

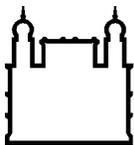
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ANÁLOGO DE
MEXILETINA, JME-209: IMPACTO NA INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR
FUMAÇA DE CIGARRO**

HYAGO DA SILVA GOMES

**Rio de Janeiro
2019**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

HYAGO DA SILVA GOMES

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ANÁLOGO DE
MEXILETINA, JME-209: IMPACTO NA INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR
FUMAÇA DE CIGARRO**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marco Aurélio Martins

RIO DE JANEIRO

2019

Gomes, Hyago da Silva.

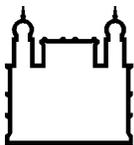
Estudo Pré-Clínico do Potencial Terapêutico Do Análogo de Mexiletina, JME-209: Impacto na Inflamação Pulmonar Induzida Por Fumaça de Cigarro / Hyago da Silva Gomes. - Rio de Janeiro, 2019.
107 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientador: Marco Aurélio Martins.

Bibliografia: f. 72-88

1. DPOC. 2. Inflamação. 3. Fumaça de Cigarro. 4. Anestésicos Locais. 5. Estudo Pré-Clínico. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

HYAGO DA SILVA GOMES

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ANÁLOGO DE
MEXILETINA, JME-209: IMPACTO NA INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR
FUMAÇA DE CIGARRO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marco Aurélio Martins

Aprovada em: 29/03/2019

EXAMINADORES:

Prof^a. Dra. Adriana Ribeiro Silva (FIOCRUZ)

Prof^a. Dra. Anissa Daliry (FIOCRUZ)

Prof^a. Dra. Manuella Lanzetti Daher de Deus (UFRJ)

Prof. Dr. Pedro Leme Silva (UFRJ)

Prof. Dr. Marcos Adriano da Rocha Lessa (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 29 de março de 2019.

*Ao meu grande amigo, conselheiro e avô, Octávio
(in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido conhecimento, força, paciência e saúde que foram essenciais para a conclusão dessa etapa da minha formação acadêmica.

Aos meus pais Claudia e Osmarino por tudo que fazem por mim e sempre estarem ao meu lado, independente das circunstâncias. Sempre aconselhando, cuidando e me incentivando com todo amor e carinho. Sem vocês nada disso seria possível. Vocês são a parte que me faz forte. Amo vocês demais, demais e demais!

As minhas irmãs Hyasmin e Hylana, minhas princesinhas. Por nossa amizade e por estarem sempre ao meu lado nas mais diversas circunstâncias e...pelas brigas de travesseiro e outras brincadeiras em plena madrugada...amo vocês!

Ao grande amor da minha vida, minha linda noiva Fernanda por ser muito mais do que apenas minha noiva, minha confidente, conselheira, psicóloga...minha eterna melhor amiga. Pelo amor, carinho, cuidado e paciência que nessa etapa, foram essenciais. Essa conquista não é só minha, é nossa! Como sempre te digo..."Onde quer que eu vá, o que quer que eu faça, sem você, não tem graça...". Te amo hoje e sempre!

Meus avós Eliana e Octávio (in memoriam), peças extremamente importantes em todas as minhas conquistas, sempre presentes em todas etapas da minha vida. Sou e serei eternamente grato por tudo que vocês fizeram por mim, desde minha criação na infância. Vô, mesmo você não estando em matéria aqui conosco, você é parte especial dessa conquista...obrigado por sempre ter demonstrado muito amor, carinho e orgulho desse neto que te ama demais...Amo vocês demais e demais!

Aos meus pets, os cães da casa Apollo, Johnny e Jade (in memoriam), meus hamsters (in memoriam) e minhas 3 mosqueteiras roedoras Branquinha, Fiona e Pretinha por me proporcionarem diversos momentos de alegria e felicidade que são essenciais na vida de qualquer ser humano.

Ao meu orientador, Dr Marco Aurélio Martins, um exímio pesquisador, o qual me espelho como profissional. Sou muito grato por ter sido acolhido e escolhido a 5 anos atrás, quando era ainda aluno de iniciação científica. Agradeço pela orientação sempre presente e pelas broncas e puxões de orelha que hoje tenho consciência que foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu coorientador, Diego Coutinho, pelo empenho e orientação sempre

presentes desde minha iniciação científica. Agradeço pelos auxílios e ensinamentos teórico e prático essenciais para os resultados obtidos nessa dissertação. Agradeço ainda pelos puxões de orelha que com toda certeza, foram essenciais para meu crescimento profissional.

A todos do Laboratório de Inflamação, pelo carinho que fui recebido e por todo apoio ao longo da realização desse trabalho. Agradeço principalmente aos amigos Amanda Cotias, Camila Procópio, Carolina Azevedo, Daiana Oliveira, Diego Coutinho, Letícia Lima e Maria Talita.

Ao Dr. Marcos Adriano por ter aceitado ser revisor deste trabalho e membro integrante da banca examinadora.

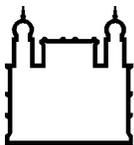
As Dras. Adriana Silva, Anissa Daliry, Manuella Lanzetti e Dr Pedro Leme por gentilmente terem aceitado o convite para integrarem a banca examinadora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ pela oportunidade da realização desse mestrado.

A CAPES pela bolsa de estudo para realização do mestrado.

“Let us dream of tomorrow where we can truly love from the soul, and know love as the ultimate truth at the heart of all creation.”

Michael Jackson



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

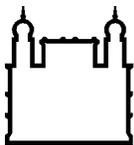
ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ANÁLOGO DE MEXILETINA, JME-209: IMPACTO NA INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR FUMAÇA DE CIGARRO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Hyago da Silva Gomes

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma disfunção inflamatória que acomete os pulmões, caracterizada pela obstrução progressiva e parcialmente irreversível das vias aéreas. Atualmente, inexistem medicamentos que possam controlar satisfatoriamente os quadros inflamatório e enfisematoso dos pacientes, justificando a necessidade de descoberta de novos fármacos para o tratamento da DPOC. Nosso grupo de pesquisa sintetizou e avaliou a atividade anti-inflamatória e espasmolítica de análogos estruturais do anestésico local mexiletina, dentre os quais destacou-se o análogo não anestésico JME-209. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial broncodilatador e anti-inflamatório do JME-209, elucidando sua viabilidade no tratamento da DPOC. Verificamos em nossos estudos, que o composto apresentou atividade anti-espasmódica otimizada, em comparação a mexiletina, confirmada por sua ação sobre o relaxamento da musculatura lisa traqueal em estudos *in vitro*. A atividade bronco-relaxante *in vivo* revelou que JME-209 apresentou tempo de ação broncodilatadora comparável ao agente farmacológico de referência clínica salmeterol. JME-209 foi também, eficiente em inibir alterações patológicas decorrentes do estímulo com LPS como a broncoconstrição, hiper-reatividade e a inflamação. O composto se destacou também, por inibir alterações fisiopatológicas decorrentes da provocação com LPS em um modelo de refratariedade a glicocorticoides, considerado de difícil tratamento. De maneira interessante, o tratamento com JME-209 reduziu o influxo de neutrófilos nas vias aéreas de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar induzida por exposição à fumaça de cigarro em um efeito relacionado com a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar. O análogo apresentou também, importante atividade sobre o dano oxidativo, refletida pela redução dos níveis de malondialdeído no tecido pulmonar. Concluímos que JME-209 faz parte de uma família de análogos de mexiletina que combina, de fato, propriedades broncodilatadoras e anti-inflamatórias que o credenciam como legítimo candidato a controlar situações fisiopatológicas associadas a doenças pulmonares como a DPOC e outras.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PRE-CLINICAL STUDY OF THE THERAPEUTIC POTENCIAL OF THE MEXILETINE ANALOG, JME-209: IMPACT ON CIGARETTE-SMOKE INDUCED PULMONARY INFLAMMATION

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Hyago da Silva Gomes

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is an inflammatory dysfunction that affects the lungs, characterized by progressive and partially irreversible obstruction of the airways. Currently, there are no drugs that can successfully control patients inflammatory and emphysematous regimens, justifying the need for the discovery of new drugs for COPD treatment. Our research group synthesized and evaluated the anti-inflammatory and spasmolytic activity of structural analogues of the local anesthetic mexiletine, among which the non-anesthetic analog JME-209 was highlighted. The main objective of this study was to evaluate the bronchodilator and anti-inflammatory potential of JME-209, elucidating its viability in the treatment of COPD. We verified in our studies that the compound presented optimized anti-spasmodic activity compared to mexiletine, confirmed by its action on the relaxation of the tracheal smooth muscle in *in vitro* studies. Broncho-relaxing activity *in vivo* revealed that JME-209 showed a bronchodilator time action comparable to the clinical pharmacological reference agent salmeterol. JME-209 was also efficient in inhibiting pathological changes resulting from LPS stimulation such as bronchoconstriction, hyperreactivity and inflammation. The compound also stood out for inhibiting pathophysiological changes resulting from the challenge with LPS in a model of refractoriness to glucocorticoids, considered difficult to treat. Interestingly, JME-209 treatment reduced the influx of neutrophils in the airways of mice submitted to the lung inflammation model induced by cigarette smoke exposure in an effect related to the reduction of proinflammatory cytokines in lung tissue. The analogue also presented important activity on oxidative damage, reflected by the reduction of malondialdehyde in lung tissue. We conclude that JME-209 is part of a mexiletine analogues family that, in fact, combines bronchodilator and anti-inflammatory properties that accredit it as a legitimate candidate to control pathophysiological conditions associated with pulmonary diseases such as COPD and others.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Composição química do cigarro.....	3
Figura 1.2 – Inflamação sistêmica e desenvolvimento de comorbidades em portadores de DPOC.....	5
Figura 1.3 – Esquema representativo da função e participação dos macrófagos, células centrais na patogénia da DPOC.....	9
Figura 1.4 - Esquema representativo da participação de células inflamatórias e mediadores pró inflamatórios na fisiopatologia da DPOC.....	12
Figura 1.5 – Impacto do estresse oxidativo na fisiopatologia da DPOC.....	14
Figura 1.6 – Desequilíbrio dos níveis de proteases e anti-proteases na fisiopatologia da DPOC.....	16
Figura 1.7 – Estrutura química do anestésico local lidocaína.....	23
Figura 1.8 – Estrutura química da mexiletina.....	26
Figura 1.9 – Estrutura química do análogo estrutural JME-209 (A) e inibição de correntes de sódio em células GH3 tratadas com mexiletina ou JME-209.....	28
Figura 3.1 – Esquema representativo do protocolo de avaliação da obstrução das vias aéreas avaliada por pletismografia barométrica não-invasiva em camundongos provocados com metacolina.....	32
Figura 3.2 – Esquema representativo do protocolo de avaliação da obstrução das vias aéreas avaliada por pletismografia barométrica não-invasiva em camundongos instilados com LPS.....	33

Figura 3.3 – Esquema representativo do protocolo de resposta inflamatória sensível ou insensível a glicocorticoides.....	34
Figura 3.4 – Esquema representativo do protocolo de lesão pulmonar induzida por inalação de fumaça de cigarro em camundongos C57BL/6.....	34
Figura 4.1 – Atividade anti-espasmódica de Mexiletina e JME-209 na contração de anéis isolados de traqueia de rato induzida por carbacol.....	37
Figura 4.2 – Resposta de broncoespasmo induzida por repetidas provocações com o agonista colinérgico metacolina ou veículo nos tempos de 0 h, 2h, 5h, 24 h e 48 h em camundongos A/J hípidos.....	39
Figura 4.3 – Efeito de JME-209 (1, 3 ou 10 mg/Kg, oral), salmeterol (3 ou 10 mg/Kg, oral) ou veículo (DMSO 1%, oral) sobre o aumento da resistência de vias aéreas (Penh) induzido por metacolina em camundongos A/J.....	40
Figura 4.4 – Efeito de JME-209 (10 ou 60 mg/Kg, oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou ipratrópio (25 µg/mL, 3 mL, aerossol) sobre o aumento da resistência das vias aéreas (Penh) induzido por LPS (25 µg/35 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J.....	42
Figura 4.5 - Efeito do tratamento com JME-209 (10 ou 60 mg/Kg via oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou ipratrópio (25 µg/mL, 3 mL, aerossol) sobre a hiper-reatividade à metacolina (150 mg/mL) na inflamação pulmonar causada por LPS (25 µg/35 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J.....	43
Figura 4.6 - Efeito do tratamento com JME-209 (10 ou 60 mg/Kg via oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou ipratroprio (25 µg/mL, 3 mL, aerossol) sobre os níveis de leucócitos totais (A) e neutrófilos (B) presentes no lavado broncoalveolar 48 h após provocação com LPS (25 µg/40 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J.....	44

Figura 4.7 - Efeito comparativo dos tratamentos oral (60 mg/Kg) e aerossol (10 mg/mL, 3 mL, 30 min) com JME-209 ou mexiletina sobre o aumento da resistência de vias aéreas (Penh) induzido por LPS (25 µg/40 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J.....	46
Figura 4.8 - Efeito comparativo dos tratamentos oral (60 mg/Kg) e aerossol (10 mg/mL, 3 mL, 30 min) com JME-209 ou mexiletina sobre a hiper-reatividade à metacolina (150 mg/mL) na inflamação pulmonar causada por LPS (25 µg/40 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J.....	47
Figura 4.9 - Efeito comparativo dos tratamentos oral (60 mg/Kg) e aerossol (10 mg/mL, 3 mL, 30 min) com JME-209 ou mexiletina sobre os níveis de leucócitos totais (A) e neutrófilos (B) presentes no lavado broncoalveolar 48 h após provocação com LPS (25 µg/40 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J.....	48
Figura 4.10 - Efeito de dexametasona (1 mg/Kg, oral) sobre a hiper-reatividade à metacolina (150 mg/mL) induzida por provocação única de LPS (25 µg/35µL, 35 µL /animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J.....	50
Figura 4.11 - Efeito de dexametasona (1 mg/Kg, oral) sobre o aumento dos níveis de leucócitos totais (A) e neutrófilos (B) induzido por provocação única de LPS (10 µg/40µL, 40 µL /animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J.....	51
Figura 4.12 - Efeito de dexametasona (1 mg/Kg, oral) ou JME-209 (30 mg/Kg) sobre a hiper-reatividade à metacolina induzida por 3 provocações consecutivas de LPS (10 µg/40µL, 40 µL /animal, aspiração orofaríngea) em intervalos de 24 h em camundongos A/J.....	52
Figura 4.13 - Efeito de dexametasona (1 mg/Kg, oral) ou JME-209 (30 mg/Kg) sobre o aumento dos níveis de leucócitos totais (A) e neutrófilos (B) no lavado broncoalveolar induzido por 3 provocações consecutivas de LPS (10 µg/40µL, 40 µL /animal, aspiração orofaríngea) em intervalos de 24 h.....	53

Figura 4.14 - Efeito de JME-209 (30 ou 60 mg/Kg via oral), mexiletina (60 mg/Kg, oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou veículo (água, oral) sobre o influxo leucocitário no BAL de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro.....55

Figura 4.15 - Efeito de JME-209 (30 ou 60 mg/Kg via oral), mexiletina (60 mg/Kg, oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou veículo (água, oral) sobre os níveis de IL1- β (A), MIP-1 α (B) e KC (C) no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro.....57

Figura 4.16 - Efeito de JME-209 (30 ou 60 mg/Kg via oral), mexiletina (60 mg/Kg, oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou veículo (água, oral) sobre os níveis aumentados de malondialdeído (MDA) no pulmão de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACh** – *Acetylcholine* (Acetilcolina)
AHR – *Airway Hyperresponsiveness* (Hiper-reatividade das vias aéreas)
AMPc – *Cyclic adenosine monophosphate* (Adenosina monofosfato cíclica)
AM – *Alveolar macrophage* (Macrófago alveolar)
ATP – Adenosina Trifosfato
BALD – Beta 2 agonistas de longa duração
BCA - *Bicinchoninic acid* (Ácido bicinconínico)
BSA – *Bovine serum albumine* (Albumina de soro bovino)
CAT – Catalase
CCL – C-c motif chemokine ligand (Ligante de quimiocina)
CD – *Cluster of differentiation* (Grupamento de diferenciação)
CEUA – Comissão de uso de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz
DAMP – *Danger associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados ao dano)
DNA - *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ERK – *Extracellular signal-regulated kinases* (Quinases reguladas por sinal extracelular)
FcR – *Fc Receptor* (Receptor Fc)
FDA – *Food and Drug Administration* (Administração de alimentos e medicamentos)
GATA – *Gata Transcription Factor* (Fator de transcrição GATA)
GMCSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
GMPc – *Cyclic guanosine monophosphate* (Monofosfato cíclico de guanosina)
GOLD – *Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica)
GPx – *Glutathione peroxidase* (Glutathiona peroxidase)
GR – *Glucocorticoid receptor* (Receptor de glicocorticoide)
IC₅₀ – *Half maximal inhibitory concentration* (Metade da concentração inibitória máxima)
ICAM-1 – *Intercellular adhesion molecule 1* (Molécula de adesão intercelular 1)
IL – *Interleucine* (Interleucina)
Im – *Interstitial Macrophages* (Macrófagos intersticiais)
KDa – Kilodalton
LTB₄ – Leucotrieno B4
LPS - Lipopolissacarídeo
MCP-1 – *Monocyte chemoattractant protein-1* (Proteína quimiotática de monócitos -1)
MDA – *Malondialdehyde* (Malondialdeído)
MIP-1 α – *Macrophage inflammatory protein 1 α* (Proteína inflamatória de macrófagos 1 α)
MPO - Mieloperoxidase
NE – *Neutrophil elastase* (Elastase neutrofílica)
NFKB – *Nuclear Transcription fator kappa B* (Fator de transcrição nuclear kappa B)
NRF2 – *Nuclear Factor erythroid-derived 2 like 2* (Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2)
P38MAPK - *P38 mitogen-activated protein kinases* (Proteína quinase ativada por mitógeno P38)
PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)

PDE – *Phosphodiesterase* (Fosfodiesterase)
PENH – *Enhanced Pause*
PKA – *Protein kinase A* (Proteína quinase A)
ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)
RPM – Rotações por minuto
SUS – Sistema Único de Saúde
SOD – Superóxido Dismutase
TLR 3 – *Toll Like Receptor 3* (Receptor do tipo toll 3)
TBARS – *Thiobarbituric acid reactive substances* (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
TCA – *Trichloroacetic acid* (Ácido tricloroacético)
TBA – *Thiobarbituric Acid* (Ácido tiobarbitúrico)
TIMPs – *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (Inibidores teciduais de metaloproteinases)
TNF- α – *Tumoral necrosis factor α* (Fator de necrose tumoral α)
WT – *Wild type* (Selvagem)

SUMÁRIO

Resumo	ix
Abstract	x
Lista de figuras	xi
Lista de abreviaturas e siglas	xv
1. Introdução	1
1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	1
1.1.1 Epidemiologia da DPOC.....	2
1.1.2 Fatores de risco.....	2
1.1.2.1 Tabagismo.....	2
1.1.2.2 Fatores de risco secundários.....	3
1.1.3 Fisiopatologia da DPOC	4
1.1.3.1 Células e mediadores inflamatórios envolvidos na DPOC	5
1.1.3.1.1 Células epiteliais.....	5
1.1.3.1.2 Macrófagos.....	7
1.1.3.2.3 Neutrófilos	9
1.1.3.1.4 Linfócitos T	11
1.1.3.2 Citocinas e quimiocinas.....	12
1.1.3.3 Estresse oxidativo	13
1.1.3.4 Desequilíbrio protease – antiprotease	14
1.1.4 Opções terapêuticas para o tratamento da DPOC	16
1.1.4.1 Broncodilatadores.....	16
1.1.4.1.1 Agonistas dos receptores β 2-adrenérgicos.....	17
1.1.4.1.1.1 β 2 agonistas de curta duração.....	17
1.1.4.1.1.2 β 2 agonistas de longa duração (LABAs).....	18
1.1.4.1.2 Antagonista dos receptores muscarínicos.....	18
1.1.4.2 Anti-Inflamatórios.....	19
1.1.4.2.1 Inibidores de PDE-4.....	19
1.1.4.2.2 Glicocorticóides	21
1.2 Anestésicos locais.....	22
1.3 Análogos estruturais não anestésicos da lidocaína	25
1.4 Mexiletina.....	26

1.5 Serie II de análogos estruturais com atividade anti-inflamatória otimizada	27
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. Material e Métodos	31
3.1 Animais	31
3.2 Preparação de anéis isolados de traqueia.....	31
3.3 Avaliação não invasiva da obstrução das vias aéreas (estudo <i>in vivo</i>).....	32
3.3.1 Em camundongos hígidos	32
3.3.2 Em camundongos instilados com LPS.....	32
3.4 Modelo murino de inflamação pulmonar sensível e refratário ao tratamento com glicocorticoides	33
3.5 Modelo de inflamação pulmonar induzida pela exposição à fumaça de cigarro.....	34
3.6 Contagem de células do lavado broncoalveolar (BAL)	35
3.7 Obtenção do tecido Pulmonar	35
3.8 Avaliação da presença de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar.....	35
3.9 Análise de estresse Oxidativo	36
3.10 Dosagem de proteínas	36
3.11 Análise estatística	36
4. Resultados	37
4.1 Efeito comparativo da inibição da contração colinérgica de anéis de traqueia por mexiletina e análogo JME-209	37
4.2 Efeito comparativo da inibição da broncoconstricção colinérgica <i>in vivo</i> por JME-209 e salmeterol	38
4.3 Efeito do tratamento com JME-209 na broncoconstricção e hiper-reatividade de vias aéreas induzidas por LPS <i>in vivo</i>	41
4.4 Efeito do tratamento oral com JME-209 sobre o influxo de células inflamatórias nas vias aéreas induzido por LPS.....	44
4.5 Efeito comparativo dos tratamentos oral e nebulizado com JME-209 sobre a inflamação, broncoconstricção e hiper-reatividade das vias aéreas induzidas por LPS. .	45
4.6 Efeito do tratamento com JME-209 sobre a resposta inflamatória pulmonar insensível a glicocorticoides.....	49

4.7	Efeito de JME-209 sobre o influxo leucocitário no BAL de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro	54
4.8	Efeito do tratamento com JME-209 sobre os níveis aumentados de citocinas no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro	56
4.9	Efeito do tratamento com JME-209 sobre os níveis aumentados de malondialdeído no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro	58
5	Discussão	60
6	Conclusão	71
7	Referências	72

1 INTRODUÇÃO

Esta dissertação de mestrado fundamenta-se em estudos recentes do Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz, dentro de uma de suas principais linhas de pesquisa que é a avaliação do potencial terapêutico de novos candidatos a fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares. A inflamação é uma característica central na patogenia de doenças pulmonares graves como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Agentes farmacológicos capazes de inibir a resposta inflamatória ou acelerar a sua resolução têm potencial para controlar essas doenças. A inalação de agentes anti-inflamatórios esteroides, em associação a broncodilatadores, é atualmente o tratamento mais eficaz no controle da asma. Entretanto, os efeitos adversos (particularmente quando o tratamento é sistêmico) e a resistência aos glicocorticoides limitam o alcance dos benefícios, especialmente na DPOC, cuja inflamação é reconhecidamente refratária ao glicocorticoide. Há, portanto, um grande interesse no desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias inovadoras que sejam eficazes e seguras no tratamento de doenças inflamatórias pulmonares. O composto JME-209, juntamente com outros análogos do anestésico local de uso oral mexiletina, foi recentemente patenteado na Europa (Patente EP 3031794, 2019) para uso no tratamento da asma. O composto foi planejado e sintetizado em colaboração com o grupo de síntese química de Farmanguinhos, sendo aqui estudado em modelos experimentais preditivos de atividade anti-espasmódica e anti-inflamatória, como parte não exaustiva de um processo de avaliação do seu potencial terapêutico e aplicabilidade clínica na DPOC.

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

De acordo com a definição estabelecida pela Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (GOLD), “a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença prevenível e tratável, caracterizada por sintomas respiratórios persistentes e limitação do fluxo aéreo o qual não é totalmente reversível, geralmente causado por uma exposição à partículas e gases nocivos” (1). A DPOC está entre as principais causas de morbidade e mortalidade global, sendo considerado um grave problema de saúde pública, visto que, quando não controlada, compromete a qualidade de vida dos

portadores da doença (2). A DPOC é caracterizada por hiperprodução de muco, remodelamento das vias aéreas inferiores e perda da elasticidade, resultante da destruição do parênquima pulmonar. Em conjunto, tais alterações resultam nos principais sintomas da doença como dispneia, sibilos, tosse exacerbada e dificuldade ao respirar (3).

1.1.1 Epidemiologia da DPOC

Segundo estudos do Ministério da Saúde, os gastos com o tratamento da DPOC no Brasil chegam a aproximadamente 72 milhões de reais por ano, o que classifica a doença como um grave problema socioeconômico (4). Além disso, levantamentos da organização mundial de saúde (OMS), demonstram que existem aproximadamente 384 milhões de indivíduos portadores de DPOC no mundo inteiro, levando a cerca de 3 milhões de mortes anualmente (2). Previsões demonstram que a DPOC será a terceira principal causa de morte no mundo em 2020, devido ao aumento do tabagismo nos países em desenvolvimento e ao envelhecimento da população (5). No Brasil, estima-se que existam em torno de 10 milhões de portadores de DPOC, e que a doença leve à óbito, cerca de 40 mil indivíduos anualmente (6, 7). Estudos realizados pelo ministério da saúde no ano de 2012 demonstraram que a doença foi a quinta maior causa de internações no sistema único de saúde (SUS) em pacientes com mais de 40 anos, contabilizando cerca de 200 mil hospitalizações (8). O principal fator de risco para o desenvolvimento da doença é o tabagismo (80% dos casos), no entanto, apenas 25% dos fumantes desenvolvem a DPOC, sugerindo a existência de fatores genéticos que possam pré-dispor para seu desenvolvimento, os quais ainda, não foram totalmente identificados (1).

