzoic acid benzylidene/furan-2-yl-methylene hydrazides as antimicrobial agents. *Ind. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1853–1863.
- (48) Kumar, D.; Narang, R.; Judge, V.; Kumar, D.; Narasimhan, B. Antimicrobial evaluation of 4-methylsulfonyl benzylidene/3-hydroxy benzylidene hydrazides and QSAR studies. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 382–394.
- (49) Karabatsos, G. J.; Tallor, R. A. Structural studies by nuclear magnetic resonance. V. Phenylhydrazones. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3624–3629.
- (50) Palla, G.; Predieri, G.; Domiano, P.; Vignali, C.; Turner, W. Conformational behaviour and E/Z isomerism of N-acyl and N-arylhidrazones. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3649–3656.
- (51) Palla, G.; Pelizz, C.; Predieri, G.; Vignali, C. Conformational study on N-acylhidrazones of aromatic aldehydes by NMR-spectroscopy. *Gazz. Chim. Ital.* **1982**, *112*, 339–341.
- (52) Barco, A.; Benetti, S.; Polini, G. P. A facile alkylation of ethyl 2-oxocyclopentanecarboxylate. *Synthesis* **1973**, 316.
- (53) Benstead, D. J.; Hulme, A. N.; McNah, H.; Wight, P. An efficient synthesis of substituted hydrazides. *Synlett* **2005**, 1571–1574.
- (54) Spivry, A. C.; McKendrick, J.; Srikanth, R.; Helou, B. A. Solid-phase synthesis of an A–B loop mimetic of the C epsilon 3 domain of human IgE: Macrocyclization by Sonogashira coupling. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1843–1851.
- (55) Hellal, M.; Bourguignon, J.; Häbel, P. J. 6-endo-dig Cyclization of heteroarylamines to alkyenes promoted by Lewis acid catalyst in the presence of Brønsted acid. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 62–65.
- (56) Lugnier, C.; Schoeffter, P.; Le Bec, A.; Strouthou, E.; Stoclet, J. C. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 1743–1751.
- (57) Tcheudji, J. F. K.; Lebeau, L.; Vermeur, N.; Maftai, C. G.; Cote, R. H.; Lugnier, C.; Schultz, P. Molecular organization of bovine rod cGMP-phosphodiesterase 6. *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 781–791.
- (58) Kerevis, T. M.; Wells, J. N.; Hardman, J. G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from pig coronary arteries. Lack of interconvertibility of major forms. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *613*, 116–129.
- (59) Barreiro, E. J.; Kümmerle, A. E.; Fraga, C. A. M. The methylation effect in medicinal chemistry. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5215–5246.
- (60) Lagente, V.; Martin-Chouly, C.; Boichot, E.; Martins, M. A.; Silva, P. M. Selective PDE4 inhibitors as potent anti-inflammatory drugs for the treatment of airway diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2005**, *100* (Suppl 1), 131–136.
- (61) Robichaud, A.; Savoie, C.; Stamatou, P. B.; Tattersall, F. D.; Chan, C. C. PDE4 inhibitors induce emesis in ferrets via a noradrenergic pathway. *Neuropharmacology* **2001**, *40*, 262–269.
- (62) Robichaud, A.; Savoie, C.; Stamatou, P. B.; Lachance, N.; Jolicœur, P.; Rasmi, R.; Chan, C. C. Assessing the emetic potential of PDE4 inhibitors in rats. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *135*, 113–118.
- (63) Williams, R. O.; Feldmann, M.; Maini, R. N. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 9784–9788.
- (64) Barnes, P. J. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1994**, *150*, 542–549.
- (65) Renzetti, L. M.; Pacioni, P. M.; Tanni, S. A.; Rinaldi, N. C.; Tocchi, J. E.; Wasserman, M. A.; Gater, P. R. Pharmacological evidence for tumor necrosis factor as a mediator of allergic inflammation in the airways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *278*, 847–853.
- (66) Jin, S. L.; Conti, M. Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF-alpha responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 7628–7633.
- (67) Hartman, D. A.; Oshinski, S. J.; Carlson, R. P. The effects of anti-inflammatory and antiallergic drugs on cytokine release after stimulation of human whole blood by lipopolysaccharide and zymosan A. *Inflamm. Res.* **1995**, *44*, 269–274.
- (68) Headig, R. J.; Evans, D. Y. Emetic, central nervous system and pulmonary activities of rolipram in the dog. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *286*, 281–290.
- (69) Lagente, V.; Martin-Chouly, C.; Boichot, E.; Martins, M. A.; Silva, P. M. R. Selective PDE4 inhibitors as potent anti-inflammatory drugs for the treatment of airway diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2005**, *100*, 131–136.
- (70) Harrison, A. Role of alveolar macrophages in lipopolysaccharide-induced neutrophil accumulation. *Infect. Immun.* **1988**, *56*, 1858–1863.
- (71) Horn, R. G.; Collins, R. D. Fragmentation of granulocytes in pulmonary capillaries during development of the generalized Shwartzman reaction. *Lab. Invest.* **1968**, *19*, 451–459.
- (72) O'Malley, J.; Mateic, I. E.; Zink, M. C.; Strandberg, J. D.; Mooney, M. L.; De Maio, A.; Reeves, R. H. Comparison of acute endotoxin-induced lesions in A/J and C57BL/6J mice. *J. Hered.* **1998**, *89*, 525–530.