1.1.2 Fatores de risco

1.1.2.1 Tabagismo

A OMS estima a existência de cerca de 1 bilhão de tabagistas em todo o mundo (5). Além disso, dados revelam que a exposição ao cigarro leva à óbito aproximadamente 7 milhões de indivíduos anualmente. (9). De grande importância, o Brasil é um dos poucos países do mundo a documentar significativas diminuições nas

taxas de prevalência do uso de cigarros, resultado de fortes políticas de controle do tabaco (8). O cigarro contém aproximadamente 4 mil componentes químicos, sendo mais de 50 desses, já comprovados como cancerígenos (Figura 1.1). Atualmente, é descrito que, em cada inalação, o tabagista absorve cerca de 2 a 3 mil desses elementos (10). Entre os principais constituintes do cigarro estão substâncias tóxicas como o arsênio, benzeno, xileno e nicotina, um alcaloide altamente lesivo ao sistema nervoso e cardiovascular, responsável pela dependência química ao cigarro (11). Há uma estreita relação dose/resposta entre a intensidade do consumo de cigarros e a frequência dos sintomas da DPOC (12). A exposição passiva à fumaça de cigarro também pode contribuir para sintomas respiratórios e para o desenvolvimento da doença, porém, ainda há controvérsias na literatura sobre os seus efeitos no desenvolvimento da DPOC (13).



Figura 1.1: Composição química do cigarro. Entre os aproximadamente 4 mil componentes químicos constituintes do cigarro, 50 destes já são comprovadamente cancerígenos.

Fonte: <http://saudemaisbemestar.com.br/componentes-quimicos-cigarro-efeitos/>.

1.1.2.2 Fatores de risco secundários

Apesar do tabagismo ser a principal causa da DPOC, a exposição a outros agentes tóxicos representa um importante fator de risco para o desenvolvimento da

doença. Diversos estudos têm relatado a interação de poluentes, oriundos principalmente da queima de sílica, lenha, carvão, borracha, solda e cádmio, com o desenvolvimento da doença (14-17). Além disso, distúrbios genéticos também vêm sendo descritos como fatores de risco da doença. O mais conhecido está associado com a deficiência da protease sérica $\alpha 1$ antitripsina, enzima produzida por células hepáticas, que atua no controle da ação da elastase neutrofílica (NE) liberada por neutrófilos (18). Baixas concentrações desta enzima, particularmente, em conjunto com o tabagismo ou exposição a gases nocivos, levam ao aumento do risco para o desenvolvimento do enfisema (19, 20).

1.1.2 Fisiopatologia da DPOC

A limitação do fluxo aéreo na DPOC é causada principalmente, por inflamação crônica do pulmão, a qual aumenta à medida que a doença progride (21). Nos brônquios de grande calibre, a inflamação resulta em hiperplasia de células caliciformes com conseqüente hipersecreção de muco (22). Enquanto que, nos bronquíolos inferiores, leva à diminuição do lúmen das vias aéreas assim como também, à destruição da parede alveolar, resultando em enfisema pulmonar (3). Além de acometer os pulmões, a DPOC é acompanhada de manifestações sistêmicas que possuem grande impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes portadores da doença (Figura 1.2) (23). Dados como os de Titz e colaboradores demonstram que fumantes portadores de DPOC apresentam expressiva inflamação sistêmica, resultante do aumento do número de leucócitos circulantes e dos níveis de mediadores pró-inflamatórios (24). Ademais, a inflamação sistêmica refletida pelo aumento dos níveis circulantes de citocinas como Interleucina IL-1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e IL-6 estão relacionados com a perda de massa muscular que leva à caquexia e perda de peso (25), deterioração do tecido ósseo, culminando na osteoporose (26) e o desenvolvimento de doenças metabólicas (27) e cardiovasculares (28).

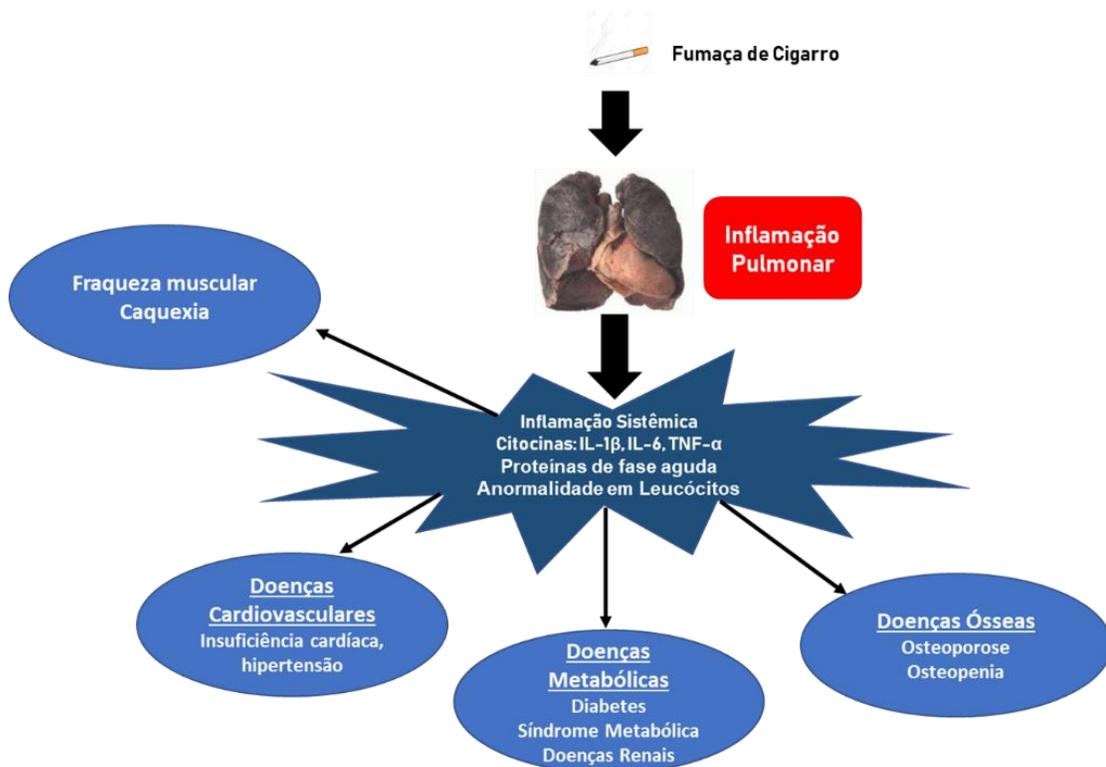


Figura 1.2: Inflamação sistêmica e o desenvolvimento de comorbidades em portadores de DPOC. O processo inflamatório participante da DPOC leva a inflamação sistêmica, com aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios circulantes que, conseqüentemente, levam ao desenvolvimento de diversas comorbidades. Adaptado de Barnes, 2014.

1.1.3.1 Células e Mediadores Inflamatórios Envolvidos na DPOC

A inflamação na DPOC consiste predominantemente em células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos e linfócitos T na parede e na luz das vias aéreas inferiores, no entanto, o processo envolve também a ativação de células estruturais, incluindo células epiteliais alveolares e das vias respiratórias (3).

1.1.3.1.1 Células Epiteliais

As células epiteliais que revestem o trato respiratório representam a primeira linha de defesa na resposta imune. Esta camada de células conectadas por junções de adesão e de oclusão, revestem a superfície das vias respiratórias e tem papel importante na proteção das vias aéreas superiores e inferiores (29). Dois tipos de tecido

epitelial revestem as vias respiratórias, os quais são morfológica e funcionalmente distintos, e estão, respectivamente, localizados na zona condutora, que forma o caminho da condução dos gases das fossas nasais aos bronquíolos e na zona respiratória, que vai dos ductos alveolares até os alvéolos, onde ocorrem as trocas gasosas (30).

Nas vias aéreas condutivas, o epitélio atua umedecendo e esquentando o ar inalado, antes que este chegue aos alvéolos. Ademais, o epitélio que reveste as vias aéreas condutivas possui papel ativo na proteção do pulmão contra micro-organismos inalados, através da ação de células ciliares e do muco produzido por células caliciformes(29, 31).

O epitélio da zona respiratória, por sua vez, é cúbico e simples, sendo também revestido pelas células da clara, responsáveis pela produção de surfactante e pela absorção de glicoproteínas. A presença de surfactante nesta região é de extrema importância, visto que este reduz a tensão superficial dos alvéolos, evitando que os mesmos entrem em colapso (30). Os dutos alveolares e alvéolos são formados por células pavimentosas conhecidas como pneumócitos do tipo I, cuja espessura facilita a difusão do oxigênio para o sangue e pelos pneumócitos do tipo II, células cúbicas de núcleo esférico e citoplasma vacuolizado que armazenam o surfactante produzido (32).

Estudos indicam que a exposição à fumaça de cigarro ou a agentes irritantes, como gases e poluentes, podem levar a diversas alterações no tecido epitelial que reveste as vias respiratórias, culminando em dificuldades na troca gasosa e a quebra da barreira física contra micro-organismos patogênicos e toxinas (33) A destruição do tecido epitelial leva a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMP), os quais servem como sinais de perigo e levam a ativação do sistema imune inato (34). Nas vias aéreas superiores, a inalação de fumaça de cigarro leva à hiperplasia de células caliciformes e hipertrofia da glândula da submucosa, associada a perda do número e função de células ciliares, levando a redução da depuração mucociliar e hiperprodução de muco (35). Nas vias aéreas inferiores, a inalação da fumaça de cigarro leva ao influxo de células inflamatórias, fibrose e ao espessamento da parede brônquica, contribuindo para o aumento da resistência das vias aéreas (29). A inalação de fumaça de cigarro pode levar também à destruição da barreira epitelial, facilitando a ocorrência de infecções respiratórias, ou ainda, estimular a liberação de diversos

mediadores pró-inflamatórios como IL-8, TNF- α , Fator de Transformação do Crescimento β (TGF- β) e quimiocinas como o ligante de quimiocina 20 (CCL20) agravando o quadro inflamatório (3, 13).

1.1.3.1.2 Macrófagos

Os macrófagos são essenciais para o funcionamento e homeostasia do sistema respiratório. A população de macrófagos pulmonares é dividida em macrófagos alveolares (AMs) e macrófagos intersticiais (IMs) (36, 37). Os AMs constituem aproximadamente 90 % da população de macrófagos pulmonares e são originados da medula óssea. Os AMs estão em constante contato com substâncias inaladas, devido suas posições expostas no lúmen alveolar. Estes tipos celulares são considerados os maiores efetores na defesa imune inata contra irritantes e micro-organismos inaláveis devido sua atividade fagocítica (38). Os AMs coordenam as defesas antimicrobianas através da expressão de receptores para imunoglobulina (FcR), complemento, β -Glicanos, manose e diversos tipos de receptores do tipo *scavenger* os quais juntos, facilitam a fagocitose. Estes tipos celulares estão associados a produção de substâncias reativas de nitrogênio e oxigênio, os quais estão envolvidos na defesa antimicrobiana (39).

Diversos autores sugerem que a participação de AMs na patogênese da DPOC está associada com a sua capacidade de secretar metaloproteinases de matriz (MMPs) (40, 41). Esse grupo de enzimas são capazes de degradar proteínas da matriz extracelular de forma semelhante às enzimas secretadas pelos neutrófilos. De fato, AMs recolhidos do BAL de pacientes com DPOC apresentam aumento da expressão gênica de MMP-1, MMP-9 e MMP-12 (42). Além disso, camundongos com deficiência genética para MMP-12 apresentaram, comparado com animais selvagens, menor grau de lesão pulmonar decorrente da exposição à fumaça de cigarro, indicando a importância dessa enzimas na destruição do parênquima pulmonar, característico da doença (43). As MMPs também atuam no recrutamento de células inflamatórias da circulação, facilitando a infiltração nos tecidos lesados (44). Estudos indicam que os AMs de pacientes com DPOC possuem baixa capacidade fagocítica para bactérias, e isto pode ser um fator chave na colonização crônica das vias aéreas inferiores por

bactérias como *Haemophilus Influenzae* e *Streptococcus Pneumoniae* (13). É descrito ainda, que AMs presentes nas vias aéreas de portadores de DPOC possuem também deficiência no controle da apoptose de leucócitos e isso, pode contribuir para a dificuldade no controle da inflamação presente na DPOC (45).

Ademais, AMs são fontes de diversos mediadores inflamatórios, como TNF- α , Leucotrieno B4 (LTB4), espécies reativas de oxigênio (ROS) e diversas quimiocinas, incluindo o ligante de quimiocinas da subfamília CXC 8 (CXCL8) e CCL2. A produção de CCL2 pode ser particularmente crítica, devido à mesma auxiliar o recrutamento adicional de monócitos com subtipo pró-inflamatório para os pulmões (46). Os AMs também têm a capacidade de promover a infiltração de células T através da liberação de quimiocinas específicas T helper 1 (T_h1), como CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (13). Os níveis aumentados destas quimiocinas têm sido relatados no escarro de pacientes com DPOC e diretamente correlacionadas com o aumento observado na infiltração de macrófagos, como também, com a diminuição da função pulmonar (36, 37).

Os IMs, assim como os AMs, são células fagocíticas, e podem ser considerados a segunda linha de defesa contra microorganismos invasores no pulmão (38, 47). A grande maioria dos estudos acerca deste tipo celular são focados na capacidade imuno-regulatória destes leucócitos. Este potencial está relacionado, principalmente, com a capacidade de liberação da citocina IL-10, mediador com importante e conhecida atividade anti-inflamatória (48, 49). Estudos como os de Kawano e colaboradores demonstraram que o tratamento com IMs obtidos de camundongos selvagens (WT) foi capaz de inibir a inflamação em um modelo de asma neutrofílica em camundongos “knockout” para a citocina IL-10. Neste estudo, os autores observaram que o tratamento com IMs inibiu a inflamação neutrofílica, a hiperprodução de muco, assim como a redução dos níveis das citocinas IL-17 e IL-13, sugerindo a importância destes macrófagos na homeostase pulmonar (50). Ademais, alguns autores demonstram que os IMs também possuem importante atividade sobre o remodelamento tecidual, visto que são também, importantes fontes de MMPs (51). Um esquema representativo da função e participação dos macrófagos na patogenia da DPOC está representado na figura 1.3.

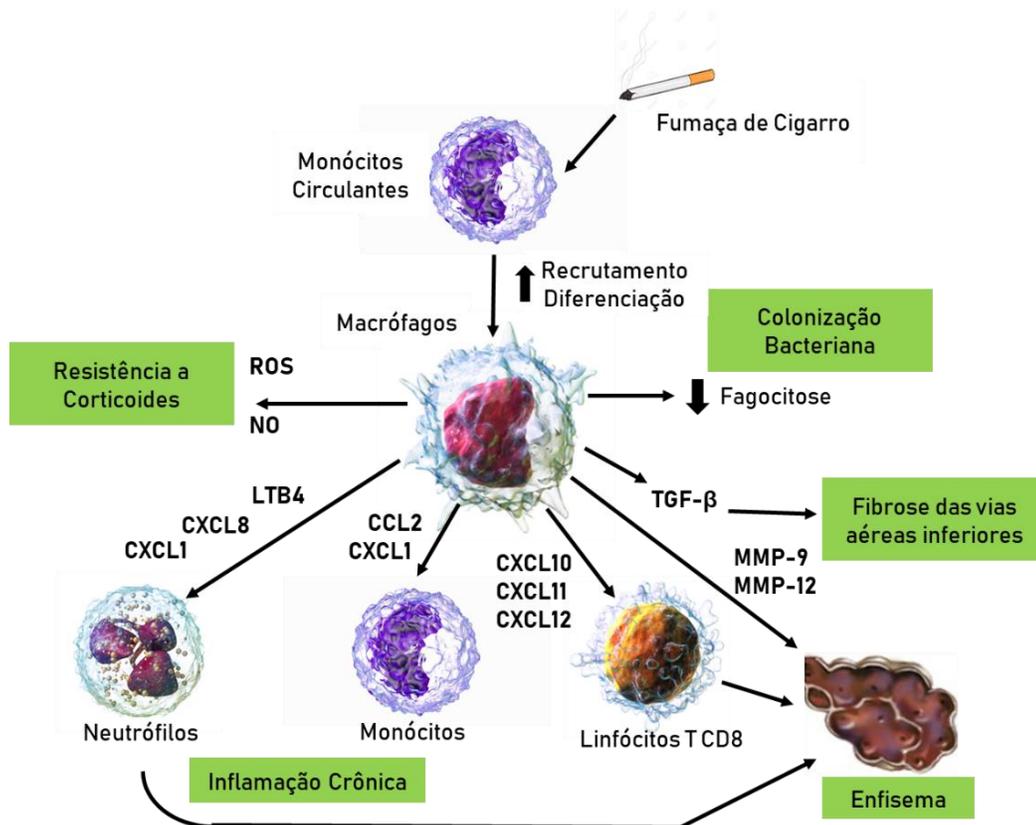


Figura 1.3: Esquema representativo da função e participação dos macrófagos, células centrais na patogênese da DPOC. A fumaça de cigarro leva ao aumento da diferenciação de monócitos em macrófagos, além de levar ao recrutamento de monócitos adicionais. Os macrófagos, por sua vez, têm grande participação na fisiopatologia da DPOC pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como CXCL 8, CXCL1 e LTB4 que levam ao recrutamento de neutrófilos e CCL 2, que leva ao aumento do recrutamento de monócitos circulantes. Ademais, a liberação de CXCL 10, CXCL 11, CXCL 12 está relacionada com o aumento do número de linfócitos T CD8 no parênquima pulmonar, contribuindo para o enfisema. A produção de TGF- β e MMP-9 e MMP-12 estão respectivamente relacionadas com o desenvolvimento de fibrose peribrônquica e com a destruição dos septos alveolares, o que acarreta no enfisema pulmonar. Ademais, a liberação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados estão relacionados com o desenvolvimento de refratariedade ao tratamento com anti-inflamatórios esteroidais. Adaptado de Barnes, 2014.

1.1.3.2.3 Neutrófilos

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra a invasão de agentes estranhos e são rapidamente recrutados para os sítios de infecção. As principais funções destes leucócitos estão na fagocitose de micro-organismos invasores, os quais são destruídos pela produção e ação de ROS, proteases como a NE, catepsinas e muitas outras proteínas antibacterianas (52). O aumento do número de neutrófilos é a

primeira e mais consistente anormalidade encontrada no BAL e escarro induzido de pacientes portadores de DPOC (6, 53). Os neutrófilos são umas das células inflamatórias mais abundantes na parede brônquica e no lúmen dos pacientes com DPOC, no entanto, infecções recorrentes e a colonização bacteriana persistente das vias aéreas também podem influenciar no aumento do número dessas células nas vias aéreas e no parênquima pulmonar (54).

O recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas é controlado por diversos mediadores, sendo os principais: IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-17 e LTB₄ (55). Em modelos animais para doenças pulmonares, incluindo a DPOC, o bloqueio de receptores como CXCR1 e CXCR2 por inibidores específicos reduziu significativamente o influxo neutrofílico nas vias aéreas (55, 56). Ademais, CXCR1 e CXCR2 são altamente expressos em biópsias brônquicas de pacientes com DPOC severa, os quais são mais propícios a exacerbações, demonstrando que, de fato, a ação de citocinas e quimiocinas recrutadoras de neutrófilos tem grande importância na fisiopatologia da doença (57). A ativação de neutrófilos residentes do tecido pulmonar, devido à exposição à fumaça de cigarro, leva a liberação de proteínas citoplasmáticas, onde incluem-se, principalmente, a NE e a mieloperoxidase (MPO) (52). A NE possui um importante papel na defesa contra bactérias e fungos, no entanto, a liberação desta protease pode levar a danos consideráveis quando em contato com a matriz extracelular, devido a sua capacidade de degradar quase todos os seus componentes, como colágeno, fibronectina, proteoglicanos, heparina e fibrina (58). Diversos estudos demonstram o impacto da liberação dessas proteases sobre a destruição do parênquima pulmonar, onde fragmentos de elastina e de matriz extracelular agem como estímulos para um ciclo pró-inflamatório vicioso (59). Ademais, a liberação de NE pode também, induzir dano epitelial, hiperplasia de células caliciformes, aumento da secreção de muco e redução da frequência da movimentação ciliar. Tais alterações, em conjunto, contribuem para a invasão de bactérias, o que leva a colonização das vias aéreas tipicamente observada em pacientes com DPOC moderada a severa (60).

1.1.3.1.4 Linfócitos T

Os linfócitos T representam a maior população de linfócitos pulmonares recuperados do trato respiratório de indivíduos saudáveis e portadores de DPOC. Este tipo celular está localizado nas vias aéreas, epitélio alveolar e no interstício. Em indivíduos saudáveis, linfócitos T CD4 relacionados ao subtipo “*helper*” e linfócitos T CD8 citotóxicos estão presentes na mesma proporção no sangue periférico (61). Após a ativação antigênica, linfócitos TCD4+ adquirem a capacidade de produzir e liberar um grande repertório de citocinas pró-inflamatórias (62). Enquanto que os linfócitos TCD8+ estão presentes na mucosa respiratória e podem ser ativados quando em contato com antígenos de organismos invasores ou durante condições as quais mimetizam a invasão ao hospedeiro. Em particular, este tipo celular tem papel central na defesa contra vírus e são também essenciais para a defesa contra tumores (63).

A fumaça de cigarro leva a uma resposta imune inata que, em portadores de DPOC, persiste e ativa a imunidade adaptativa, envolvendo os linfócitos T. Alguns estudos demonstram que o número de linfócitos T CD8 se apresenta aumentado nas vias aéreas e no parênquima pulmonar de portadores de DPOC, os quais atuam levando a citólise e apoptose de células epiteliais alveolares pela liberação de perforinas, granzimas e granzulina, resultando no enfisema pulmonar (64, 65). De fato, estudos utilizando modelos animais de enfisema induzido pela exposição à fumaça de cigarro indicam que o aumento do número de linfócitos T CD8 está diretamente correlacionado com a progressão da doença (40). Além disso, na DPOC, há uma polarização de linfócitos para um perfil de resposta do tipo T_h1 resultando na produção e liberação de citocinas, especialmente Interferon Gama (IFN- γ), levando a ativação de macrófagos, que produzem uma série de citocinas como IL-12, que por sua vez, mantém o perfil de linfócitos para o tipo T_h1 (35). Sugere-se ainda que estes linfócitos tenham grande importância na manutenção da memória imunológica que levaria a perpetuação do processo inflamatório mesmo após a suspensão do tabagismo (6, 13).

A resposta celular associada com a DPOC tem sido mais frequentemente relacionada a linfócitos T_h1. No entanto, novos avanços na compreensão da biologia deste tipo celular revelaram a existência de uma subpopulação distinta com potente atividade pró-inflamatória. Estas células são designadas linfócitos T_h17 devido sua

capacidade em produzir IL-17 (66). No tecido pulmonar, a IL-17 é um indutor da produção de IL-6 por células epiteliais brônquicas, e ambas são fortes indutores da produção de mucinas por células epiteliais pulmonares. Além disso, IL-17 induz a liberação de IL-8 por células epiteliais, importante quimiocina no recrutamento de neutrófilos (13, 67). Um esquema representativo da função e participação das células inflamatórias na patogenia da DPOC está representado na figura 1.4.

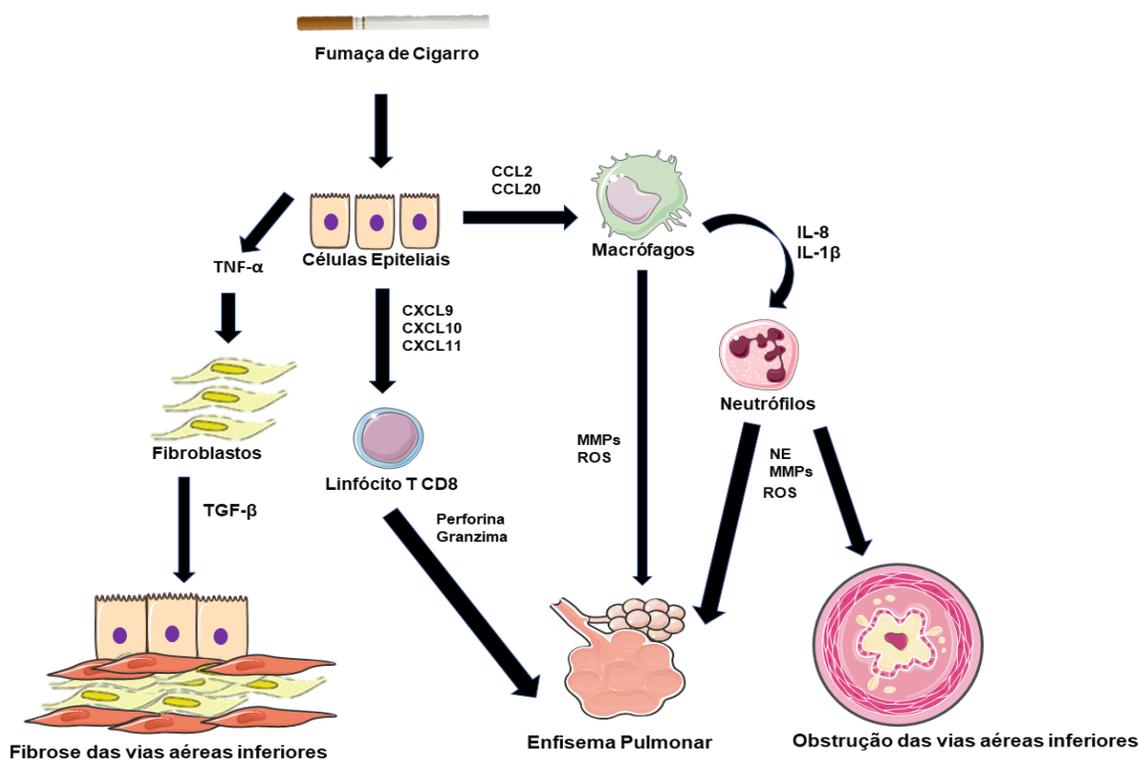


Figura 1.4: Esquema representativo da participação de células inflamatórias e mediadores pró inflamatórios na fisiopatologia da DPOC. (Adaptado de Barnes, 2014).

1.1.3.2 Citocinas e Quimiocinas

Citocinas são proteínas sinalizadoras extracelulares que normalmente possuem menos de que 80 kDa, enquanto que, quimiocinas, são citocinas de 8-10 kDa com propriedades quimiotáticas. Estes mediadores são sintetizados e secretados por diferentes tipos celulares e estão envolvidos com diversas etapas do processo inflamatório, através da interação com receptores específicos na superfície da célula alvo. Grande parte destes mediadores já são conhecidos e estudados, estando mais

claramente implicados na fisiopatologia da DPOC, enquanto que outros desempenham um papel não esclarecido no contexto da doença (13, 55, 68).

O TNF- α é uma citocina que exerce uma variedade de efeitos, como o favorecimento do crescimento celular, citotoxicidade e inflamação. Esse mediador exerce um papel de grande importância na fisiopatologia da DPOC, onde é produzido e secretado por AMs, linfócitos e neutrófilos após o contato com as substâncias tóxicas da fumaça de cigarro (3, 66, 69). A IL-1 β é uma das principais citocinas envolvidas na iniciação e persistência da inflamação. A produção de IL-1 β se apresenta aumentada no tecido pulmonar e no BAL de portadores de DPOC e observa-se o aumento dos níveis desse mediador durante exacerbações da doença (67). Estudos também indicam a importância da citocina IL-1 β sobre o desenvolvimento do enfisema, visto que esse mediador pode levar ao aumento da produção de MMP-9 e MMP-12, que por sua vez, degradam a matriz extracelular (70).

A inflamação na DPOC é acompanhada também pelo aumento dos níveis de molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP-1 α) e IL-8, tanto no epitélio como no endotélio (57). Estudos como os de Zou e colaboradores e Ekberg e colaboradores demonstraram que amostras do BAL e do escarro induzido de pacientes com DPOC leve à moderada apresentaram altos níveis de IL-8, LTB4 e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (57, 67, 71).

1.1.3.3 Estresse Oxidativo

Além do processo inflamatório pulmonar, as alterações patológicas que ocorrem na DPOC podem ser amplificadas pelo estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre ROS em relação a agentes antioxidantes. As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos e se originam do metabolismo do oxigênio molecular (O₂). Em condições fisiológicas, o oxigênio sofre redução com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. Durante esse processo, são formados intermediários reativos, como o radical superóxido (O₂⁻) e derivados como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidroxila (OH⁻) (72). Sob condições patológicas, concentrações elevadas desses intermediários reativos nas células levam a mudanças permanentes na transdução da sinalização e na expressão genética, levando a destruição da membrana e apoptose celular (Figura 1.4) (41). Visando a manutenção da homeostasia

do organismo, a ação das enzimas antioxidantes é de extrema importância. Os principais componentes do sistema antioxidante enzimático são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutatona peroxidase (GPx), que agem no início da cadeia de formação de espécies reativas, evitando o acúmulo de oxidantes como o O_2^- e H_2O_2 (73). A fumaça de cigarro contém altas concentrações de oxidantes e radicais livres. Estas substâncias podem estimular macrófagos alveolares e neutrófilos a produzirem ROS, resultando em desequilíbrio redox, e a liberarem diversas citocinas envolvidas na migração de células inflamatórias para o tecido pulmonar, como TNF- α , IL-1 β , IL-17 e IL-6 (74).

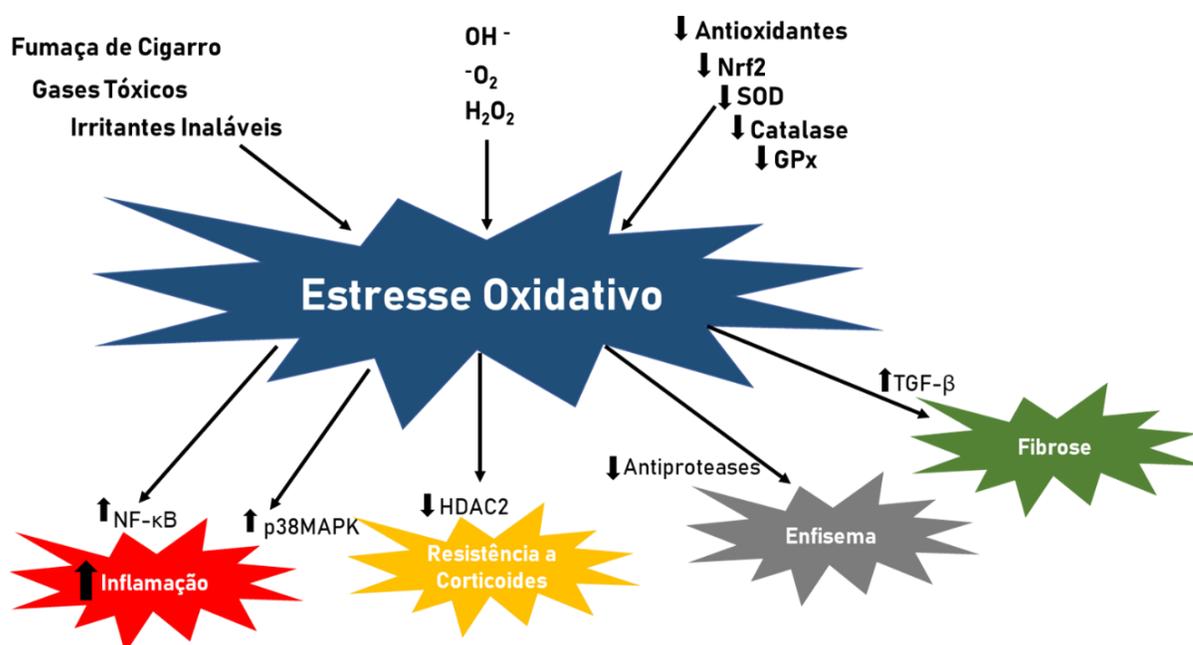


Figura 1.5: Impacto do estresse oxidativo na fisiopatologia da DPOC. Diversos estudos relatam o efeito do dano oxidativo sobre a patogenia da DPOC, entre eles, o aumento, perpetuação e progressão do quadro inflamatório, a instalação de um quadro insensível a glicocorticoides, dano tecidual ao parênquima pulmonar e fibrose. Adaptado de Barnes, 2014.

1.1.3.4 Desequilíbrio Protease – Antiprotease

A primeira hipótese formulada para o enfisema pulmonar presente na DPOC determinava que este era causado pelo desequilíbrio dos níveis de proteases e antiproteases presentes no parênquima pulmonar. A teoria foi desenvolvida através dos estudos de Laurell & Eriksson (1963), no qual descreveram que pacientes com

deficiência genética para a enzima α -1 antitripsina desenvolviam enfisema (75). Posteriormente, em 1965, Gross e colaboradores descreveram que era possível a instauração de um quadro enfisematoso no pulmão de ratos pela instilação da protease de origem vegetal papaína (76). Também foi demonstrado que camundongos com deficiência para os genes da NE, protease liberada por neutrófilos que destroem a matriz extracelular, apresentaram redução no desenvolvimento do enfisema (19).

Baseado nos estudos iniciais de Laurell & Eriksson, em conjunto com o avanço e desenvolvimento de novas tecnologias nas áreas de imunologia e biologia celular e molecular, novos estudos surgiram, e com estes, novos questionamentos acerca do desenvolvimento do quadro enfisematoso. A hipótese convencional e mais aceita hoje para o desenvolvimento do enfisema pulmonar, sugere que a fumaça de cigarro leva a um grande influxo de células inflamatórias para o pulmão, resultando na liberação de ROS e proteases que em conjunto, levam a degradação da matriz extracelular e apoptose de células estruturais (20) (Figura 1.5). Ademais, alguns estudos indicam que o desequilíbrio entre a apoptose e o reparo de células estruturais no pulmão podem favorecer à destruição do tecido pulmonar em resposta à fumaça de cigarro (35). De fato, a fumaça interfere com a proliferação celular, quimiotaxia, produção e remodelamento de componentes da matriz, os quais, em conjunto, podem explicar o aumento do número de células apoptóticas e o ciclo pró-inflamatório vicioso presente no pulmão de portadores de DPOC com enfisema severo (68).

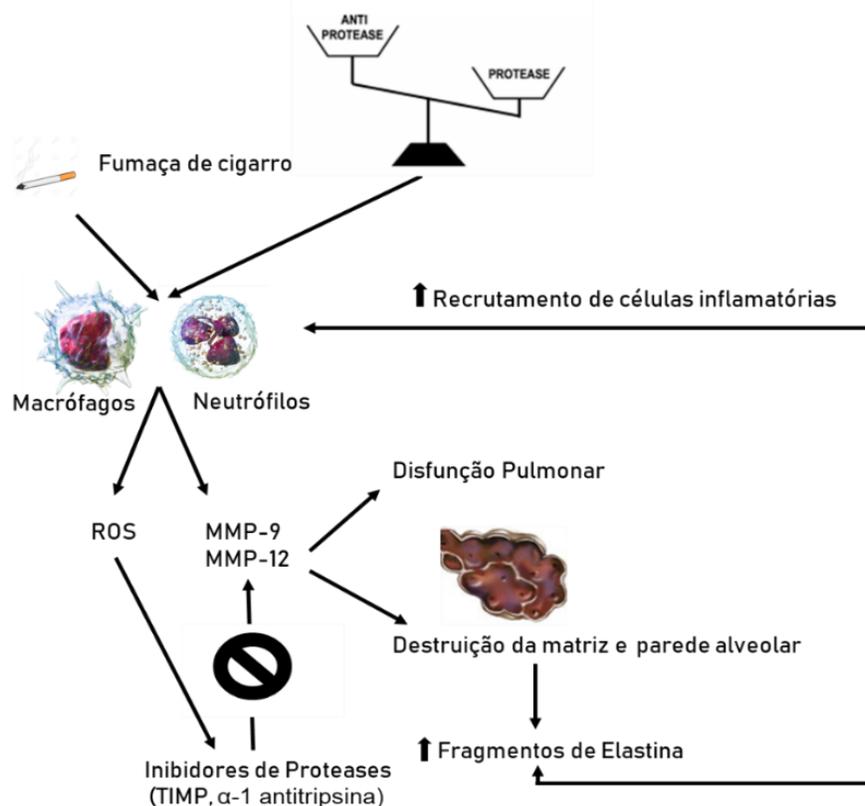


Figura 1.6: Desequilíbrio dos níveis de proteases e anti-proteases na fisiopatologia da DPOC. A fumaça de cigarro induz um desequilíbrio de proteases e anti-proteases, que favorecem a via proteolítica. A fumaça de cigarro leva ao aumento do influxo de células inflamatórias para os alvéolos, que por sua vez, liberam metaloproteinases de matriz (MMPs), elastase neutrofílica (NE) e espécies reativas de oxigênio (ROS). A degradação da matriz extracelular pelas MMPs leva a destruição do septo alveolar, aumento dos espaços intra-alveolares e leva a disfunções pulmonares como o aprisionamento de ar, hiperinsuflação e hipertensão pulmonar. Os fragmentos de elastina que resultam da destruição alveolar se tornam quimioatraentes para um influxo vicioso de células inflamatórias. Adaptado de Antunes & Rocco, 2011.

1.1.3 Opções Terapêuticas para o Tratamento da DPOC

As terapias farmacológicas atuais para o tratamento da DPOC são relativamente ineficazes uma vez que ainda não existem medicamentos disponíveis que reduzam consideravelmente a progressão ou a taxa de mortalidade ou ainda que tenham um efeito significativo sobre as exacerbações, principais responsáveis pelas admissões hospitalares (77). A principal terapia farmacológica no controle da DPOC consiste no uso de broncodilatadores inalatórios, visando o alívio dos sintomas da doença e o uso de agentes anti-inflamatórios, a fim de retardar a sua progressão.

1.1.4.1 Broncodilatadores

Os broncodilatadores são as principais opções farmacológicas, sendo críticos para a manutenção sintomática da DPOC. Estes medicamentos funcionam como tal, devido suas ações que levam ao relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas (78). Atualmente, esta classe de fármacos é dividida, principalmente, em dois principais grupos: os agonistas dos receptores β -2 adrenérgicos e os antagonistas dos receptores muscarínicos, os quais, estão disponíveis para uso individual ou em combinação com glicocorticoides (79).

1.1.4.1.1 Agonistas dos receptores β 2-Adrenérgicos

Os agonistas dos receptores β 2 adrenérgicos são potentes broncodilatadores e podem ser administrados pelas vias inalatória, oral ou intravenosa, sendo a primeira a preferível. Estes medicamentos atuam através da ativação dos receptores β 2 adrenérgicos acoplados à proteína G na superfície celular. A ativação desse receptor leva a ativação de adenilato ciclase, enzima responsável pela catalização e conversão de Adenosina Trifosfato (ATP) em Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc). O AMPc se liga a unidade regulatória da proteína quinase A (PKA), promovendo a liberação de sua unidade catalítica, causando a fosforilação de diversas proteínas alvo, levando ao relaxamento da musculatura lisa (78). A ativação de AMPc também leva a liberação de cálcio de depósitos intracelulares, reduzindo o influxo de cálcio através das membranas, auxiliando o relaxamento da musculatura lisa e a broncodilatação (80). Estudos indicam que a ativação dos receptores β 2 adrenérgicos também potencializam a atividade anti-inflamatória de glicocorticoides, aumentando a translocação do receptor de glicocorticoides do citoplasma para o núcleo da célula (81). Apesar de serem amplamente utilizados como opção farmacológica no tratamento da DPOC, o uso de broncodilatadores não é eficaz em reverter a obstrução das vias aéreas como o observado em pacientes asmáticos, visto que esta classe de medicamentos somente revertem a obstrução das vias aéreas parcialmente (82).

1.1.4.1.1.1 β 2 agonistas de curta duração

O grupo dos broncodilatadores de curta duração são também chamados de broncodilatadores de resgate, onde incluem-se os medicamentos salbutamol, fenoterol, terbutalina, albuterol e reproterol. Em média, o efeito broncodilatador desta classe de medicamentos, pela via inalatória, tem início em poucos minutos, durando entre 4-6 h. Estes são recomendados para o alívio imediato dos sintomas agudos e constituem a primeira opção broncodilatadora nas exacerbações da DPOC (80).

1.1.4.1.1.2 β 2 agonistas de longa duração (BALD)

O grupo dos BALD, é composto pelos fármacos formoterol e salmeterol. O efeito broncodilatador destes medicamentos é de aproximadamente 12 h, sendo o início de ação do formoterol mais rápido que o do salmeterol. Recentemente, novos broncodilatadores β 2 agonistas foram sintetizados, representados pelos medicamentos Indacaterol e Vilanterol, que apresentam duração ultra-prolongada, ou seja, com efeito broncodilatador de até 24 h. Estes medicamentos são utilizados profilaticamente no controle da DPOC (69, 83). Embora controlem os sintomas inerentes a broncoconstrição e reduzam as exacerbações, a monoterapia com BALD não é indicada, visto que esses fármacos não possuem efeitos significativos sobre a inflamação. Tendo isto em vista, é fortemente recomendada a utilização de formulações inalatórias que contenham uma associação de glicocorticoides com BALD (78, 80).

1.1.4.1.2 Antagonista dos receptores muscarínicos

Os antagonistas muscarínicos ou anticolinérgicos são compostos pelos medicamentos brometo de ipratrópio e brometo de tiotrópio e atuam inibindo a broncoconstrição mediada pela ligação de acetilcolina (ACh) aos receptores muscarínicos (79). O brometo de ipratrópio possui ação curta, com atividade relaxante em cerca de 3-6 h após inalação, enquanto que o brometo de tiotrópio possui ação de até 12 h (84). Estudos indicam que o brometo de tiotrópio tem como propriedade a afinidade prolongada pelos receptores M1 e M3 e de se dissociar rapidamente do receptor M2, responsável pela regulação da liberação de acetilcolina (85). Os efeitos

colaterais dos anticolinérgicos incluem boca seca e broncoconstrição em decorrência do bloqueio dos receptores M2 pré-sinápticos, levando ao aumento da liberação de acetilcolina pelos nervos colinérgicos, reduzindo a eficácia do antagonismo (78). Estudos como os de Wollin e Pieper demonstram que apesar de ser um broncodilatador, o brometo de tiotrópio, possui significativo potencial anti-inflamatório, avaliado em um modelo de exposição à fumaça de curta duração em camundongos (86). Tal estudo avaliou farmacologicamente a atividade do anticolinérgico em comparação com o glicocorticoide dexametasona e o inibidor de fosfodiesterase 4 (PDE-4) Roflumilast. Os autores observaram que o tratamento com tiotrópio inibiu de maneira significativa o influxo leucocitário para as vias aéreas em um efeito que está relacionado com a inibição de citocinas pró-inflamatórias. Ademais, nesta análise, a atividade anti-inflamatória do anticolinérgico mostrou-se mais eficaz que a dexametasona e o Roflumilast.

1.1.4.2 Anti-Inflamatórios

1.1.4.2.1 Inibidores de PDE-4

As PDEs são enzimas que degradam as ligações do tipo fosfodiéster de AMPc e guanosina monofosfato cíclico (GMPc) para seus monofosfatos inativos. A família das PDEs é composta de 11 membros (PDE 1-11). Suas classificações são baseadas na sequência de aminoácidos, especificidade ao substrato e distribuição tecidual. Todas as PDEs possuem três regiões funcionais: uma região catalítica conservada em ambos os lados por uma região regulatória N-terminal e uma região C-terminal variável. As PDEs 4, 7 e 8 degradam o AMPc especificamente, enquanto que PDE5, 6 e 9 inibem o GMPc. As PDEs 1,2,3,10 e 11 podem degradar ambos AMPc e GMPc (87). Estas enzimas participam em diversos processos biológicos como a inflamação, cognição, lipogênese, função de canais iônicos, apoptose e diferenciação celular (88). Com isso, a inibição de PDEs é uma maneira útil de causar uma variedade de efeitos celulares como a inibição da ativação de células inflamatórias, e de levar ao relaxamento da musculatura lisa.

As enzimas PDE4 são altamente expressas em diversas células inflamatórias como mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T, macrófagos e células estruturais (89). Entre os principais efeitos biológicos observados pela ação dos inibidores de

PDE4 estão a diminuição da apoptose, redução da liberação de mediadores pró-inflamatórios e da expressão de marcadores de superfície em diversos tipos celulares (90). A família das enzimas PDE4 é codificada por 3 genes distintos (PDE4A, PDE4B e PDE4D) que são altamente expressos em células inflamatórias enquanto que, a expressão de PDE4C é geralmente fraca (91).

Estudos investigam a atividade e o impacto das PDE-4 sobre doenças pulmonares como a DPOC e a asma (89, 92, 93). Dessa forma, inibidores seletivos da PDE4 foram sintetizados e avaliados em modelos experimentais de DPOC. Entre estes, os de primeira e segunda geração, Rolipram e Cilomilast, respectivamente, se destacaram. Estudos demonstraram a atividade anti-inflamatória destes compostos, onde observaram a inibição do influxo de eosinófilos e neutrófilos, e da produção de citocinas por Linfócitos T, células epiteliais das vias aéreas, basófilos, monócitos e macrófagos (88, 89, 91). Ademais, em modelo *in vitro*, a liberação de GM-CSF por células musculares lisas das vias aéreas estimuladas com TNF- α ou IL-1 β foi inibida pelo tratamento com Rolipram ou Cilomilast (87). No entanto, apesar dos resultados promissores obtidos com os inibidores de PDE4 de primeira e segunda geração em estudos pré-clínicos, os mesmos foram descontinuados em estudos clínicos devido a sua estreita janela terapêutica e pelos constantes efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal (92-94).

Visando a síntese de novos inibidores de PDE4 com maior janela terapêutica e que fossem mais seguros, foi desenvolvida uma terceira série de inibidores representada pelo medicamento Roflumilast, vendido comercialmente sob o nome Daxas®. Estudos demonstraram a atividade anti-inflamatória do Roflumilast em modelos animais de DPOC. Entre estes, observou-se que o tratamento com o inibidor de PDE4 levou a redução do número de neutrófilos no BAL de ratos e camundongos expostos a fumaça de cigarro em modelo de inflamação pulmonar de curta duração. Ainda no mesmo estudo, observou-se que o tratamento também levou a redução do influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar de ratos expostos à fumaça de cigarro durante 7 meses consecutivos (95). Estudos como os de Martorana e colaboradores demonstraram também que o tratamento com roflumilast foi capaz de reverter de maneira significativa o enfisema em camundongos que foram expostos à fumaça de cigarro durante 4 ou 7 meses consecutivos (96). Enquanto que o estudo de

Cortijo e colaboradores mostrou que o tratamento com roflumilast também foi eficaz em inibir o influxo de neutrófilos e macrófagos para o tecido pulmonar em camundongos estimulados com bleomicina (97).

A segurança e eficácia de Roflumilast foi demonstrada em dois estudos clínicos de fase 3, que incluiu mais de 1500 pacientes com idades acima de 40 anos. O medicamento foi aprovado para o tratamento da DPOC, no entanto, com a ressalva do FDA de que o tratamento crônico pode levar a danos ao trato gastrointestinal e a saúde mental, incluindo alterações no humor, pensamento, comportamento, assim como a perda de peso inexplicada (88, 94).

1.1.4.2.2 Glicocorticoides

Os glicocorticoides são considerados o tratamento de padrão ouro para diversas condições inflamatórias, sendo adotados como a primeira opção terapêutica para doenças das mais diferentes etiologias. Para exercerem seus efeitos, os glicocorticoides precisam ser ligados aos seus receptores citoplasmáticos (GR). Quase todas as células do corpo humano expressam GRs, no entanto, o número de receptores pode variar em diferentes tipos celulares (98). Estudos na área de bioquímica e biologia molecular demonstram que a estrutura dos GRs possuem aproximadamente 800 resíduos de aminoácidos e que, certas áreas da molécula apresentam homologia com outros receptores esteroidais, de hormônios da tireóide e de ácido retinóico (99). Estes receptores possuem dois sítios altamente conservados que formam domínios de ligação a zinco, e que interagem com regiões específicas no DNA, e uma extremidade carboxi-terminal interagindo com o ligante (100). Existem duas principais isoformas de GRs descritos, GR α e GR β os quais são gerados por processamento alternativo de RNA mensageiro (101). A isoforma GR β difere do GR α apenas no domínio C-Terminal, onde os últimos 50 aminoácidos de GR α são substituídos por uma sequência única de 15 aminoácidos (102). No entanto, apesar da simples alteração estrutural, essa realocação de aminoácidos leva a importantes consequências funcionais, visto que somente a isoforma GR α é capaz de se ligar a glicocorticoides e levar a transativação ligante-dependente (91). Estudos descrevem que a isoforma GR β atua inibindo GR α , impedindo sua ligação ao DNA (103, 104). A ativação dos receptores de glicocorticoide

promove a translocação do complexo esteroide-GR para o núcleo celular, onde se liga a sequências específicas do DNA denominados elementos responsivos ao glicocorticoide (GRE), ativando a transcrição de genes anti-inflamatórios ou reprimindo genes pró-inflamatórios (105).

Os glicocorticoides são altamente eficazes no tratamento da asma, em cerca de 90 % dos pacientes (100). No entanto, apesar de serem amplamente utilizados por portadores de DPOC, estes medicamentos são ineficazes nestes pacientes (106). Entre os mecanismos relacionados a resistência de glicocorticoides podem ser citados: (i) o estresse oxidativo presente em portadores de DPOC, que leva a inativação da enzima HDAC2, que por sua vez, leva ao aumento da acetilação das histonas com consequente redução da repressão de genes pró-inflamatórios pelos glicocorticoides; (ii) redução do número de GRs e diminuição da translocação dos receptores como resultado da fosforilação por Map Quinases (Mapk), proteína quinase p38 (p38) e proteína quinase JNK (JNK); (iii) antagonismo do receptor GR pela prolactina, que leva a redução da eficácia dos glicocorticoides (107-109). Além disso, diversos estudos demonstram que a refratariedade a glicocorticoides em pacientes asmáticos graves, assim como portadores de DPOC está associada, em sua grande maioria, pela superexpressão da isoforma de receptores GR β em células inflamatórias (110-112).

1.2 Anestésicos Locais

Os anestésicos locais possuem uma alta gama de aplicações clínicas bem estabelecidas na medicina. Essa classe de medicamentos é amplamente conhecida por suas capacidades sobre o bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, ocasionando um bloqueio reversível da transmissão nervosa e na função neuronal. Diversos estudos demonstram que os anestésicos locais possuem também efeitos que vão além da sua reconhecida ação anestésica, como por exemplo, atividade neuroprotetora (113), antibacteriana(114), antitumoral (115, 116) e anti-inflamatória (117-120).

Descoberta nos anos 50, a lidocaína, anestésico local do tipo amino-amida é ainda hoje amplamente utilizada em procedimentos cirúrgicos devido à rápida e segura ação anestésica (Figura 1.7). Ademais, a lidocaína possui também outras indicações, como a inibição de broncoespasmo induzido pela intubação traqueal, analgesia de dor

neuropática, adjuvante da dor pós-operatória e, em menor escala, como antiarrítmico (121, 122). Estudos indicam que o efeito da lidocaína não se restringe apenas ao bloqueio de canais de sódio em células excitáveis. Como exemplo, outros canais, como os de potássio ou cálcio, também são inibidos pelo anestésico (123). Devido a este mecanismo, a lidocaína possui importante ação sobre células não excitáveis, principalmente células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos (117, 124). É interessante ressaltar que alguns dos efeitos farmacológicos da lidocaína ocorrem em concentrações muito mais baixas do que as necessárias para o bloqueio do canal de sódio (125). A concentração de lidocaína capaz de induzir 50% do efeito máximo (IC_{50}) no canal neuronal de sódio é de aproximadamente 50-100 μM , enquanto concentrações muito menores do anestésico ($IC_{50} = 20nM$) inibem a sinalização através dos receptores muscarínicos M1 (126). Ademais, estudos demonstram que os efeitos anti-inflamatórios da lidocaína não são reproduzidos por outros bloqueadores dos canais de sódio, o que indica que mecanismos alternativos possam contribuir para as ações anti-inflamatórias do anestésico (127).