- (73) Gonçalves de Moraes, V. L.; Vargafig, B. B.; Lefort, J.; Meager, A.; Chignard, M. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *117*, 1792–1796.
- (74) McKay, D. G.; Margazette, W.; Casavoy, I. An electron microscope study of the effects of bacterial endotoxin on the blood-vascular system. *Lab. Invest.* **1966**, *15*, 1815–1829.
- (75) McCaffree, D. R.; Gray, B. A.; Pannock, B. E. Role of pulmonary edema in the acute pulmonary response to sepsis. *J. Appl. Physiol.* **1984**, *50*, 1198–1205.
- (76) Olson, N.; Brown, T., Jr.; Anderson, D. Effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase and catalase on endotoxemia in pigs. *J. Appl. Physiol.* **1985**, *58*, 274–284.
- (77) Meyrick, B.; Brigham, K. L. Acute effects of E. coli endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep. *Lab. Invest.* **1983**, *48*, 458–470.
- (78) Coulson, J. J.; Hoshaw, L. B.; Guenther, C. A. The pulmonary ultrastructure in septic shock. *Exp. Mol. Pathol.* **1970**, *12*, 84–103.
- (79) Burch, R. M.; Novotna-Blob, L.; Bator, J. M.; Lowe, V. C.; Sullivan, J. P. Mice treated with a leu-5-in or antibody to Mac-1 to inhibit leukocyte sequestration survive endotoxin challenge. *J. Immunol.* **1993**, *150*, 3397–3403.
- (80) Golec, M. Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing pleiotropic peptide. *Ann. Agric. Entom. Med.* **2007**, *14*, 1–4.
- (81) Tralau-Stewart, C. J.; Williamson, R. A.; Nials, A. T.; Gascoigne, M.; Dawson, J.; Hart, G. J.; Angell, A. D. R.; Solanki, Y. E.; Lucas, P. S.; Wiseman, J.; Ward, P.; Ranshaw, L. E.; Knowles, R. G. GSK256066, an exceptionally high-affinity and selective inhibitor of phosphodiesterase 4 suitable for administration by inhalation: in vitro, kinetic, and in vivo characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *337*, 145–154.
- (82) Sponcil, J.; Chapman, R.; Fine, J.; Jones, H.; Kreutner, W.; King, T. T.; Mieskowski, M. Comparison of PDE 4 inhibitors, rolipram and SB 207499 (Ariflo™), in a rat model of pulmonary neutrophilia. *Pharm. Pharmacol. Ther.* **2001**, *14*, 157–164.
- (83) Lefort, J.; Singer, M.; Leduc, D.; Renesto, P.; Nishori, M. A.; Huerto, M.; Crimmon, C.; Chignard, M.; Vargafig, B. B. Systemic administration of endotoxin induces bronchopulmonary hyper-reactivity dissociated from TNF-alpha formation and neutrophil sequestration into the murine lungs. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 474–480.

- (84) Eves, A.; Klebe, G. Ligand-supported homology modeling of G-protein-coupled receptor sites: models sufficient for successful virtual screening. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 248–251.
- (85) Card, G. L.; England, B. P.; Suzuki, Y.; Fong, D.; Powell, B.; Lee, B.; Liu, C.; Tabrizi, M.; Gillette, S.; Ibrahim, P. N.; Artis, D. R.; Bollag, G.; Milburn, M. V.; Kim, S. H.; Schlessinger, J.; Zhang, K. Y. Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases. *Structure* **2004**, *12*, 2233–2247.
- (86) Case, D. A.; Cheatham, T. E., III; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Man, K. M., Jr.; Ortuzar, A.; Simmering, C.; Wang, B.; Woods, R. The Amber biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688.
- (87) Kaguchi, H.; Hino, T.; Kawachi, E.; Shudo, K. Retinobenzoin acids. 4. Conformation of aromatic amides with retinoid activity. Importance of *trans*-amide structure for the activity. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2292–2296.
- (88) Kimmeler, A. E.; Vieira, M. M.; Schmitt, M.; Miranda, A. L.; Fraga, C. A.; Bourgaignon, J.; Barreiro, E. J. Design, synthesis and analgesic properties of novel conformationally-restricted *N*-acetylbenzoxones (NAB). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4963–4966.
- (89) Tobe, M.; Inoue, Y.; Tomizawa, H.; Nagasaki, T.; Takahashi, H.; Fukazawa, T.; Hayashi, H. Discovery of quinazolines as a novel structural class of potent inhibitors of NF- κ B activation. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 383–391.
- (90) Gineinah, M. M.; Ismael, A. E. M.; El-Kerdawy, M. M.; Glennon, R. A. Missionic 1,2,4-triazolo[4,3-*c*]quinazolines. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 723–726.
- (91) Collot, V.; Dallemagne, P.; Bovy, P. E.; Rault, S. Suzuki-type cross-coupling reaction of 3-iodoindazoles with aryl boronic acids: A general and flexible route to 3-aryloindazoles. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6917–6922.
- (92) Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **1968**, *97*, 77–89.
- (93) Reimund, J. M.; Wittersheim, C.; Dumont, S.; Miller, C. D.; Kenney, J. S.; Baumann, R.; Poindron, P.; Duclos, B. Increased production of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* **1996**, *39*, 684–689.
- (94) Sybyl, Version 7.3. Tripos Associates: St. Louis, MO, 2007.
- (95) Halgren, T. A. Merck molecular force field, II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 520–552.
- (96) Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902–3909.