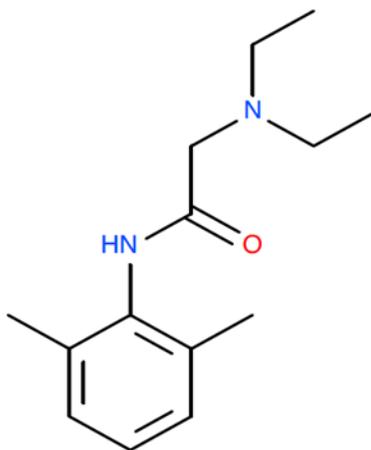


Figura 1.7: Estrutura química do anestésico local lidocaína.

Diversos estudos demonstram a capacidade da lidocaína em inibir a migração, ativação e fagocitose de neutrófilos *in vitro*, células cruciais na fisiopatologia da DPOC (128). Tendo isto em vista, ensaios pré-clínicos investigaram o papel do anestésico em modelos de doença com este perfil inflamatório. Dessa forma, estudos como o de Nishina e colaboradores avaliaram o efeito do tratamento intravenoso com lidocaína sobre a lesão pulmonar aguda em coelhos. Os autores observaram que o tratamento

resultou na diminuição do influxo neutrofílico no pulmão dos coelhos após estímulo inflamatório. Além disso, os autores observaram uma significativa inibição da resposta pró-oxidante, indicando a redução da geração de ROS com subsequente redução do dano endotelial e edema pulmonar (129).

Sabe-se que o aumento do influxo de células inflamatórias no tecido pulmonar está diretamente relacionado ao aumento da produção e secreção de mediadores pró-inflamatórios (130). Sinclair e colaboradores relataram que a pré-incubação *in vitro* com lidocaína inibe a liberação de LTB₄, potente fator quimiotático para neutrófilos por monócitos humanos estimulados com zimosan. No mesmo estudo, foi observado que a pré-incubação com lidocaína resultou na diminuição dos níveis de IL-1 β no sobrenadante de células mononucleares estimuladas com LPS (131). Ademais, estudos utilizando o modelo de lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica, em camundongos, demonstrou que a lidocaína administrada por via intravenosa é capaz de aumentar os níveis plasmáticos e pulmonares de IL-10, citocina com reconhecida atividade anti-inflamatória (132). Estudos como os de Tanaka e colaboradores indicaram que linfócitos T poderiam sofrer apoptose ou necrose celular pela administração de lidocaína de maneira dose-dependente. Tal ação está relacionada com a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e com a inibição da ativação de p38 MAPK, ERK1/2 e NF-K β (133). Ademais, estudos sugerem que os efeitos da lidocaína sobre as células T não estão relacionados à sua ação anestésica, pelo fato da ropivacaína, anestésico local mais potente que a lidocaína, não ser capaz de interferir sobre a atividade de células T *in vitro* (118).

Em conjunto, estes dados sugerem que a lidocaína poderia ser uma alternativa terapêutica em pacientes portadores de doenças inflamatórias pulmonares. De fato, diversos estudos clínicos apontam a capacidade do tratamento aerossolizado com lidocaína em minimizar os sintomas da asma moderada e grave, diminuindo também, a necessidade da utilização de glicocorticoides orais em pacientes dependentes deste tratamento (124). Um estudo publicado por Saito e colaboradores demonstrou que a lidocaína foi capaz de tratar de forma efetiva uma paciente asmática grávida que se mostrava refratária ao tratamento sistêmico com anti-inflamatórios esteroidais, antagonistas colinérgicos e agonistas β 2 adrenérgicos (134). No entanto, a utilização de lidocaína para o tratamento da asma deve ser visto com bastante cautela, visto que

estudos indicam que a anestesia das vias respiratórias pulmonares pode acarretar na irritação das vias aéreas e redução do fluxo de ar em pacientes asmáticos (135).

1.3 Análogos estruturais não anestésicos da Lidocaína

Devido aos efeitos adversos da administração de lidocaína nebulizada em asmáticos, e a forte correlação existente entre tais efeitos e a ação de bloqueio de canais de sódio, levantou-se a possibilidade de que a atividade anestésica da lidocaína não seria relevante para a sua atividade antiasmática. Dessa forma, em tese, se poderia desenvolver análogos não anestésicos da lidocaína com atividade anti-inflamatória preservada ou até melhorada. Nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o Departamento de Síntese Orgânica de Farmaguinhos, sintetizou e avaliou a atividade anti-inflamatória e espasmolítica de análogos estruturais da lidocaína, possibilitando a identificação de análogos com limitada atividade anestésica local e propriedades anti-inflamatórias otimizadas, que foram avaliados farmacologicamente em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*.

Dentre as moléculas selecionadas, destacaram-se o JMF2-1 e JM25-1 por apresentarem reduzida atividade sobre correntes de sódio em células excitáveis, preservando a atividade anti-inflamatória e relaxante da musculatura lisa das vias aéreas (136-138). Estudos subsequentes indicaram que a nebulização de JMF2-1 promoveu a redução de células inflamatórias no pulmão, a inibição da hiper-reatividade das vias aéreas e dos níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias em camundongos provocados com alérgeno, num mecanismo associado à inibição da proliferação e sobrevivência de linfócitos T (139). De maneira semelhante, foi observado que o tratamento com JM25-1 nebulizado também inibiu significativamente inflamação e remodelamento pulmonar, produção exacerbada de muco e hiper-reatividade na asma experimental em camundongos. Tais efeitos estão associados à indução de apoptose de eosinófilos e linfócitos Th2, além de diminuição da expressão de GATA-3 e p38 MAPK. Além disso, foi observado que esses análogos não anestésicos induzem significativo aumento nos níveis intracelulares de AMPc em células musculares lisas e inibem canais de cálcio dependentes de voltagem, resultando no bloqueio da contração de músculo liso respiratório induzida por agentes espasmogênicos (140). Esses

achados resultaram em patentes concedidas por diferentes países, incluindo Estados Unidos, Japão, Índia e China. Entretanto, apesar dos achados serem de potencial interesse farmacológico e clínico, o avanço dessas moléculas na cadeia de desenvolvimento de medicamentos esbarrou na falta de originalidade estrutural das moléculas estudadas, o que fortemente inibe as chances de investimento e sucesso industrial no campo de novos fármacos e medicamentos.

1.4 Mexiletina

A Mexiletina, 2-(2-aminopropoxi)-1,3-dimetilbenzeno, registrada comercialmente sob o nome Mexitil®, é um congênere da lidocaína, possuindo as mesmas propriedades eletrofisiológicas que o anestésico (Figura 1.8). No entanto, a mexiletina é ativa por via oral, sendo amplamente utilizada no controle de arritmias cardíacas e no alívio da dor de diferentes origens, incluindo a dor neuropática (141) e cefalalias de difícil tratamento (142). A mexiletina atua inibindo a propagação do potencial de ação na rede de Purkinje, com baixa interferência no sistema nervoso autônomo, via bloqueio dos canais rápidos de sódio (143).

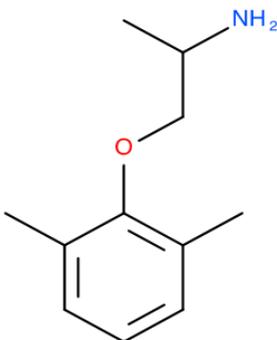


Figura 1.8: Estrutura química da Mexiletina.

Estudos indicam que, assim como a lidocaína, o uso da mexiletina, por via oral, é capaz de induzir o relaxamento das vias aéreas em pacientes asmáticos, além de ação sobre mediadores e células inflamatórias (117, 123, 144). No entanto, apesar da atividade anti-inflamatória do anestésico, a aplicação do mesmo esbarra em limitações

importantes, as quais são decorrentes da própria ação da mexiletina como inibidora do canal de sódio, o que está inerentemente vinculado a efeitos colaterais graves como toxicidade cardiovascular, distúrbios gastrointestinais e no sistema nervoso central (145). Na busca de novas moléculas, o grupo utilizou o “know-how” desenvolvido no estudo anterior para realizar alterações estruturais no protótipo mexiletina, visando, essencialmente, suprimir a atividade anestésica a qual está sabidamente associada a efeitos adversos, e potencializar a atividade anti-inflamatória e espasmolítica.

1.5 Serie II de análogos estruturais com atividade anti-inflamatória otimizada

Em colaboração com a equipe de pesquisadores do Departamento de Síntese Orgânica de Farmanguinhos, foram planejados e sintetizados um total de 48 compostos, que puderam ser submetidos à avaliação de toxicidade pré-clínica por pesquisadores do Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em ensaios *in silico*, e triagens farmacológicas em estudos *in vitro* e *in vivo*. Após realização dos ensaios iniciais, os compostos foram ranqueados tendo como base, a atividade anestésica reduzida, atividade anti-espasmódica otimizada e a ineditibilidade estrutural. Tendo estes parâmetros como referência, 33 compostos foram ranqueados acima do protótipo, sendo 23 destes, estruturalmente inéditos. Entre toda a gama de novos análogos sintetizados, 5 compostos se destacaram. E entre estes, o objeto central deste trabalho, o análogo JME-209 (Figura 1.9A), composto estruturalmente inédito que, em estudos prévios, destacou-se por sua atenuada atividade sobre o bloqueio de canais de sódio em células de linhagem neuronal (Figura 1.8B), assim como também, a atividade espasmolítica otimizada em relação ao protótipo. Ademais, o composto JME-209 teve o pedido de patente recentemente concedido por escritório de proteção intelectual europeu (Patente EP 3031794), estando ainda em análise nos EUA, Japão e Índia. Diante dos resultados promissores obtidos com o composto JME-209 em estudos prévios, este foi selecionado e avaliado neste trabalho em um modelo murino de inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro a fim de elucidarmos seu potencial terapêutico e aplicabilidade clínica na DPOC.

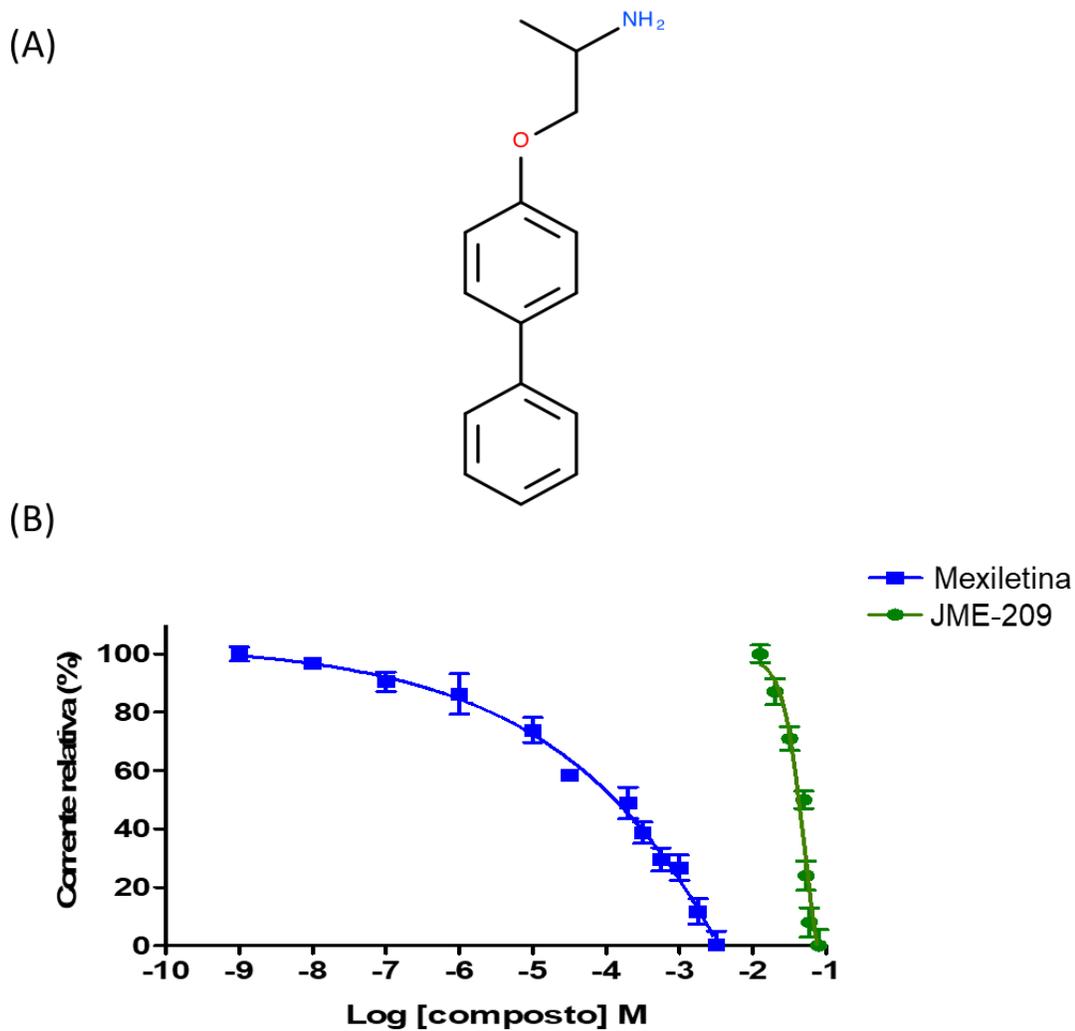


Figura 1.9: Estrutura química do análogo estrutural JME-209 (A). A figura 7B representa a inibição de correntes de sódio em células GH3 tratadas com mexiletina ou JME-209. Mexiletina está representado por pontos quadrados, e JME-209 por pontos redondos. Os resultados representam a Média \pm EPM (N=4 para cada grupo). Disponível em:

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial anti-inflamatório e broncodilatador do composto JME-209, avaliando sua potencialidade em diferentes modelos de inflamação pulmonar.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito do JME-209 sobre o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas com base no sistema de anéis isolados de traqueia de rato;
2. Avaliar o impacto do tratamento com JME-209 sobre o broncoespasmo induzido por metacolina em camundongos hígidos.
 - i. Estimar o tempo de ação broncorelaxante do JME-209;
 - ii. Comparar o efeito do JME-209 com agentes terapêuticos de uso na clínica.
3. Avaliar o impacto do tratamento com JME-209 sobre a inflamação pulmonar induzida por LPS.
 - i. Estimar o tempo de ação broncorelaxante do JME-209;
 - ii. Comparar o efeito do JME-209 com agentes terapêuticos de uso na clínica.
 - iii. Avaliar o influxo leucocitário na luz das vias aéreas;
 - iv. Comparar os efeitos da administração tópica e sistêmica com JME-209;
4. Avaliar o impacto do tratamento com JME-209 em modelo de inflamação pulmonar insensível ao tratamento com glicocorticoides.
 - i. Efeito sobre a broncoconstrição e hiper-reatividade induzida por LPS;
 - ii. Influxo leucocitário na luz das vias aéreas;

5. Avaliar o impacto do tratamento oral com JME-209 sobre a inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro em camundongos através da análise de parâmetros como:
- i. Influxo leucocitário na luz das vias aéreas;
 - ii. Mediadores inflamatórios no tecido pulmonar;
 - iii. Estresse oxidativo;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos das cepas A/J ou C57BL/6 pesando cerca de 18 – 20 g. Foram também utilizados ratos da linhagem Wistar pesando cerca de 180-200 g. Os animais foram fornecidos pelo INCTB-FIOCRUZ. Os animais foram alojados em caixas com suprimento de água e comida, sem restrições, em ambiente com temperatura controlada e 12h de luz. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética da FIOCRUZ (Licença LW-23/14).

3.2 Preparação de anéis isolados de traqueia

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Em seguida, abriu-se as regiões cervical anterior e torácica para que a traqueia fosse localizada e retirada. Esta foi transferida para uma placa de petri contendo solução nutritiva de Krebs com a seguinte composição (mM): NaCl 118 mM, KCl 4,8, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 24 e glicose 11. Na placa, os tecidos anexos foram removidos e a traqueia seccionada em segmentos transversos circulares, cada um contendo cerca de 3-5 anéis cartilagosos traqueais. Para o registro das contrações, os segmentos traqueais foram montados em cubas para órgão isolado contendo 5 mL de solução fisiológica de Krebs, a temperatura de 37°C, mantida constante pela circulação de água proveniente de banho maria com propulsão, e continuamente aerados com mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂). Os anéis traqueais foram conectados a dois pontos, um fixo na cuba e outro conectado ao transdutor (GRASS FT-03) apropriado para o registro das contrações isométricas e conectado a um sistema de digitalização e registro de dados (PowerLab™ 16/30, LabChart, versão 8.1, AD Instruments, Austrália). Primeiramente, cada segmento traqueal foi contraído com 2,5 µM de carbacol como teste de viabilidade tecidual. Após estabelecida a resposta de contração, o líquido nutritivo foi substituído por outro sem o estímulo (carbacol), levando ao relaxamento da musculatura até a linha de base. Mexiletina, JME-209 ou veículo (Salina 0,9 %) foi então, adicionado às cubas 10 minutos antes da construção da curva cumulativa de carbacol.

3.3 Avaliação não invasiva da obstrução das vias aéreas (estudo *in vivo*)

3.3.1 Em camundongos hígidos

A análise da broncoconstrição das vias aéreas foi realizada em camundongos A/J hígidos, através de pletismografia barométrica de corpo inteiro não invasiva. O efeito do veículo PBS ou o agente colinérgico metacolina sobre a reatividade das vias aéreas foi medido através do parâmetro Penh, uma medida indireta da resistência das vias pulmonares ao fluxo aéreo, realizadas em animais acordados e não imobilizados como descrito anteriormente por Hammelman et al (146). Os camundongos foram submetidos ao aerossol de metacolina (150 mg/mL) por 5 min, após terem sido expostos por tempo igual ao PBS. De acordo com cada protocolo experimental, as estimulações com PBS e metacolina foram realizadas 1 h, 3 h, 24 h e 48 h após o tratamento oral com JME-209 (1, 3 ou 10 mg/Kg) ou Salmeterol (3 ou 10 mg/Kg) (Figura 3.1).

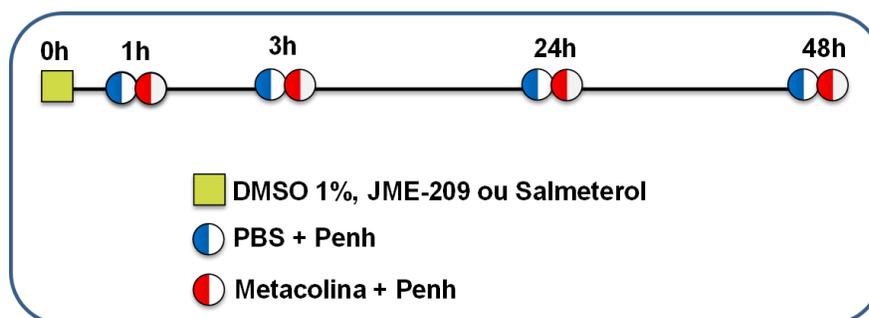


Figura 3.1: Esquema representativo do protocolo de avaliação da obstrução das vias aéreas avaliada por pletismografia barométrica não-invasiva em camundongos provocados com metacolina (150 mg/mL).

3.3.2 Em camundongos instilados com LPS

Para avaliação do efeito de JME-209 (10, 30 e 60 mg/Kg, oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou ipratrópio (25 µg/mL, aerossol) sobre a broncoconstrição induzida pela instilação de LPS, os animais foram previamente tratados com os compostos. Uma hora após os tratamentos, os animais foram provocados com LPS (10 ou 25 µg/ 40µL, aspiração orofaríngea). Os animais foram avaliados por pletismografia barométrica não-invasiva nos tempos de 1 e 24 h após a instilação de LPS. Quarenta e oito horas após o

estímulo inflamatório, os animais foram estimulados com o agente broncoconstritor metacolina, a fim de observar-se o impacto dos tratamentos sobre a hiper-reatividade brônquica (Figura 3.2). De acordo com o protocolo experimental, a provocação com LPS foi realizada 1 h após os tratamentos com JME-209 (10 e 60 mg/Kg, oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou Ipratrópio (25 µg/mL, aerosol) (Figura 3.2).

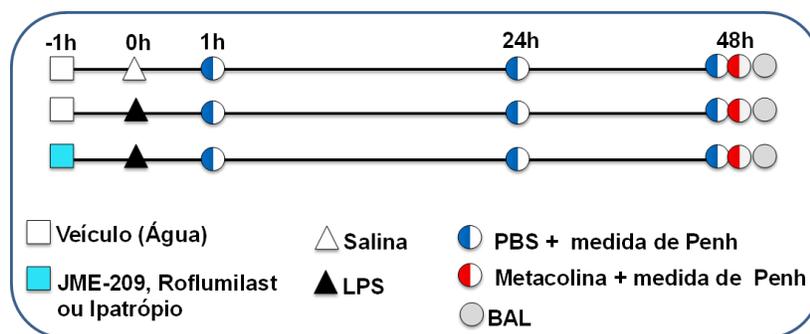
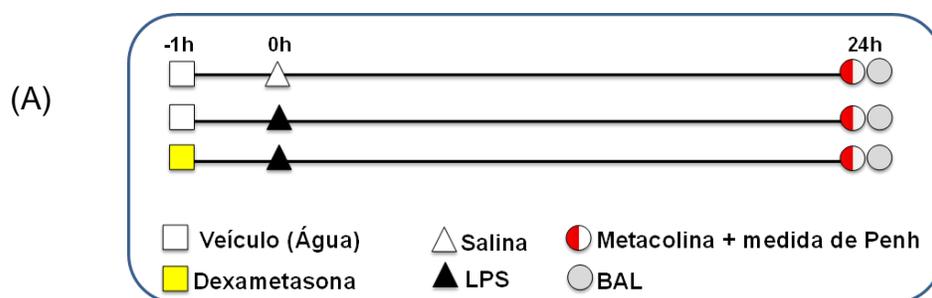


Figura 3.2: Esquema representativo do protocolo de avaliação da obstrução das vias aéreas avaliada por pletismografia barométrica não-invasiva em camundongos instilados com LPS.

3.4 Modelo murino de inflamação pulmonar sensível e refratário ao tratamento com glicocorticoides

Camundongos A/J foram anestesiados por aerosol de halotano e submetidos a administração orofaríngea de LPS (10 µg/40 µL) durante 1 (modelo de inflamação pulmonar sensível ao glicocorticóide) ou 3 dias consecutivos (modelo de inflamação pulmonar insensível ao glicocorticóide). Nos grupos controle negativo, o LPS foi substituído por seu veículo NaCl 0.9% estéril. O tratamento oral com JME-209 (30 mg/Kg) ou dexametasona (1 mg/Kg) foi administrado 1 h antes dos estímulos com LPS. (Figura 3.3)



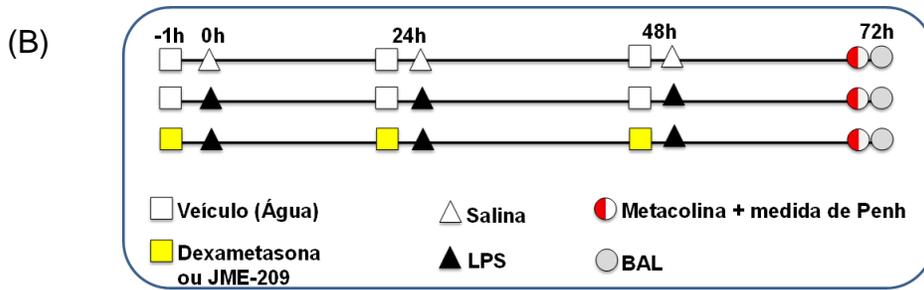


Figura 3.3: Esquema representativo do protocolo de resposta inflamatória sensível (A) ou insensível a glicocorticoides (B).

3.5 Modelo de inflamação pulmonar induzida pela exposição à fumaça de cigarro

Quarenta e oito camundongos C57BL/6 foram expostos juntos, à fumaça de 6 cigarros Marlboro® sem filtro durante 2 dia consecutivos. No 3° e 4° dia, foram expostos à fumaça de 8 e 10 cigarros respectivamente, conforme previamente reportado (86). A exposição foi feita através da fumaça sugada e injetada por uma bomba peristáltica dentro de uma caixa de acrílico. Os animais ficaram em contato com a fumaça de cigarro durante 15 minutos. Após o fim dos 15 minutos de inalação, os animais foram expostos ao ar ambiente durante 8 minutos. Durante as inalações, foi respeitado um intervalo de 15 minutos entre cada cigarro aceso e consequentemente inalado (Figura 3.4). De acordo com o protocolo experimental, os animais foram tratados 1 h antes de cada exposição à fumaça de cigarro com JME-209 (30 e 60 mg/Kg, oral), mexiletina (60 mg/Kg, oral) ou roflumilast (3 mg/Kg, oral). O grupo controle negativo foi exposto ao ar ambiente. As análises foram feitas 24 h após a última exposição à fumaça de cigarro (Figura 3.4).

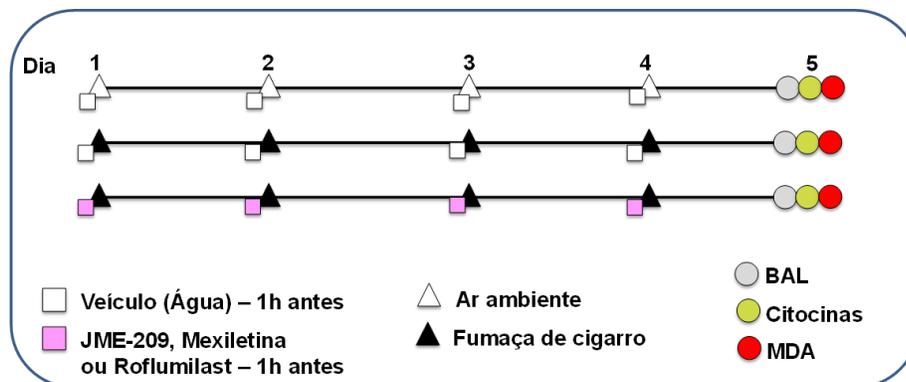


Figura 3.4: Esquema representativo do protocolo de lesão pulmonar induzida por inalação de fumaça de cigarro em camundongos C57BL/6.

3.6 Contagem de células do lavado broncoalveolar (BAL)

Os animais foram sacrificados 18 h após a última exposição à fumaça de cigarro ou 48 h após instilação com LPS por dose letal de tiopental sódico (500 mg/Kg i.p). Logo após, tiveram a traquéia dissecada e canulada. O BAL foi obtido por três lavagens consecutivas de 0,5 mL de EDTA 10 mM em Solução Salina Tamponada (PBS). Os lavados foram centrifugados a 3500 RPM durante 10 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 250 µL de solução PBS para contagem de células. A contagem de leucócitos totais foi realizada com auxílio de câmara de Neubauer em microscopia óptica (aumento de 100x) diluindo-se uma alíquota de suspensão de células provenientes do lavado em líquido de Türk (1:10). Para a contagem de leucócitos diferenciais, as amostras foram citocentrifugadas a 400 RPM por 5 minutos e posteriormente coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio óptico com objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x).

3.7 Obtenção do tecido pulmonar

Após realização do BAL, os pulmões foram perfundidos, com auxílio de uma cânula intracárdica no ventrículo direito com solução salina contendo 10 mM de EDTA para o pulmão direito ou solução de paraformaldeído tamponado a 4 % para o pulmão esquerdo. Após as perfusões, os pulmões foram removidos. O lobo direito do pulmão foi fragmentado, congelado em nitrogênio líquido e conservado a -20°C para análises posteriores.

3.8 Avaliação da presença de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar

As amostras de tecido pulmonar foram homogeneizadas em 1mL de PBS, contendo Triton X-100 (0,1 %) e inibidores de protease (Complete®, Hoffman-La Roche Ltda, Suíça). Logo após o macerado foi centrifugado a 10.000 g, 4°C por 15 min. Os níveis das citocinas e quimiocinas de interesse como IL-1 β , MIP-1 α e KC foram quantificados pelo ensaio de ELISA nos sobrenadantes utilizando kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante (R&D System). A análise foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices) em comprimento de onda de

450 nm. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de citocina ou quimiocina (pg) por mg de tecido pulmonar.

3.9 Análise do dano oxidativo

Para a quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA), foi utilizado o método de TBARs como parâmetro de peroxidação lipídica. Para tal, amostras do tecido pulmonar foram homogeneizadas em 1 mL de tampão KPE (100 mM + EDTA 5 mM). A seguir, os homogenatos foram centrifugados a 600 g por 10 minutos a 4 °C. Logo após, foi adicionado 100 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % em 100 µL de sobrenadante. Após a diluição, as amostras foram centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos a 4°C. Logo após, foi adicionado 150 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA). Em seguida, as amostras foram encubadas ao abrigo de luz por 15 minutos a 95 °C. Os níveis de MDA foram determinados por absorbância a 532 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M5 – Molecular Devices) e expressos como nmol/mg de proteína.

3.10 Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas, em amostras de tecido pulmonar macerado, foi feita através da técnica de quantificação pelo ácido bicinconínico (BCA). Para realização deste método, foram dissolvidos 2 mg de albumina bovina sérica (BSA) em 1 mL de água destilada. Em seguida, foi feita uma diluição seriada do BSA para elaboração de uma curva padrão com diferentes concentrações. Em uma placa de 96 poços, foram plaqueados 25 µL de cada ponto da curva, em duplicata, além das amostras em sequência. Por fim, adicionou-se 200 µL por poço de uma solução contendo sulfato de cobre e BCA na proporção de 1:50. A placa foi mantida na estufa a 37 °C por 15 min ao abrigo da luz. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 562 nm.

3.11 Análise Estatística

As análises foram feitas pelo software GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média, e analisados estatisticamente através do teste One Way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Os valores de p inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito comparativo da inibição da contração colinérgica de anéis de traqueia por mexiletina e análogo JME-209

Primeiramente, investigamos o efeito anti-espasmódico da mexiletina e de seu análogo estrutural, JME-209 sobre a contração colinérgica de anéis de traqueia de ratos, através do sistema de banho de órgão isolado. A Figura 4.1 indica as curvas de inibição da contração de anéis traqueais, induzida por carbacol, na presença ou ausência de mexiletina (A) ou JME-209 (B). Observamos que a resposta contrátil foi totalmente inibida pela pré-incubação com mexiletina ou JME-209. No entanto, notamos que o análogo se mostrou claramente mais potente, apresentando um IC_{50} de $95,5 \mu\text{M}$ enquanto que o protótipo mexiletina apresentou IC_{50} de $395 \mu\text{M}$.

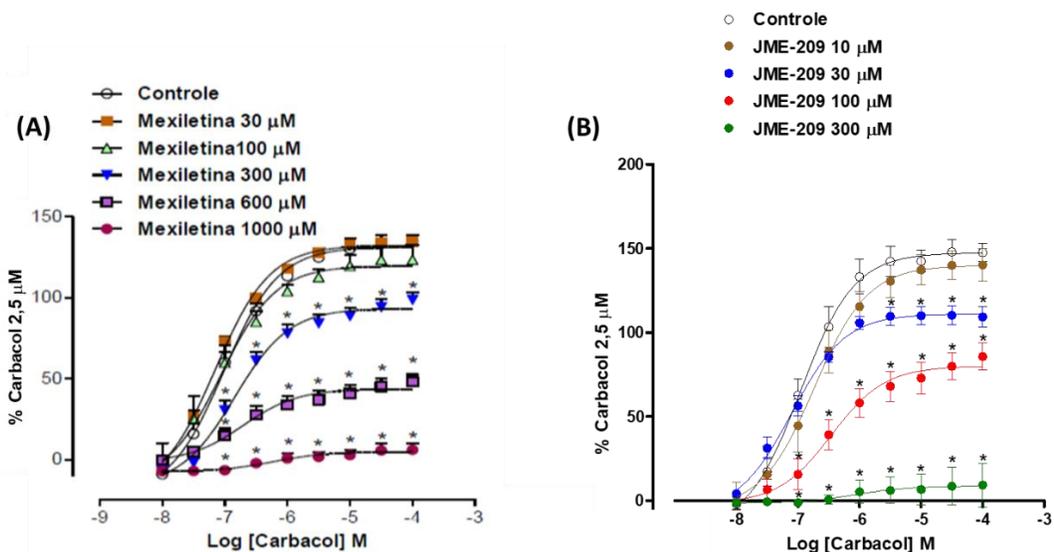


Figura 4.1: Atividade anti-espasmódica de Mexiletina (A) e JME-209 (B) na contração de anéis isolados de traqueia de rato induzida por carbacol. Os dados estão expressos como porcentagem da resposta contrátil induzida por $2,5 \mu\text{M}$ de carbacol. Os valores representam a média \pm EPM de 4 a 6 segmentos traqueais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com a resposta contrátil de anéis traqueais tratados com o veículo.

4.2 Efeito comparativo da inibição da broncoconstricção colinérgica *in vivo* por JME-209 e salmeterol

A fim de avaliar a potencial ação anti-espasmódica da substância JME-209 *in vivo*, desenvolvemos um bioensaio de broncoespasmo induzido por aerossol de metacolina em camundongos. As medidas foram feitas em animais acordados e não imobilizados, através da técnica de pletismografia barométrica de corpo-inteiro não invasiva (146). Uma das principais vantagens desta técnica é que se pode avaliar, no mesmo grupo experimental, o impacto do tratamento sobre o aumento de resistência das vias aéreas pulmonares, induzido pelo agente espasmogênico, em diferentes tempos, variando de 1 h às 48 h após o tratamento. A Figura 4.2, painel B mostra que, após exposição de PBS, os valores de Penh (medida indireta de resistências das vias aéreas no sistema de pletismografia não invasiva) mantiveram-se inalterados em todos os tempos analisados. Ao contrário, a primeira estimulação com metacolina (150 mg/ml, 200 μ l) aumentou em aproximadamente 300% o valor de Penh, comparado ao veículo (PBS), enquanto que os valores de Penh subiram cerca de 700% e 1100 % após a segunda e terceira provocação repetida com metacolina, nos tempos de 2 e 5 h após a primeira provocação, respectivamente (Figura 4.2 Painel B). Os aumentos de Penh causados por metacolina voltaram a apresentar valores comparáveis aquele observado após a primeira exposição (aproximadamente 300%), quando as estimulações foram realizadas nos tempos de 24 h e 48 h após a primeira.

Com base no modelo estabelecido, foram avaliados os efeitos dos tratamentos com JME-209 (1, 3 e 10 mg/kg) por via oral, tendo como referência de terapia broncodilatadora, em uso na clínica, o agente β 2 agonista salmeterol (3 e 10 mg/kg, oral). Como ilustrado na Figura 4.3, JME-209 e salmeterol foram incapazes de inibir o broncoespasmo colinérgico no tempo de 1 h (Painel B), mas ambos inibiram a exacerbação da resposta broncoconstrictora observada no tempo de 3 h após o tratamento (Painel C) em todas as doses estudadas. Observou-se ainda inibição estatisticamente significativa da resposta de broncoconstricção induzida por metacolina no tempo de 24 h, nas doses de 3 e 10 mg/kg de JME-209, e na dose de 10 mg/kg de salmeterol (Painel D). Por último, observou-se que ambos os tratamentos se mostraram inativos no bloqueio da resposta à provocação de metacolina no tempo de 48 h (Painel E).

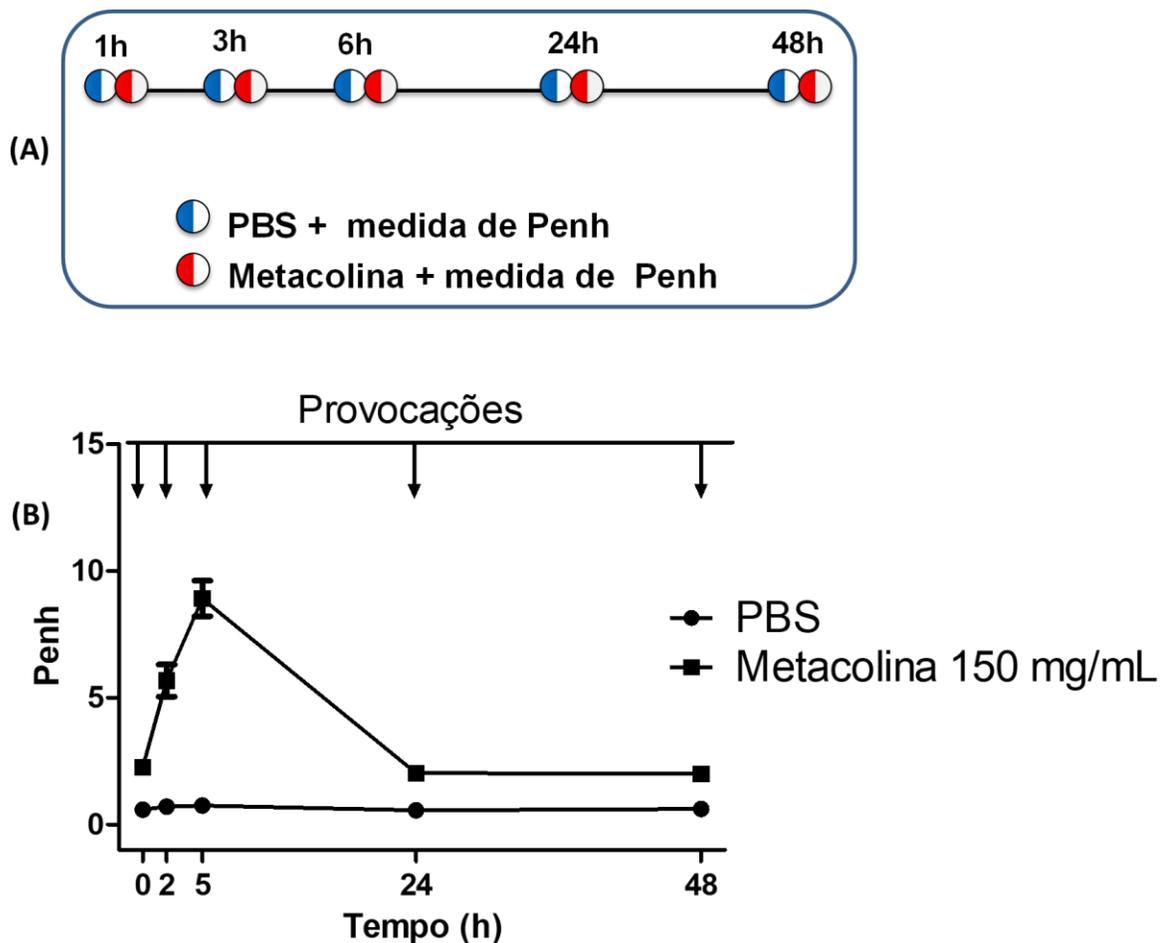


Figura 4.2: Resposta de broncoespasmo induzida por repetidas provocações com o agonista colinérgico metacolina (150 mg/mL, 200 µl, aerossol) ou veículo (PBS) nos tempos de 0 h (n=14), 2 h (n=14), 5 h (n=14), 24 h (n=5) e 48 h (n=5) em camundongos A/J hígdos. O painel A ilustra o protocolo de broncoespasmo induzido por metacolina utilizado. O painel B representa a broncoconstrição em função do algoritmo Penh medida através de pletismografia barométrica não invasiva em animais acordados e não imobilizados. Os valores representam a média ± EPM. * $p < 0,05$ comparado ao estímulo com PBS.

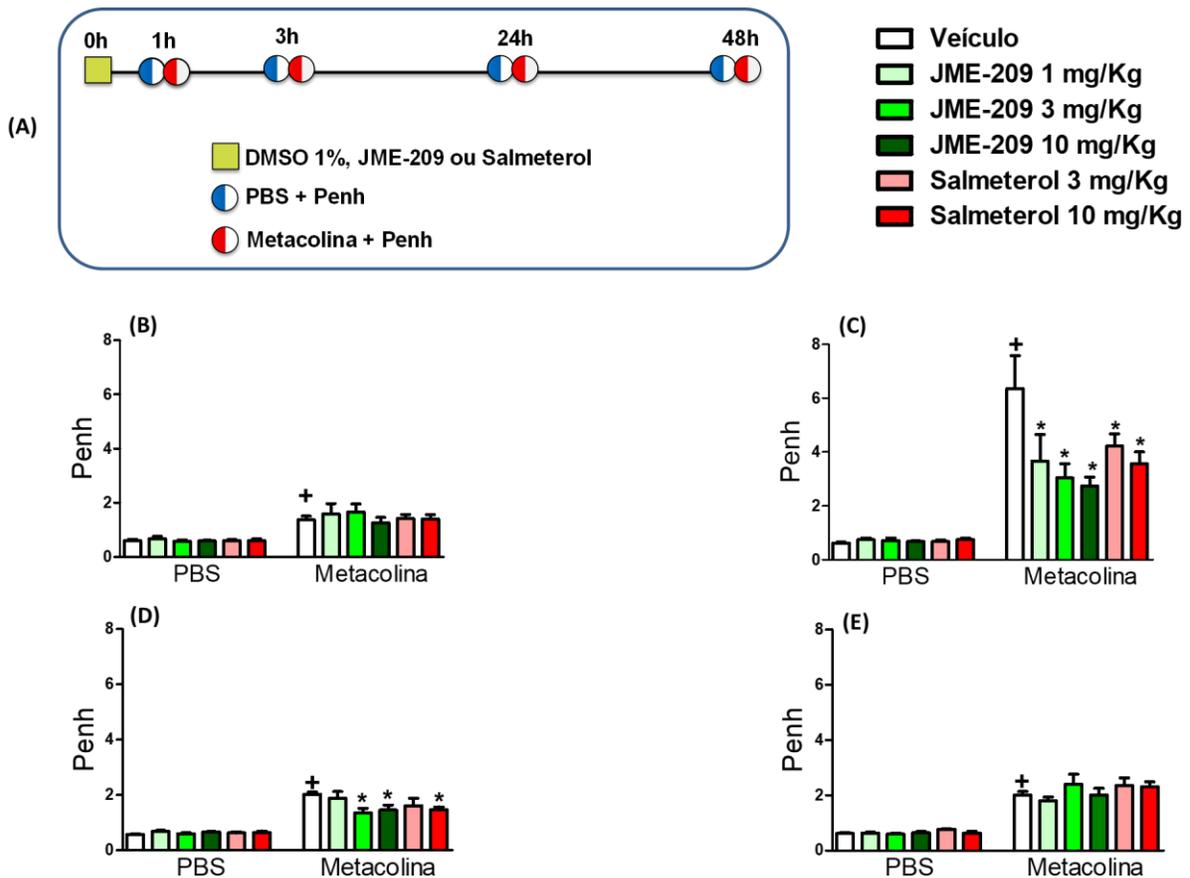


Figura 4.3: Efeito de JME-209 (1, 3 ou 10 mg/Kg, oral), salmeterol (3 ou 10 mg/Kg, oral) ou veículo (DMSO 1%, oral) sobre o aumento da resistência de vias aéreas (Penh) induzido por metacolina (150 mg/mL, aerossol) em camundongos A/J hípidos. O painel A ilustra o protocolo de broncoespasmo induzido por metacolina utilizado. As provocações com metacolina foram feitas 1 h (B), 3 h (C), 24 h (D) e 48 h (E) após o tratamento, sendo a resposta de Penh obtida nos respectivos tempos através de pletismografia barométrica não invasiva. Os valores representam a Média \pm EPM de 5 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com PBS e tratado com veículo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com metacolina e tratado com veículo.

4.3 Efeito do tratamento com JME-209 na broncoconstrição e hiper-reatividade de vias aéreas induzidas por LPS *in vivo*

Tendo em vista que o composto JME-209 apresentou ação anti-espasmódica em ensaios *in vitro* e *in-vivo*, buscou-se investigar se este efeito seria mantido no contexto da inflamação pulmonar. Para tanto, investigou-se o efeito do JME-209 na broncoconstrição e hiper-reatividade de vias aéreas induzidas por aspiração orofaríngea de LPS em camundongos A/J, tendo os tratamentos com ipratrópio e roflumilast como referências de uso clínico.

Conforme ilustrado na figura 4.4, a administração de LPS por aspiração orofaríngea resultou em um quadro de broncoconstrição das vias aéreas, refletido pelo aumento de Penh 1 h (Painel B) e 24 h (Painel C) após o estímulo inflamatório, quando comparado ao grupo estimulado com veículo (salina). O pré-tratamento com JME-209 na dose de 60 mg/kg, mas não na dose de 10 mg/kg, inibiu a broncoconstrição induzida por LPS nos tempos de 1 h (Figura 4.4 Painel B) e 24 h (Figura 4.4 Painel C) após o estímulo com LPS (10 µg/40 µl/animal). Nas mesmas condições, o tratamento com roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou ipratrópio (25 µg/mL, aerossol 3 ml, 30 min), foi incapaz de inibir a resposta de broncoconstrição por LPS.

Quarenta e oito horas após o estímulo inflamatório com LPS, na ausência de alteração nos níveis de Penh basais, mesmo nos grupos tratados, observou-se um estado de hiper-reatividade à provocação com metacolina, que foi sensível ao tratamento oral com JME-209, nas doses de 10 e 60 mg/kg (Figura 4.5 Painel B). A hiper-reatividade foi também inibida por ipatrópio, mas não por roflumilast (Figura 4.5 Painel B).

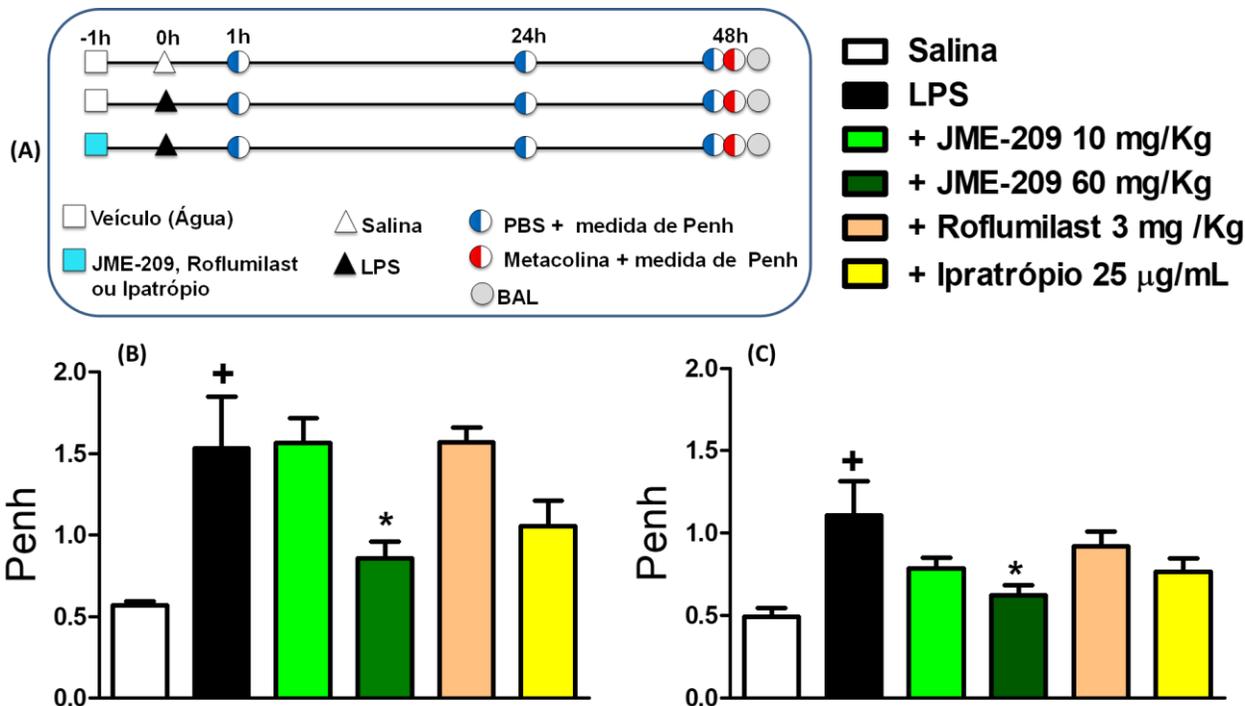


Figura 4.4: Efeito de JME-209 (10 ou 60 mg/kg, oral), roflumilast (3 mg/kg, oral) ou ipratrópio (25 µg/ml, 3 ml, aerossol) sobre o aumento da resistência de vias aéreas (Penh) induzido por LPS (25 µg/35 µl/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por LPS utilizado. A resposta de Penh foi obtida 1 h (B) e 24 h (C) após LPS, através de pletismografia barométrica não invasiva. Os valores representam a Média ± EPM de 6 a 8 animais por grupo. ⁺ $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com salina tratado com veículo. ^{*} $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com LPS e tratado com veículo.

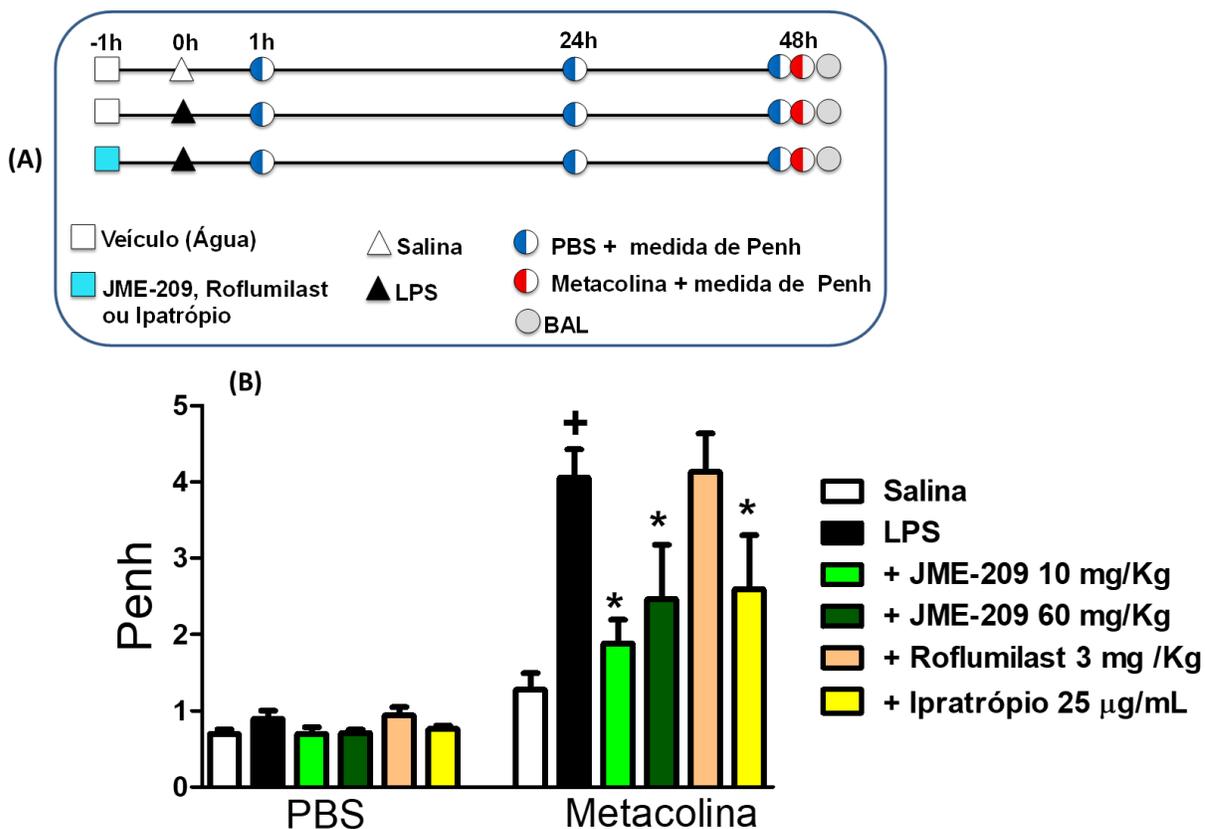


Figura 4.5 : Efeito do tratamento com JME-209 (10 ou 60 mg/Kg via oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou ipratrópio (25 µg/mL, 3 mL, aerossol) sobre a hiper-reatividade à metacolina (150 mg/mL) na inflamação pulmonar causada por LPS (25 µg/35 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por LPS utilizado. A resposta de hiper-reatividade foi medida através de pletismografia barométrica não invasiva (Penh) 48 h após a provocação com LPS (B). Os valores representam a média ± EPM de 6 a 8 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com PBS tratado com veículo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com LPS e tratado com veículo.

4.4 Efeito do tratamento oral com JME-209 sobre o influxo de células inflamatórias nas vias aéreas induzido por LPS.

Na sequência, avaliamos o efeito de JME-209 (10 e 60 mg/Kg, oral), ipratrópio (25 µg/mL, aerossol) ou roflumilast (3 mg/Kg, oral) sobre o infiltrado leucocitário induzido pela aspiração orofaríngea de LPS em camundongos A/J. As células inflamatórias foram obtidas a partir do lavado broncoalveolar, 48 h após a provocação com LPS. Como indicado na figura 4.6, a estimulação com LPS promoveu um aumento expressivo do número total de leucócitos no BAL se comparado ao grupo controle estimulado com veículo (salina) (Painel B), tendo neutrófilos como subtipo leucocitário majoritário (Painel C). A mesma figura mostra que JME-209, nas duas doses empregadas, bem como ipratrópio e roflumilast foram ativos no bloqueio do aumento do número de leucócitos totais e neutrófilos causado por LPS (Painéis B e C).

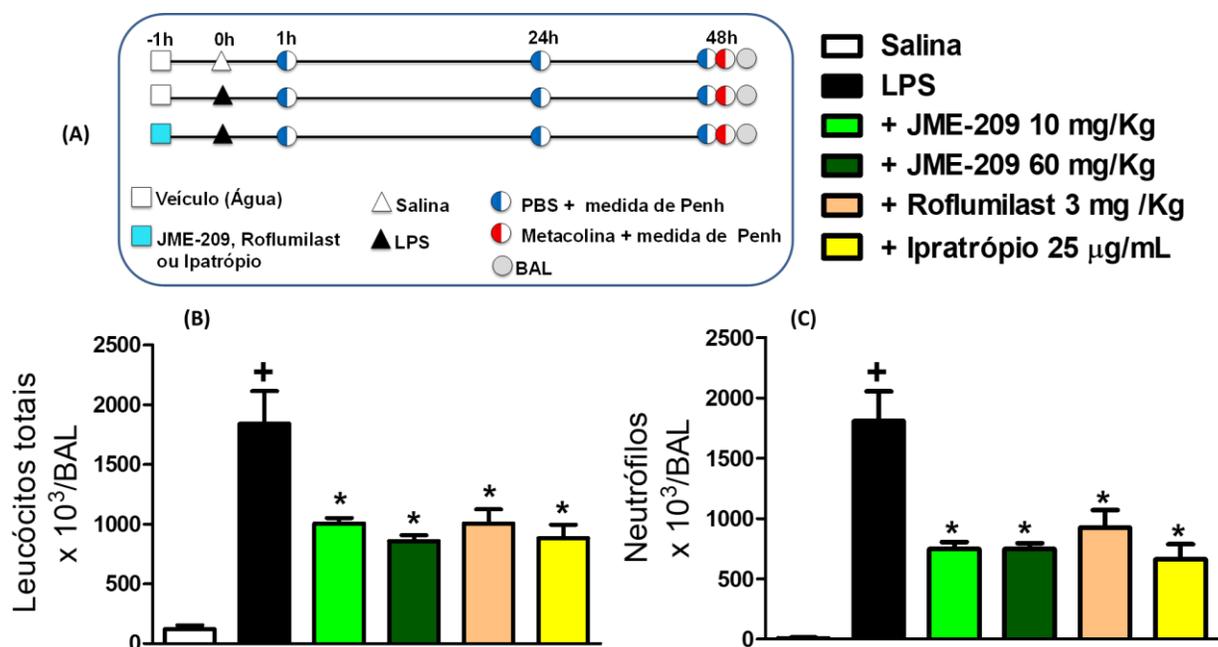


Figura 4.6: Efeito do tratamento com JME-209 (10 ou 60 mg/Kg via oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou ipratropio (25 µg/mL, 3 mL, aerossol) sobre os níveis de leucócitos totais (B) e neutrófilos (C) presentes no lavado broncoalveolar 48 h após provocação com LPS (25 µg/40 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por LPS utilizado. Os valores representam a média ± EPM de 6 a 8 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com salina e tratado com veículo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com LPS e tratado com veículo.

4.5 Efeito comparativo dos tratamentos oral e nebulizado com JME-209 sobre a inflamação, broncoconstrição e hiper-reatividade das vias aéreas induzidas por LPS.

Na comparação do potencial farmacológico de JME-209 administrado por via oral (60 mg/kg) ou aerossol (10 mg/ml, 3 ml, 30 min), utilizou-se mais uma vez o LPS como estímulo inflamatório, e o protótipo mexiletina como referência de agente broncodilatador. A Figura 4.7 mostra que JME-209, assim como mexiletina, dado por via oral ou aerossol, inibiu a broncoconstrição induzida por LPS no tempo de 1 h (Painel B), enquanto que, para ambos compostos, somente o tratamento por via oral permaneceu ativo 24 h (Painel C) após a provocação com LPS. Nossos achados mostraram também que a hiper-reatividade das vias aéreas observada 48 h após LPS foi sensível apenas ao tratamento oral com JME-209 (Figura 4.8 Painel B).

No que diz respeito à inflamação das vias aéreas, a figura 4.9 mostra que o tratamento com JME-209, em ambas as vias de administração, reduziu de maneira significativa o acúmulo de leucócitos totais (Painel B) e neutrófilos (Painel C) no efluente do BAL que se encontrava aumentado após estímulo com LPS. Por outro lado, mexiletina não teve impacto sobre o número aumentado de células inflamatórias.

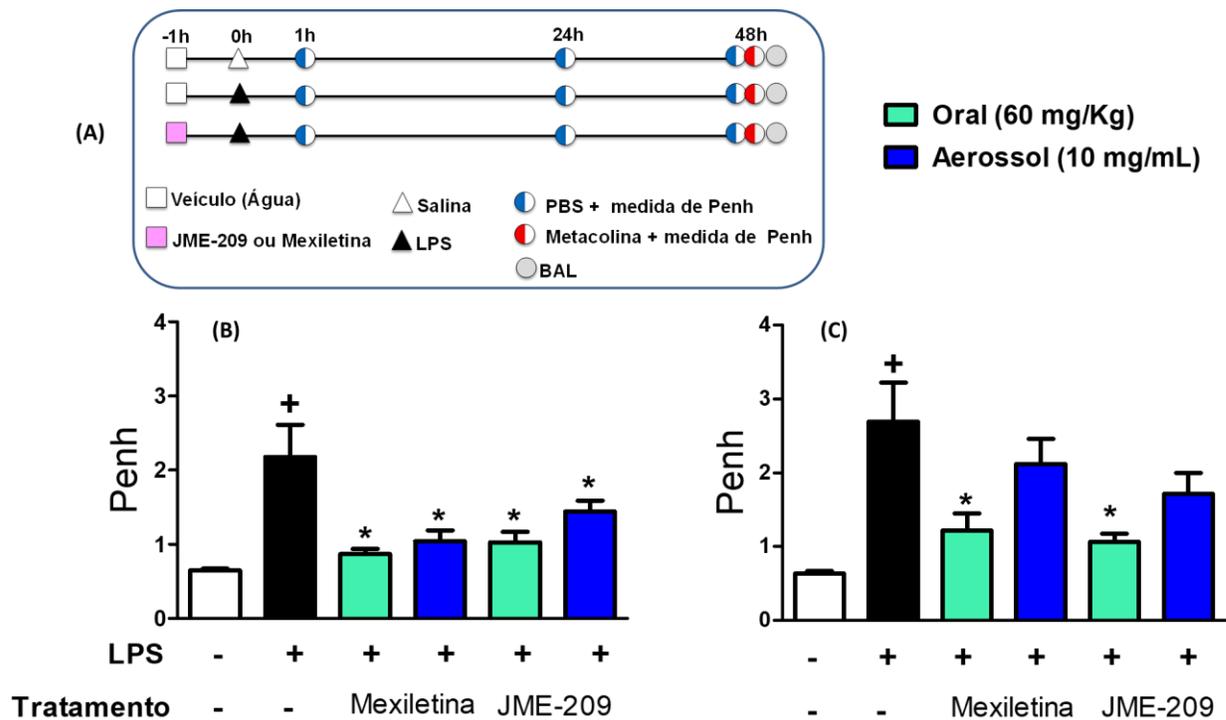


Figura 4.7: Efeito comparativo dos tratamentos oral (60 mg/Kg) e aerossol (10 mg/mL, 3 mL, 30 min) com JME-209 ou mexiletina sobre o aumento da resistência de vias aéreas (Penh) induzido por LPS (25 µg/40 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por LPS utilizado. A resposta de Penh foi obtida 1 h (B) e 24 h (C) após LPS através de pletismografia barométrica não invasiva. Os valores representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com salina tratado com veículo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com LPS e tratado com veículo.

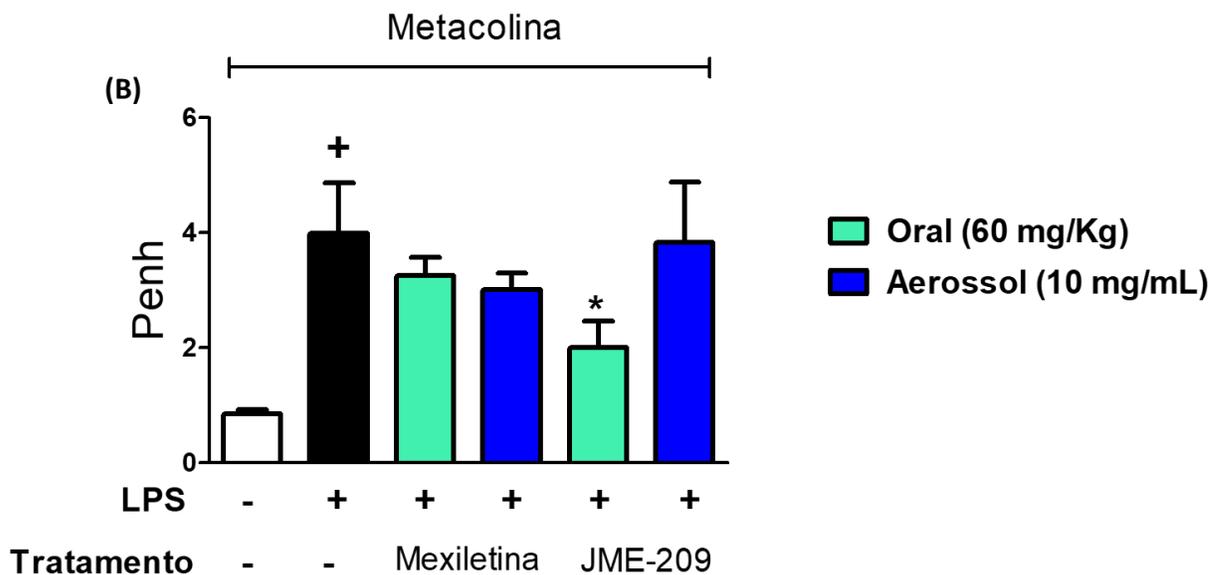
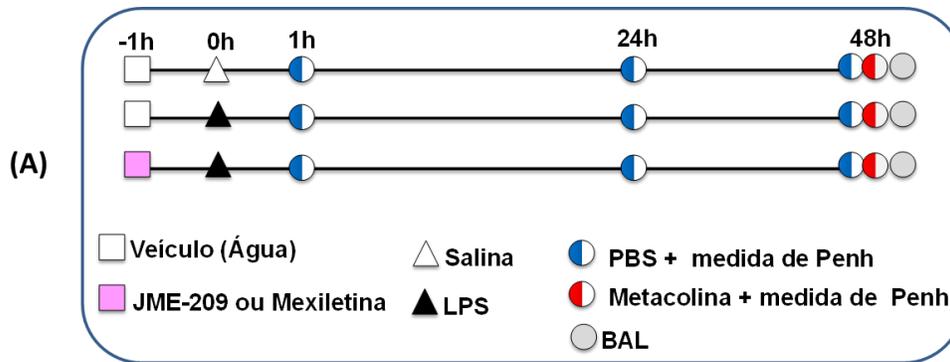


Figura 4.8: Efeito comparativo dos tratamentos oral (60 mg/Kg) e aerossol (10 mg/mL, 3 mL, 30 min) com JME-209 ou mexiletina sobre a hiper-reatividade à metacolina (150 mg/mL) na inflamação pulmonar causada por LPS (25 µg/40 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por LPS utilizado. A resposta de hiper-reatividade foi medida através de pletismografia barométrica não invasiva (Penh) 48 h após a provocação com LPS (B). Os valores representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com PBS tratado com veículo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com LPS e tratado com veículo.

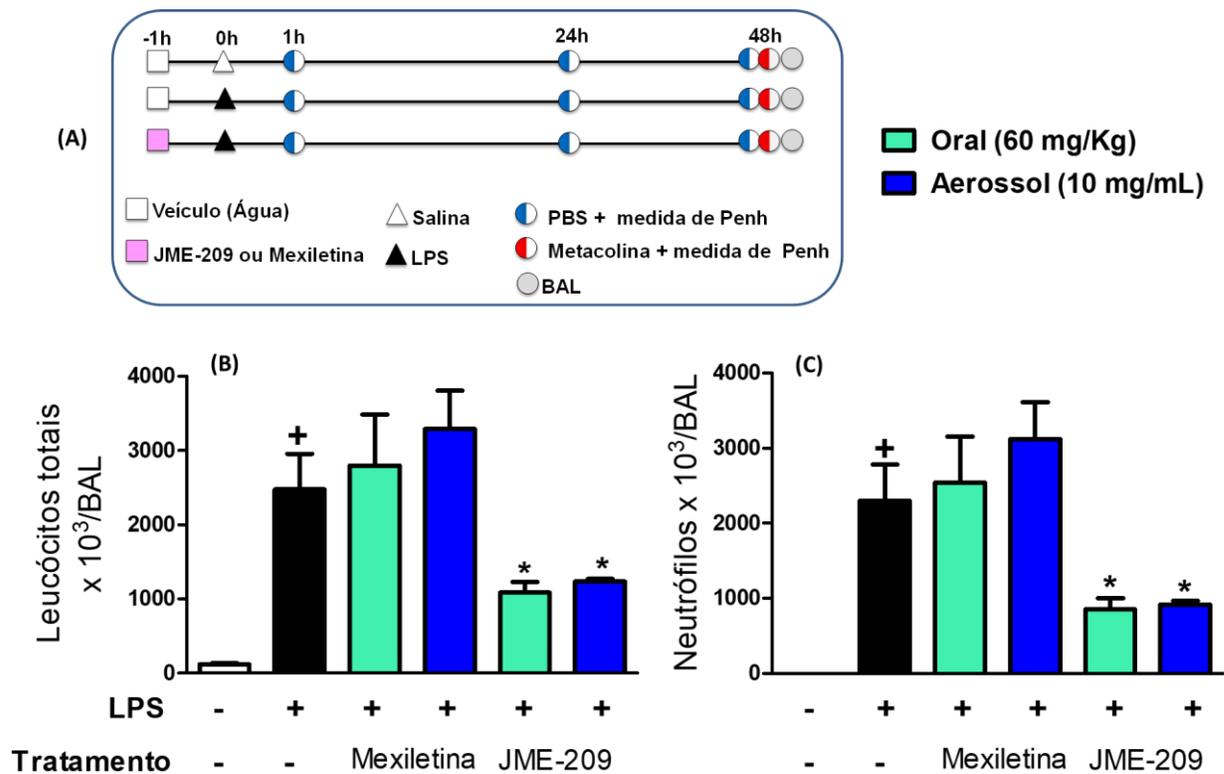


Figura 4.9: Efeito comparativo dos tratamentos oral (60 mg/Kg) e aerossol (10 mg/mL, 3 mL, 30 min) com JME-209 ou mexiletina sobre os níveis de leucócitos totais (B) e neutrófilos (C) presentes no lavado broncoalveolar 48 h após provocação com LPS (25 µg/40 µL/animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J. O Painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por LPS utilizado. Os valores representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com PBS tratado com veículo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com LPS e tratado com veículo.

4.6 Efeito do tratamento com JME-209 sobre a resposta inflamatória pulmonar insensível a glicocorticoides

Uma vez que a refratariedade a glicocorticoides representa um aspecto crítico na clínica, avaliamos a atividade de JME-209 (30 mg/Kg, oral) sobre a inflamação pulmonar resistente à terapia com glicocorticoide. Para tanto, realizamos, inicialmente, um estudo onde comparamos o impacto da exposição única ou sucessiva (3 provocações consecutivas em intervalos de 24h) ao LPS sobre a sensibilidade ao tratamento com glicocorticoide dexametasona em camundongos A/J. Os resultados demonstraram que quando houve apenas uma instilação com LPS, o pré tratamento (1h antes) com glicocorticoide se mostrou ativo na inibição da hiper-reatividade das vias aéreas (Figura 4.10 Painel B), bem como na redução no número de leucócitos (Figura 4.11 Painel B) e neutrófilos no efluente do BAL (Figura 4.11 Painel C). Enquanto que, os animais desafiados com LPS por 3 dias consecutivos desenvolveram um quadro de hiper-reatividade (Figura 4.12 Painel B) e acúmulo leucocitário neutrofílico (Figura 4.13 Painel C), claramente insensível ao tratamento com dexametasona (administrado 1 h antes de cada provocação). Em contrapartida, neste protocolo experimental de difícil tratamento, a administração oral de JME-209 (30 mg/kg) foi capaz de inibir a hiper-reatividade brônquica (Figura 4.12), assim como o número de leucócitos totais (Figura 4.13 Painel A) e neutrófilos (Figura 4.13 Painel B) no BAL dos animais.

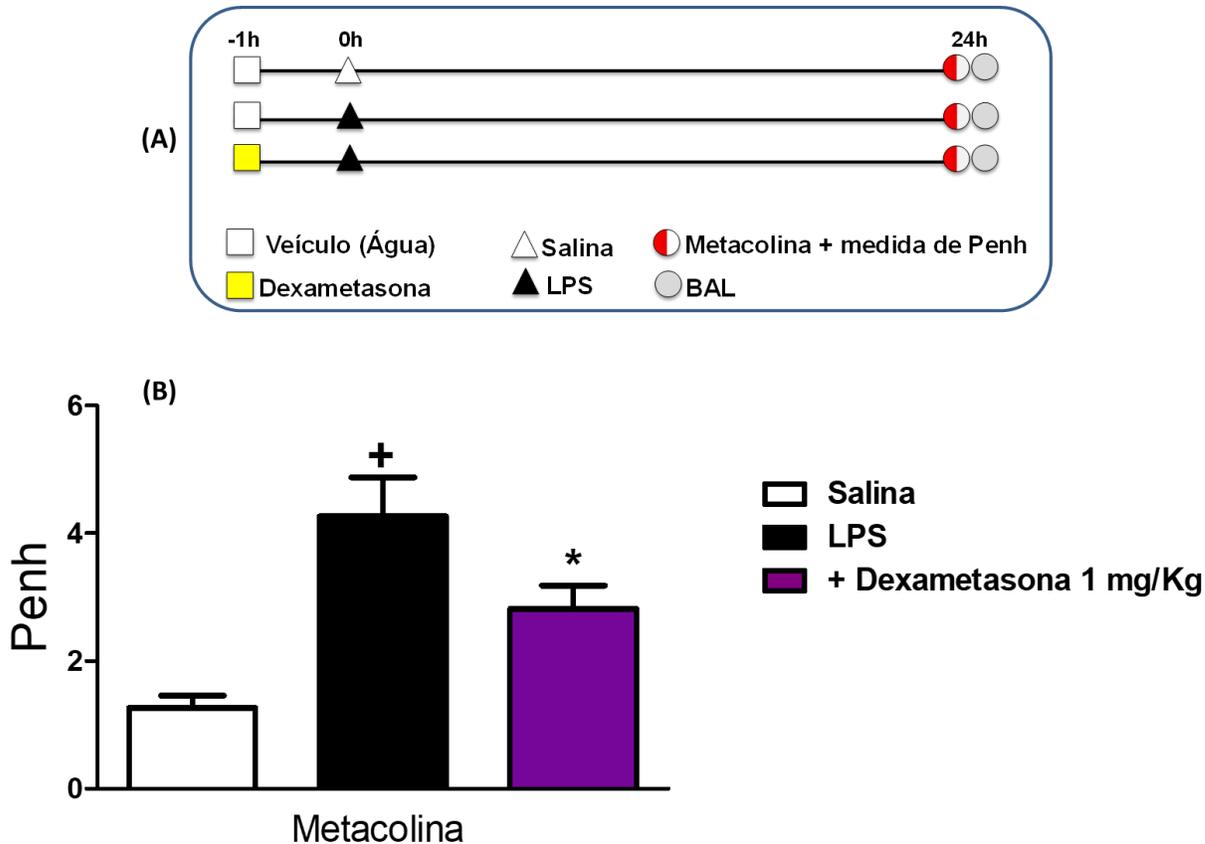


Figura 4.10: Efeito de dexametasona (1 mg/Kg, oral) sobre a hiper-reatividade à metacolina (150 mg/mL) induzida por provocação única de LPS (25 µg/35µL, 35 µL /animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por LPS sensível a glicocorticoides utilizado. Os animais foram tratados com dexametasona 1 h antes do desafio com LPS. A resposta de Penh foi obtida 24 h após LPS (B) sob estímulo de metacolina, através de pletismografia barométrica não-invasiva. Os valores representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com salina tratado com veículo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com LPS e tratado com veículo.

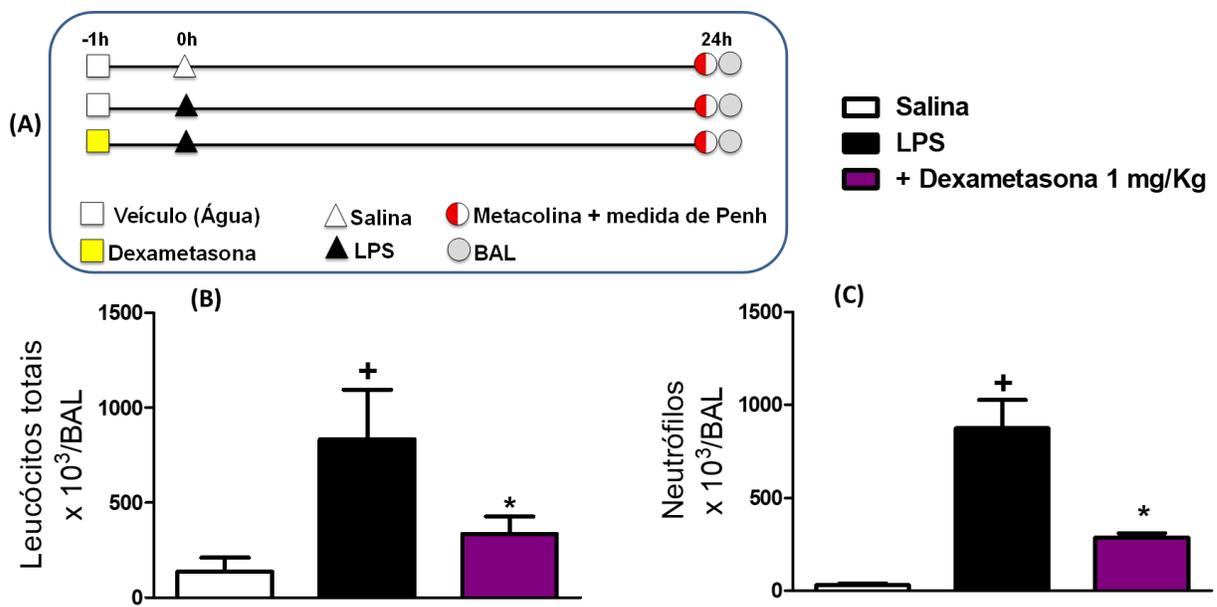


Figura 4.11: Efeito de dexametasona (1 mg/Kg, oral) sobre o aumento dos níveis de leucócitos totais (B) e neutrófilos (C) induzido por provocação única de LPS (10 µg/40µL, 40 µL /animal, aspiração orofaríngea) em camundongos A/J. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por LPS insensível à glicocorticoides utilizado. Os animais foram tratados com dexametasona 1 h antes do desafio com LPS. A contagem dos leucócitos presentes no lavado broncoalveolar foi realizada 24 h após a provocação. Os valores representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. ⁺ $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com salina e tratado com veículo. ^{*} $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com LPS e tratado com veículo.

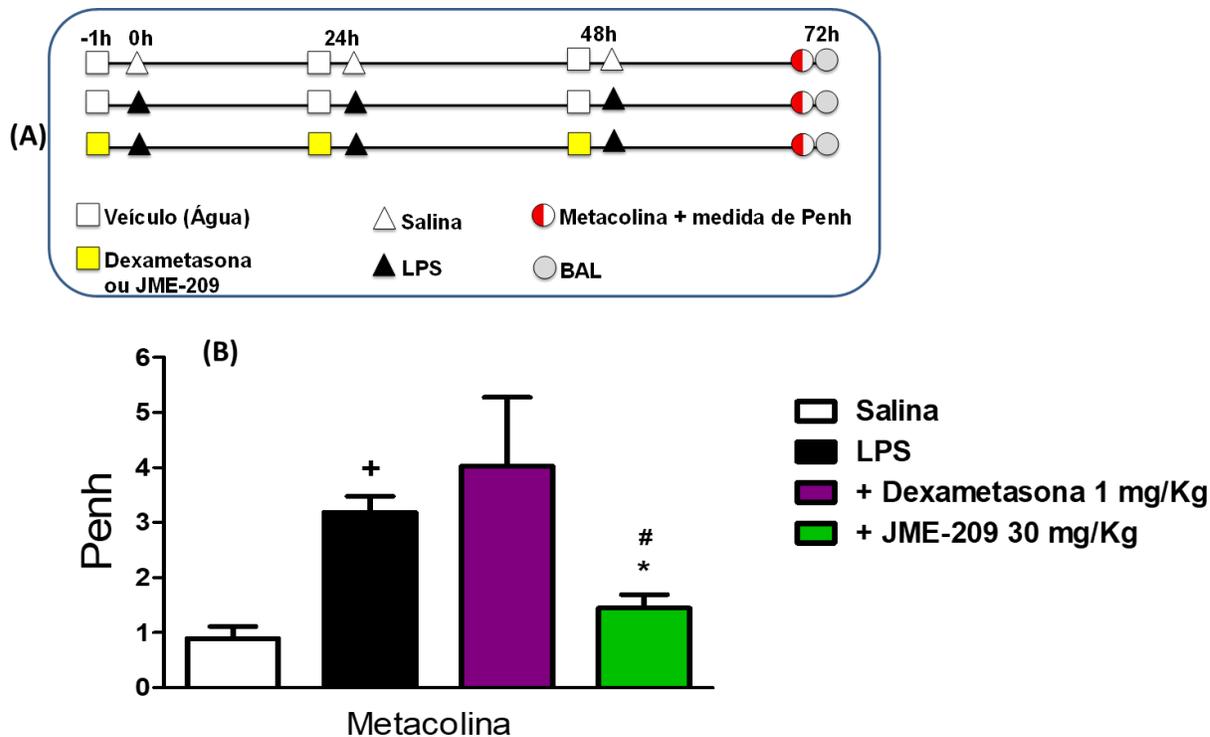


Figura 4.12: Efeito de dexametasona (1 mg/Kg, oral) ou JME-209 (30 mg/Kg) sobre a hiper-reatividade à metacolina induzida por 3 provocações consecutivas de LPS (10 µg/40µL, 40 µL /animal, aspiração orofaríngea) em intervalos de 24 h em camundongos A/J. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por LPS insensível a glicocorticoides utilizado. Os animais foram tratados com dexametasona ou JME-209 1 h antes dos desafios com LPS. A resposta de Penh foi obtida 24 h (B) após a última estimulação de LPS através de pletismografia barométrica não-invasiva. Os valores representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com salina tratado com veículo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com LPS e tratado com veículo.

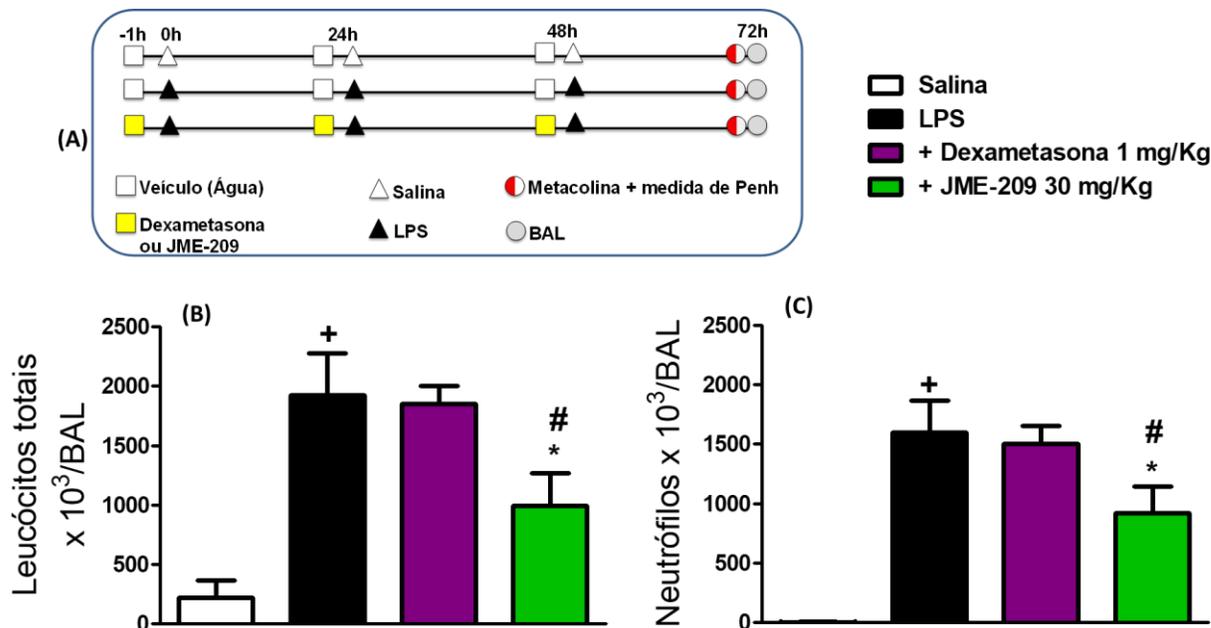


Figura 4.13: Efeito de dexametasona (1 mg/Kg, oral) ou JME-209 (30 mg/Kg) sobre o aumento dos níveis de leucócitos totais (B) e neutrófilos (C) no lavado broncoalveolar induzido por 3 provocações consecutivas de LPS (10 µg/40µL, 40 µL /animal, aspiração orofaríngea) em intervalos de 24 h. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por LPS insensível a glicocorticoides utilizado. Camundongos A/J foram tratados com dexametasona ou JME-209 1 h antes dos desafios com LPS. A contagem dos leucócitos presentes no lavado broncoalveolar foi realizada 24 h após a última estimulação de LPS. Os valores representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com salina tratado com veículo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo estimulado com LPS e tratado com veículo.

4.7 Efeito de JME-209 sobre o influxo leucocitário no BAL de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro

Visando investigar o potencial anti-inflamatório de JME-209 como terapia anti-DPOC, avaliamos o efeito do composto sobre alterações patológicas induzidas pela inalação de fumaça de cigarro em camundongos C57BL/6. O protocolo experimental em questão é considerado clinicamente relevante, uma vez que o tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença. Nesse estudo, comparamos o efeito de JME-209 (30 e 60 mg/Kg, oral) e os compostos de referência mexiletina (60 mg/kg, oral) e roflumilast (3 mg/Kg, oral) sobre a inflamação e estresse oxidativo no pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro durante 4 dias consecutivos.

A figura 4.14 mostra que o número de leucócito total (Painel B), neutrófilos (Painel C) e células mononucleares (Painel D) aumentou nos animais expostos à fumaça, se comparado aos animais controle expostos ao ar ambiente. O tratamento oral com JME-209, em ambas as doses empregadas, reduziu significativamente o aporte de leucócitos totais, sendo os neutrófilos, inibidos de maneira dose-dependente (Figura 4.14 Painel C). Roflumilast (3 mg/Kg, via oral) se apresentou igualmente ativo no bloqueio do acúmulo de neutrófilos no BAL (Figura 4.14 Painel C). Corroborando com os dados anteriores, o tratamento com mexiletina não apresentou efeito sobre o aumento de leucócitos no espaço broncoalveolar (Figura 4.14).

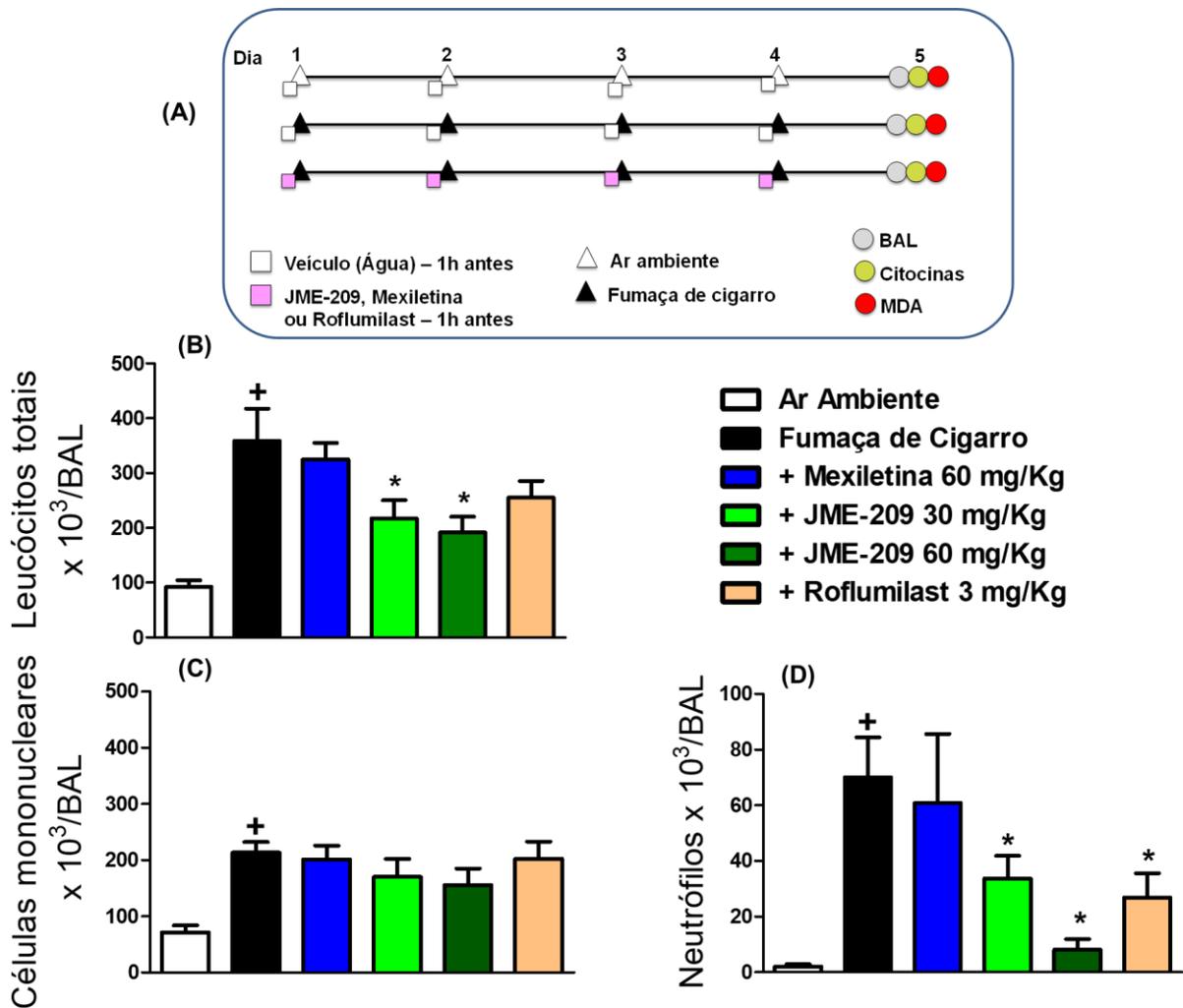


Figura 4.14: Efeito de JME-209 (30 ou 60 mg/Kg via oral), mexiletina (60 mg/Kg, oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou veículo (água, oral) sobre o influxo leucocitário no BAL de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por exposição à fumaça de cigarro utilizado. Os tratamentos foram feitos 1 h antes de cada exposição dos animais à fumaça de cigarro (ou ar ambiente, controles negativos) ao longo dos 4 dias de exposição. Os dados representam o número de leucócitos totais (B), células mononucleares (C) e neutrófilos (D) recuperados no lavado 24 h após a última exposição à fumaça de cigarro. Os valores representam a Média ± EPM de 8 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo exposto ao ar ambiente e tratado com veículo, * $p < 0,05$ comparado com o grupo exposto à fumaça de cigarro e tratado com veículo.

4.8 Efeito do tratamento com JME-209 sobre os níveis aumentados de citocinas no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro

A fim de avaliarmos se o efeito do tratamento com JME-209 sobre o infiltrado inflamatório no BAL estaria relacionado com a diminuição dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, amostras do tecido pulmonar foram maceradas e citocinas relevantes no contexto da DPOC foram avaliadas pela técnica de ELISA. A figura 4.15 mostrou um aumento significativo dos níveis das citocinas IL-1 β (Painel B), MIP-1 α (Painel C) e KC (Painel D) no pulmão dos animais expostos à fumaça, se comparado com o grupo controle exposto ao ar ambiente. O pré-tratamento com JME-209, em ambas as doses empregadas, resultou na redução dos níveis das citocinas avaliadas. A administração oral de roflumilast (3 mg/Kg) foi capaz de bloquear a produção de IL-1 β (Painel B) e KC (Painel D) enquanto que mexiletina, por sua vez, reduziu significativamente os níveis de MIP-1 α (Painel C) e KC (Painel D).

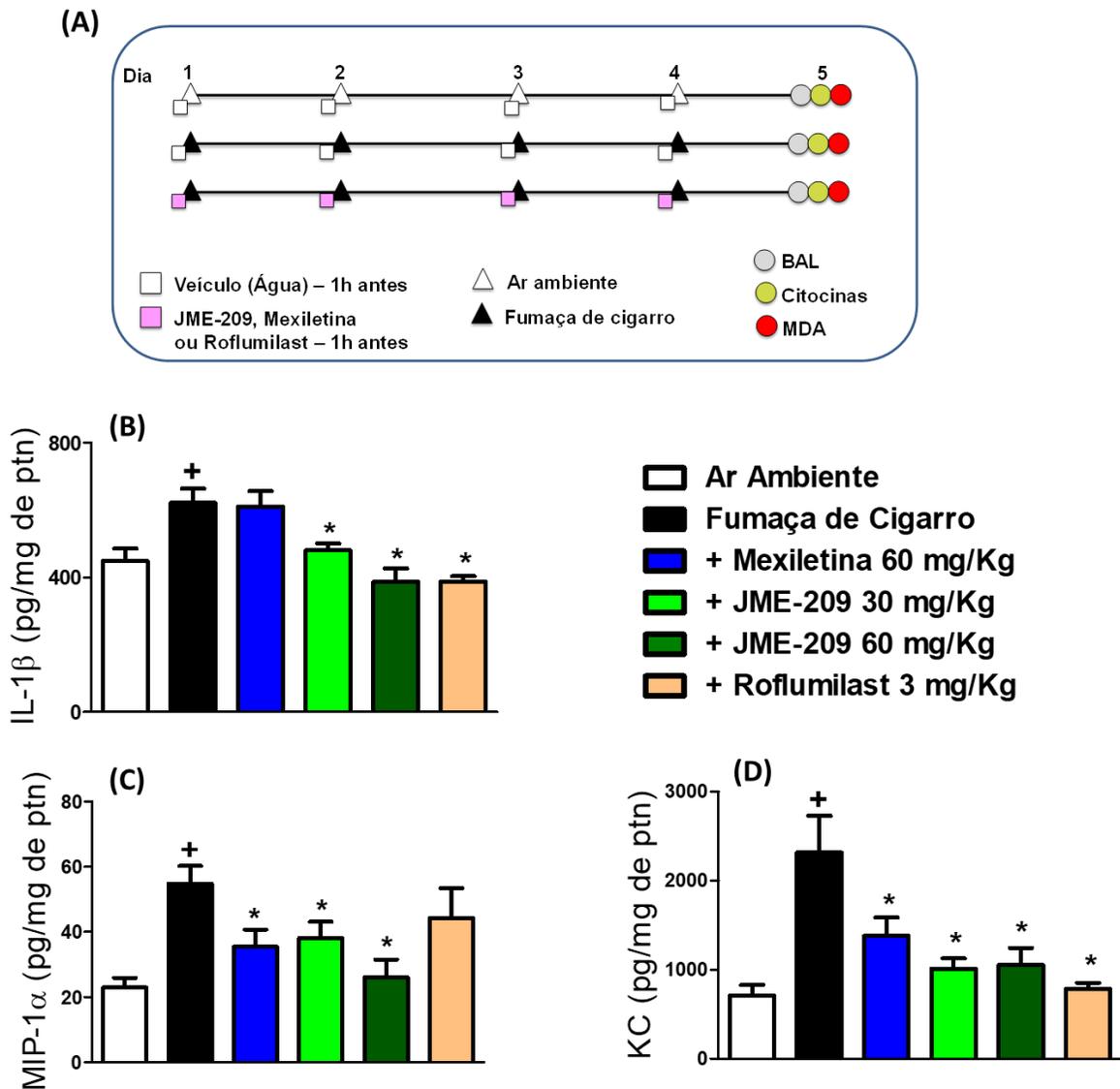


Figura 4.15: Efeito de JME-209 (30 ou 60 mg/Kg via oral), mexiletina (60 mg/Kg, oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou veículo (água, oral) sobre os níveis de IL1- β (A), MIP-1 α (B) e KC (C) no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por exposição à fumaça de cigarro utilizado. Os tratamentos foram feitos 1 h antes de cada exposição dos animais à fumaça de cigarro (ou ar ambiente, controles negativos) ao longo dos 4 dias de exposição. Os valores representam a Média \pm EPM de 8 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado com o grupo exposto ao ar ambiente e tratado com veículo, * $p < 0,05$ comparado com o grupo exposto à fumaça de cigarro e tratado com veículo.

4.9 Efeito do tratamento com JME-209 sobre os níveis aumentados de malondialdeído no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro

O estresse oxidativo é crucial no estabelecimento e progressão da DPOC, atuando na amplificação da resposta inflamatória e refratariedade aos glicocorticoides. Tendo isto como base, avaliamos o impacto do tratamento com JME-209 e dos compostos de referência sobre os níveis do marcador de dano oxidativo, malondialdeído (MDA), no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro. Os achados mostraram que a exposição à fumaça levou a um aumento significativo dos níveis de MDA, quando comparado ao grupo controle exposto ao ar ambiente, o qual foi reduzido de maneira significativa no grupo de animais pré-tratados com JME-209, em ambas as doses utilizadas (Figura 4.16 Painel B). Por outro lado, os tratamentos com mexiletina ou roflumilast não alteraram os níveis aumentados de MDA.

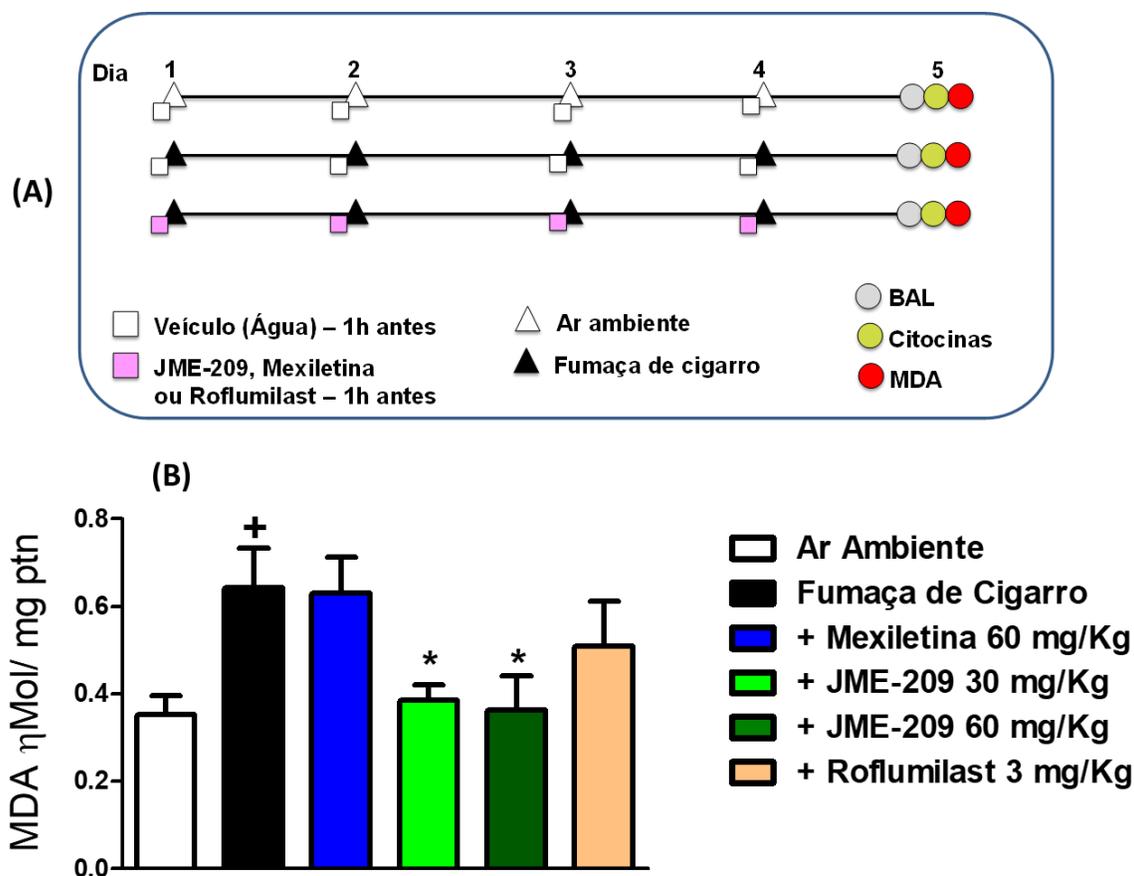


Figura 4.16: Efeito de JME-209 (30 ou 60 mg/Kg via oral), mexiletina (60 mg/Kg, oral), roflumilast (3 mg/Kg, oral) ou veículo (água, oral) sobre os níveis aumentados de malondialdeído (MDA) no pulmão de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro. O painel A ilustra o protocolo de inflamação pulmonar induzido por fumaça de cigarro utilizado. Os tratamentos foram realizados 1 h antes de cada exposição à fumaça. A quantificação de MDA (B) foi realizada através do método de TBARs em macerados do tecido pulmonar 24 h após última exposição à fumaça de cigarro. Os valores representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo. † $p < 0,05$ comparado com grupo exposto ao ar ambiente. * $p < 0,05$ comparado com o grupo exposto ao ar ambiente e tratados com veículo.

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos evidenciam os efeitos danosos da exposição à fumaça de cigarro na saúde humana (1, 2). De fato, o tabagismo é o principal fator de risco associado ao desenvolvimento da DPOC (3). Atualmente a terapia anti-DPOC é extremamente limitada, uma vez que não existem na clínica medicamentos efetivos no controle da doença, ou que reduza a taxa de mortalidade em decorrência da mesma (63, 102, 147). Nesse sentido, a busca por alternativas terapêuticas que possam tratar a doença de maneira mais eficiente é de extrema importância. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que análogos não anestésicos da lidocaína podem apresentar propriedades combinadas de relaxamento de vias aéreas e bloqueio da resposta inflamatória pulmonar, sugerindo tratar-se de autênticos protótipos na terapia contra doenças inflamatórias pulmonares (136, 140). Neste contexto, JME-209, um análogo não anestésico do anestésico local de uso oral mexiletina, apresenta propriedades farmacológicas que podem credencia-lo à terapia anti-DPOC. Na presente dissertação, investigamos o potencial anti-inflamatório e broncodilatador do composto JME-209 e sua aplicabilidade no controle da DPOC. JME-209 faz parte de uma família de análogos de mexiletina com limitada atividade anestésica recentemente patenteados pela FIOCRUZ junto ao escritório de Patentes Europeu (Patente EP 3031794).

Para avaliar se de fato, o composto JME-209 apresentaria atividade anti-espasmódica otimizada em relação ao anestésico local mexiletina, avaliamos o efeito do análogo estrutural diretamente sobre a contração da musculatura lisa em anéis de traqueia de ratos estimulados por agente espasmogênico. O carbacol é um agonista muscarínico parassimpaticomimético que estimula tanto os receptores muscarínicos como os nicotínicos (148, 149). Para tal, a contração mediada pelo agonista colinérgico resulta da ligação com receptores pós-juncionais M3 e consequentemente ativação da via de sinalização dependente de fosfolipase C, culminando no aumento da contração da musculatura lisa mediada por Ca^{2+} intracelular (150, 151). Observamos que o composto JME-209 mostrou-se mais potente que a mexiletina no bloqueio da contração da musculatura lisa. Estes resultados corroboram com os obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, onde substituições no anel aromático da lidocaína reduziu o efeito anestésico e aumentou a potência

antiespasmódica dos análogos, reforçando o conceito de que o relaxamento muscular independe da atividade anestésica (136, 138, 140).

Após o estudo comparativo de JME-209 e mexiletina em sistema de anéis isolados de traqueia de rato, onde ficou evidente a maior potência antiespasmódica do análogo em relação ao protótipo, objetivamos estabelecer no laboratório de inflamação – FIOCRUZ modelos experimentais de broncoconstricção e inflamação capazes de atestar a translacionalidade dos achados *in vitro* para modelos mais complexos *in vivo*. Em primeiro lugar, estabeleceu-se um sistema de broncoconstricção colinérgica em camundongos A/J, utilizando a técnica de pletismografia barométrica de corpo inteiro não invasiva. Neste sistema, camundongos não anestesiados e não imobilizados foram expostos ao aerossol de metacolina. A grande vantagem desta técnica não invasiva é a obtenção de medidas sequenciais de broncoconstricção, permitindo o monitoramento da atividade anti-espasmódica de compostos candidatos num mesmo animal, e em diferentes tempos após o tratamento.

Nossos achados revelaram que a exposição de camundongos A/J ao aerossol de metacolina (150 mg/ml, 200 µl, 5 min) levaram a uma significativa elevação (cerca de 250%) nos valores basais de Penh, que é um algoritmo capaz de indicar o grau de resistência do fluxo de ar nas vias aéreas pulmonares. De forma interessante, a segunda e a terceira provocação consecutiva com aerossol de metacolina, realizadas 2 h e 5 h após a primeira, resultou em aumentos de resistência ainda maiores, com valores de Penh claramente exacerbados comparados à primeira provocação com metacolina (700-1100% de aumento no Penh). Já os estímulos com metacolina realizados nos mesmos animais nos tempos de 24 e 48 h após a primeira provocação apresentaram aumentos de Penh comparáveis aquele observado por ocasião da primeira provocação. Isto nos indica que a exacerbação da resposta broncoconstritora à metacolina está relacionada ao espaçamento temporal entre as provocações, visto que em um curto espaço de tempo (2-3 h), a repetição do estímulo levou a exacerbação da resposta de Penh nesses animais, o mesmo não ocorrendo quando as repetições ocorrem em intervalos maiores de 19-24 h. Nossos achados estão alinhados com os estudos de Cozzi e colaboradores, que demonstraram que camundongos da cepa A/J desenvolveram um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas sob estímulo de metacolina sem a necessidade de um microambiente inflamatório (152).

Com base no protocolo padronizado e empregado, observou-se que JME-209 apresentou tempo de bloqueio sobre o broncoespasmo induzido por metacolina comparável ao medicamento broncodilatador β 2 agonista de referência salmeterol. Apesar de amplamente utilizado na clínica, estudos demonstram que pacientes que seguem tratamento com o agente β 2 agonista possuem baixa eficácia no que tange a proteção ao desenvolvimento de infecções virais ou pneumonias, as quais são, em conjunto, as principais causas de exacerbação da DPOC (153). Isto é confirmado pelas evidências de Calverley e colaboradores que demonstraram que pacientes portadores de DPOC que faziam o uso prolongado do glicocorticoide fluticasona em associação com salmeterol, apresentaram um aumento significativo no número de casos de pneumonia, se comparado com o grupo tratado apenas com o glicocorticoide (154). Estudos na literatura também relatam que a administração de doses elevadas de salmeterol resulta em efeitos adversos significativos como o aumento de batimentos cardíacos, palpitações e aumentos de glicose e potássio no plasma sanguíneo (155). Ademais, Salpeter e colaboradores relataram que a monoterapia diária com broncodilatadores β 2 agonistas como salbutamol, salmeterol ou formoterol resultaram em uma tolerância destas drogas, reduzindo significativamente seus efeitos, e com isso, não impactando sobre o controle de doenças como a asma e DPOC (79). É possível sugerir que o efeito broncorelaxante do JME-209 pode estar relacionado à redução do influxo de cálcio e indução da liberação de cálcio intracelular, mecanismos esses já descritos na literatura para mexiletina, lidocaína e para os análogos de lidocaína avaliados pelo nosso grupo de pesquisa anteriormente (136, 140, 156-158). Dessa forma, JME-209 pode ser uma alternativa mais segura e eficaz para o alívio dos sintomas referentes a obstrução das vias aéreas, sem as complicações e efeitos colaterais de broncodilatadores β 2 agonistas como o salmeterol.

Caracterizado o efeito anti-espasmódico de JME-209 *in vivo*, posteriormente, avaliamos a atividade do composto no contexto da inflamação pulmonar. Para tal, os animais foram estimulados com LPS por aspiração orofaríngea. Este modelo foi escolhido em nossa triagem pelo fato de ser bem estabelecido em estudos de nosso grupo de pesquisa (159) assim como por outros autores (130, 160-162). Além disso, é de fácil reprodutibilidade, onde o desenvolvimento da lesão pulmonar leva normalmente algumas horas após a administração, tornando o modelo de grande valia em ensaios

rápidos visando a triagem e escolha de doses de drogas estudadas. Relatos na literatura demonstram que a administração de LPS nas vias aéreas de camundongos é capaz de gerar um quadro de broncoconstrição, o qual parece ser mediado principalmente pelo aumento da produção de TNF- α por células epiteliais e macrófagos alveolares (163). De fato, nossos resultados confirmaram que a provocação com o agente inflamatório resultou em um quadro de broncoconstrição que permaneceu por pelo menos 24 h após o desafio com LPS. O tratamento oral com JME-209 inibiu significativamente a broncoconstrição nas medidas realizadas até 24 h após a provocação com LPS. Por outro lado, os compostos de referência ipratrópio e roflumilast nas doses empregadas foram ineficazes nas mesmas condições. Passadas 48 h após a provocação com o agente inflamatório, os animais foram expostos ao aerossol de metacolina (150 mg/mL) para estudo do impacto dos tratamentos sobre a hiper-reatividade brônquica associada à inflamação por LPS. Interessantemente, o tratamento oral com JME-209 nas doses de 10 e 60 mg/Kg, oral, inibiu significativamente a hiper-reatividade induzida por instilação de LPS. O efeito de JME-209 na dose mais baixa utilizada (10 mg/Kg) sobre a hiper-reatividade brônquica está alinhado com os resultados obtidos na exacerbação do broncoespasmo induzido por metacolina, indicando que doses mais baixas de JME-209 já são suficientes para inibir a hiper-reatividade brônquica por LPS. Nesse cenário, o antagonista colinérgico brometo de ipratrópio também se mostrou eficaz em inibir a AHR enquanto que roflumilast, foi novamente inativo. Os resultados aqui obtidos corroboram estudos que demonstram que a lidocaína, anestésico local análogo à mexiletina, também é capaz de relaxar a musculatura lisa respiratória, tanto em modelos experimentais com roedores como em estudos clínicos com pacientes com asma. Neste caso, o mecanismo de relaxamento está relacionado à diminuição da concentração de cálcio, em parte, pela diminuição do influxo de cálcio extracelular e pela redução da mobilização de cálcio intracelular, mecanismos importantes na contração da musculatura lisa brônquica e na hiper-reatividade das vias aéreas (156, 157). Ademais, estes resultados são comparáveis aos observados por nosso grupo de pesquisa com os análogos não-anestésicos da lidocaína os quais, em estudos *in vivo*, apresentaram marcada proteção em sistemas de hiper-reatividade brônquica em modelos de asma, com base em camundongos sensibilizados e desafiados com alérgeno (136).

Avaliamos então a potencial atividade de JME-209 sobre o infiltrado inflamatório pulmonar induzido por LPS. Diversos estudos demonstram que a administração de LPS nas vias aéreas de camundongos leva a um quadro inflamatório pulmonar caracterizado pelo influxo expressivo de leucócitos, principalmente neutrófilos (159, 160, 164). Este subtipo leucocitário é o primeiro a acumular-se nos sítios de inflamação, liberando proteases e citocinas, que são importantes na defesa inata, mas que podem estar implicados também em processos patológicos (165). Observamos que o tratamento com JME-209 inibiu significativamente o acúmulo de leucócitos totais e neutrófilos no BAL em ambas as doses empregadas. Os compostos de referência utilizados mostraram-se igualmente eficazes sobre o bloqueio do acúmulo de leucócitos no espaço broncoalveolar. Estudos evidenciam que anestésicos locais apresentam efeito protetor no contexto da resposta inflamatória neutrofílica (117, 127, 128, 132). Esta hipótese é também sustentada por Mikawa e colaboradores, demonstrando que o tratamento com a lidocaína reduziu significativamente o número de neutrófilos em um modelo de lesão pulmonar induzida por LPS em coelhos (166). Ademais, evidências na literatura mostram que a mexiletina, protótipo da molécula central deste trabalho, pode atuar na inibição da geração de radicais livres, além de retardar a produção do ânion superóxido por neutrófilos, inibindo assim, o potencial pró-inflamatório destas células (167). Esses estudos estão alinhados com os nossos achados, reforçando que, apesar de não apresentar mais atividade anestésica, o análogo JME-209 apresenta atividade anti-inflamatória otimizada.

Visando a possibilidade do composto JME-209 ser ativo por outras vias de administração, buscamos comparar o efeito do tratamento oral com aquele obtido via exposição do animal ao aerossol de JME-209 sobre a inflamação pulmonar induzida por LPS, tendo o protótipo mexiletina como referência farmacológica. Observamos que tanto mexiletina como JME-209 foram capazes de inibir a broncoconstrição observada no tempo de 1 h após administração via aerossol, mas falharam na broncoconstrição observada 24 h após LPS. Por outro lado, ambos os compostos foram ativos, na dose de 60 mg/Kg, no bloqueio da resposta broncoconstritora até 24 h após o estímulo inflamatório, sugerindo que, tanto mexiletina como o análogo JME-209, apresentam tempo de ação mais prolongado se administrados por via oral. De maneira interessante, somente o tratamento oral com o composto JME-209 foi eficaz em inibir a hiper-

reatividade brônquica evidenciada neste modelo. Estudos na literatura demonstram que anestésicos locais como a lidocaína e mexiletina, apresentam atividade broncorelaxante em pacientes asmáticos humanos, sendo tal resposta decorrente da sua ação direta sobre a musculatura lisa nas vias aéreas e sobre a atividade de células centrais na resposta alérgica (124). De maneira semelhante, Groeben e colaboradores demonstraram a eficácia do tratamento oral com mexiletina em inibir a broncoconstrição em pacientes asmáticos (144). Os nossos dados indicam que, de fato, a mexiletina demonstra atividade broncorelaxante, no entanto, tal resposta apresenta menor duração, além de não se manter sustentada em condições onde há hiper-reatividade brônquica. Os dados indicam ainda, que as modificações estruturais realizadas no composto JME-209, além de minimizar a atividade anestésica, resultou na otimização da atividade anti-espasmódica em relação ao protótipo. Em relação ao tempo de ação mais prolongado observado na condição do tratamento oral, não se pode a priori descartar a possibilidade de que parte da atividade resulte da produção de metabólitos ativos.

Comparamos também, o efeito dos tratamentos tópico e oral com JME-209, ou mexiletina, sobre o acúmulo de leucócitos no BAL de camundongos A/J. O tratamento com JME-209, independente da via de administração empregada, mostrou-se eficaz em inibir o influxo de neutrófilos para a luz das vias aéreas 48 h após o estímulo inflamatório. O tratamento com mexiletina, por sua vez, foi ineficaz em reduzir o acúmulo leucocitário no espaço broncoalveolar em ambas as vias de administração. Nossos achados estão alinhados com os estudos realizados por Schmidt e colaboradores, os quais demonstraram que o pré-tratamento com lidocaína inibiu a ativação e a aderência de leucócitos nas paredes vasculares, demonstrando uma importante atividade dos anestésicos locais sobre a instalação da inflamação (168). Nossos dados também corroboram com estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, onde alterações estruturais na molécula do anestésico local lidocaína gerou análogos com atividade anti-inflamatória otimizada em relação ao protótipo (136, 140).

Estudos mostram que pacientes portadores de DPOC são refratários ao tratamento com anti-inflamatórios esteroidais (106, 108, 109, 111). Os glicocorticoides são medicamentos altamente eficazes no tratamento de diversas desordens inflamatórias, como por exemplo a asma, onde em torno de 95 % dos asmáticos são

responsivos ao tratamento com corticoides (169). Diante disso, avaliamos a atividade do análogo JME-209 sobre a inflamação pulmonar resistente a glicocorticoides através do modelo estabelecido no laboratório de inflamação - FIOCRUZ. Conforme esperado, observamos que quando seguimos o protocolo sensível (exposição única ao LPS), as alterações decorrentes do estímulo com o agente inflamatório mostraram-se claramente sensíveis ao anti-inflamatório esteroidal. Nesta condição, a dexametasona inibiu de maneira significativa a hiper-reatividade brônquica e o acúmulo leucocitário neutrofílico nas vias aéreas. Corroborando com estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (170) e de outros autores (171, 172), confirmamos em nossos dados, que camundongos da linhagem A/J são capazes de montar uma resposta inflamatória pulmonar que pode progredir da sensibilidade para a refratariedade a anti-inflamatórios esteroidais, dependendo do número de provocações inflamatórias a que é submetido. Ao submetermos os animais ao protocolo insensível (provocação com LPS por 3 dias consecutivos), observamos que se reproduziu nestes animais, um quadro de refratariedade, visto que neste cenário, o glicocorticoide foi ineficaz em inibir a hiper-reatividade e o acúmulo leucocitário neutrofílico induzidos por LPS. De maneira interessante, o tratamento oral com JME-209, na dose de 30 mg/Kg, inibiu significativamente a hiper-reatividade das vias aéreas, assim como também o influxo neutrofílico no espaço broncoalveolar. Evidências na literatura apontam a apoptose de neutrófilos como uma maneira eficaz de inibir a atividade destes leucócitos, o que consequentemente levaria ao bloqueio da liberação de proteases neutrofílicas que destroem o tecido epitelial e de mediadores quimiotáticos que induzem o recrutamento de leucócitos (173, 174). Estudos mostram a baixa atividade dos glicocorticoides sobre a função e ativação de neutrófilos, células de grande importância no contexto da DPOC. Dessa forma, alguns autores demonstram que agentes esteroidais inibem a apoptose de neutrófilos, com isso, prolongando a vida destes polimorfonucleares, o que poderia explicar, de certa forma, a ineficácia desses fármacos sobre a inflamação neutrofílica, a qual é presente na fisiopatologia da DPOC (175). Em conformidade com estes dados, Plumb e colaboradores mostraram que neutrófilos obtidos do parênquima pulmonar de portadores de DPOC apresentaram baixa expressão de receptores de glicocorticoides, se comparado a outras células inflamatórias como macrófagos e linfócitos. Segundo os autores, a baixa expressão de GRs em neutrófilos é também, um dos fatores

responsáveis pela ineficácia dos corticoides em controlar a inflamação em portadores de DPOC (176).

Para confirmarmos se os dados obtidos no modelo de inflamação pulmonar induzido por LPS teria aplicabilidade no contexto da DPOC, avaliamos a repercussão do tratamento com o análogo JME-209 em um modelo de lesão pulmonar induzida pela exposição à fumaça de cigarro. Estudos na literatura mostram que a exposição de fumaça de cigarro em camundongos C57BL/6 leva a uma resposta inflamatória que é caracterizada pelo influxo de macrófagos, neutrófilos e linfócitos no BAL, além do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e dano oxidativo no tecido pulmonar (40, 86, 177). Diante dessas informações, primeiramente avaliamos a atividade do análogo JME-209 nas doses de 30 e 60 mg/Kg sobre o acúmulo leucocitário induzido por fumaça de cigarro em camundongos C57BL/6.

Portadores de DPOC apresentam um infiltrado inflamatório pulmonar predominantemente de macrófagos e neutrófilos. Essas células, além de produzirem mediadores pró-inflamatórios, liberam proteases tóxicas capazes de danificar o parênquima pulmonar, culminando com o enfisema (23, 32, 33, 37, 53). Observamos em nosso estudo que o tratamento oral com o composto JME-209 foi capaz de inibir, de maneira dose-dependente, o influxo neutrofílico originado da exposição à fumaça de cigarro. Refletindo os dados anteriormente obtidos, o protótipo mexiletina não apresentou efeito sobre o número de leucócitos no BAL, enquanto que roflumilast, inibiu significativamente o número de neutrófilos no lavado. Apesar de mostrar-se eficaz em modelos experimentais e em estudos envolvendo pacientes portadores de DPOC (88, 89, 92), o uso do roflumilast para tal deve ser visto com bastante cautela. Isto se deve aos importantes efeitos colaterais característicos desse grupo de medicamentos, como alterações no sistema digestivo e nervoso (93). Evidências crescentes sugerem que anestésicos locais apresentam efeito protetor sobre a inflamação. Isto é confirmado por estudos como os de Nishina e colaboradores que demonstraram que o tratamento intravenoso com lidocaína foi capaz de reduzir o influxo de células polimorfonucleares no tecido pulmonar de coelhos submetidos a aspiração de ácido clorídrico (129). Da mesma forma, Miller e colaboradores demonstraram também, a atividade deste anestésico local sobre macrófagos alveolares, células centrais no contexto da DPOC (178).

Mediadores inflamatórios como as citocinas e quimiocinas têm sido descritas na literatura como fatores críticos no desenvolvimento e exacerbação da DPOC por estarem envolvidas em processos chaves como o recrutamento, ativação e sobrevivência de células inflamatórias através da interação com receptores presentes na membrana dessas células (3, 67, 70, 71). Nossos achados indicaram que o presente esquema de exposição de camundongos C57BL/6 à fumaça de cigarro foi capaz de levar ao aumento dos níveis de IL-1 β , MIP-1 α e KC no tecido pulmonar. A IL-1 β é uma das principais citocinas envolvidas na iniciação e persistência da inflamação. Estudos na literatura demonstram que esse mediador é um dos principais a se apresentarem aumentados no BAL e escarro induzido de portadores de DPOC, principalmente, durante exacerbações (67, 70). Ademais, macrófagos alveolares e monócitos circulantes obtidos de portadores da doença apresentam maior produção de IL-1 β em relação a fumantes não portadores da doença (38). KC, ou CXCL1, por sua vez, é uma quimiocina murina homóloga à IL-8 humana, e tem sido implicada em uma série de condições inflamatórias experimentais. Este mediador é relacionado principalmente a seu efeito direto sobre a quimiotaxia de neutrófilos pela ligação aos receptores CXCR1 e CXCR2 (179). Análises no BAL e escarro induzido de portadores de DPOC leve a moderada apresentaram altos níveis de IL-1 β e IL-8, sugerindo que a migração de neutrófilos da parede brônquica para o lúmen se encontra aumentada já em quadros iniciais da doença (180). Relatos na literatura indicam que o aumento dos níveis circulantes de IL-8 está diretamente relacionado com a fraqueza e perda de massa muscular encontradas em portadores de da doença em quadro grave (179). Em nossos estudos, o pré-tratamento com o inibidor de PDE4 roflumilast inibiu significativamente os níveis de IL-1 β e KC no tecido pulmonar de animais expostos à fumaça. Estes dados estão alinhados com os achados de Maiga e colaboradores e Milara e colaboradores, que demonstraram, respectivamente, que o tratamento com roflumilast inibiu os níveis de IL-1 β no tecido pulmonar de animais inoculados com *mycobacterium tuberculosis* e bloqueou a geração de IL-8 por células epiteliais brônquicas estimuladas com o agonista de TLR3, Poly I:C (181, 182). A MIP-1 α , por sua vez, é uma quimiocina produzida principalmente por macrófagos após um estímulo inflamatório. Este mediador é relacionado, principalmente, com seu potencial de ativar diversos granulócitos que consequentemente levam a iniciação da inflamação (3). Além destes efeitos, MIP-1 α

também possui potencial em induzir a liberação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α por fibroblastos e macrófagos (66, 70). O pré-tratamento com o protótipo mexiletina inibiu os níveis de MIP-1 α e KC no pulmão dos animais expostos à fumaça. Apesar do tratamento com o anestésico local ter resultado na inibição dos níveis de KC, citocina classicamente relacionada com o recrutamento de neutrófilos, este efeito não teve repercussão significativa no número de leucócitos obtidos do BAL. Este dado sugere que o acúmulo neutrofílico em nosso modelo não tem a citocina em questão como elemento chave para a neutrofilia observada no BAL. JME-209, por sua vez, resultou na inibição dos níveis de todas as citocinas avaliadas. Estudos na literatura demonstram a atividade de anestésicos locais como a lidocaína, mexiletina e ropivacaína no bloqueio da cascata inflamatória mediada por citocinas pró-inflamatórias (118). A inibição da produção de IL-1 β por anestésicos locais já foi descrita por Suzuki e colaboradores, demonstrando a ação da lidocaína sobre a redução de IL-1 β *in vitro*, dando suporte aos nossos achados (183). Os estudos de Nishina e colaboradores, por sua vez, mostraram a inibição dos níveis de IL-1 β e KC no tratamento intravenoso com lidocaína em modelo de inflamação pulmonar em coelhos, corroborando com nossos dados (129). De forma interessante, a redução dos níveis das citocinas avaliadas em nosso estudo pode estar diretamente associada a redução do número de leucócitos no BAL dos animais expostos à fumaça de cigarro.

A inalação de fumaça de cigarro expõe os pulmões a níveis significativos de agentes oxidantes. Os produtos decorrentes do aumento do dano oxidativo ativam mecanismos que levam à amplificação do quadro inflamatório das vias aéreas inferiores, destruição do parênquima pulmonar, e a resistência a glicocorticoides (41). O acúmulo de gorduras poli-insaturadas e ácidos graxos nas membranas celulares são importantes alvos de ataque para radicais livres, resultando na peroxidação lipídica, um processo que resulta na produção de peróxidos e aldeídos no tecido pulmonar. A exposição à fumaça de cigarro em nosso modelo, levou ao aumento significativo dos níveis de MDA, um subproduto da peroxidação lipídica. Nossos achados corroboram com outros trabalhos, demonstrando que a exposição à fumaça de curto prazo está associada com a inflamação pulmonar aguda e dano oxidativo (184). Os resultados mostram que somente o tratamento com JME-209 foi capaz de reduzir os níveis de MDA no tecido pulmonar. Estes dados são sustentados por estudos na literatura que

demonstram o potencial antioxidante de anestésicos locais como a lidocaína e mexiletina pela inibição da geração de radicais livres e de retardar a produção do ânion superóxido por neutrófilos ativados (129). Bellis e colaboradores mostraram em seus dados que a mexiletina e análogos do anestésico, apresentaram expressiva atividade antioxidante, inibindo a citotoxicidade pelo estímulo com H_2O_2 em células da musculatura esquelética (185). Ainda assim, Demirpençe e colaboradores relataram que a mexiletina foi capaz de inibir a peroxidação lipídica em membranas cerebrais estimuladas com o complexo ferro-ascorbato e H_2O_2 (186). Baseado em nossos dados, podemos indicar que as alterações estruturais realizadas no protótipo mexiletina resultou em uma atividade antioxidante otimizada no análogo estrutural JME-209.

Dessa forma, tomados em conjunto, esses dados sugerem fortemente que o análogo não anestésico de mexiletina JME-209 combina, de fato, propriedades broncodilatadoras, anti-inflamatórias e anti-oxidantes que o credenciam como legítimo candidato a controlar situações fisiopatológicas associadas a doenças pulmonares como a DPOC e outras.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados demonstram que o composto JME-209 é um análogo não-anestésico da mexiletina com notória atividade broncodilatadora, anti-inflamatória e antioxidante evidenciada por estudos *in vitro* e *in vivo*. O composto em questão apresentou efeito otimizado sobre a contração da musculatura lisa traqueal induzida por agente espasmogênico *in vitro* e sobre a broncoconstrição induzida por metacolina *in vivo*. Apresentou também, significativa atividade anti-espasmódica e anti-inflamatória no contexto da inflamação pulmonar, inibindo a broncoconstrição, hiper-reatividade brônquica e o acúmulo neutrofílico em camundongos provocados com LPS. Além de tais efeitos, mostrou-se também, eficaz em inibir alterações causadas pela provocação com LPS em um modelo de refratariedade a glicocorticoides, como a hiper-reatividade das vias aéreas e acúmulo neutrofílico. De maneira interessante, JME-209 apresentou atividade anti-inflamatória em modelo murino de inflamação pulmonar induzida por exposição à fumaça de cigarro, reduzindo o influxo leucocitário na luz das vias aéreas em um mecanismo que está associado ao bloqueio das citocinas pró-inflamatórias KC, MIP-1 α e IL-1 β . Ademais, o análogo estrutural apresentou também, expressiva atividade sobre o dano oxidativo, refletida pela redução dos níveis de malondialdeído no tecido pulmonar. Em suma, os dados sugerem fortemente que o análogo não anestésico da mexiletina, JME-209 possui características importantes que o podem credenciar como legítimo candidato para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares como a DPOC.

7 REFERÊNCIAS

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2018 Report.
2. Adeloje D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papana A, Theodoratou E, et al. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015;5(2):020415.
3. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):16-27.
4. Ministério da Saúde. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. 2013.
5. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, 2017: monitoring tobacco use and prevention policies. Geneva: World Health Organization. 2017:135.
6. Azambuja R, Bettencourt, M., Costa, H.C., Rufino, R. Panorama da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. *Síndromes Ventilatórias Obstrutivas*. 2013;12.
7. Rabahi FM. Epidemiologia da DPOC: Enfrentando Desafios. *PULMÃO RJ*. 2013;22(2):4-8.
8. Ministério da Saúde. Doenças Respiratórias Crônicas. *Cadernos de Atenção Básica*. 2012;25.
9. Instituto Nacional do Câncer I. Pesquisa especial de tabagismo – PETab: relatório Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Organização Pan-Americana de Saúde. 2011:199.
10. Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:57-71.
11. Benowitz NL. Nicotine addiction. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2295-303.
12. Barreiro E, Gea J. Respiratory and Limb Muscle Dysfunction in COPD. *COPD*. 2015;12(4):413-26.
13. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2014;35(1):71-86.

14. Adama Sana SMAS, Nicolas Meda, Catherine Bouland. Chronic obstructive pulmonary disease associated with biomass fuel use in women: a systematic review and meta-analysis. *BJM Open Respiratory Research*. 2017.
15. Gnatiuc L, Caramori G. COPD in nonsmokers: the biomass hypothesis--to be or not to be? *Eur Respir J*. 2014;44(1):8-10.
16. Perez-Padilla R, Ramirez-Venegas A, Sansores-Martinez R. Clinical Characteristics of Patients With Biomass Smoke-Associated COPD and Chronic Bronchitis, 2004-2014. *Chronic Obstr Pulm Dis*. 2014;1(1):23-32.
17. Ramirez-Venegas A, Velazquez-Uncal M, Perez-Hernandez R, Guzman-Bouilloud NE, Falfan-Valencia R, Mayar-Maya ME, et al. Prevalence of COPD and respiratory symptoms associated with biomass smoke exposure in a suburban area. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018;13:1727-34.
18. Hazari YM, Bashir A, Habib M, Bashir S, Habib H, Qasim MA, et al. Alpha-1-antitrypsin deficiency: Genetic variations, clinical manifestations and therapeutic interventions. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2017;773:14-25.
19. Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil Elastase Contributes to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *The American Journal of Pathology*. 2003;163(6):2329-35.
20. Antunes A, . M; Rocco, R, M, P. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2011;83:1385-95.
21. Postma DS, Reddel HK, ten Hacken NH, van den Berge M. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: similarities and differences. *Clin Chest Med*. 2014;35(1):143-56.
22. Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013;12(7):543-59.
23. Bourdin A, Burgel PR, Chanez P, Garcia G, Perez T, Roche N. Recent advances in COPD: pathophysiology, respiratory physiology and clinical aspects, including comorbidities. *Eur Respir Rev*. 2009;18(114):198-212.
24. Chatila WM, Thomashow BM, Minai OA, Criner GJ, Make BJ. Comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(4):549-55.

25. Agusti AG, Sauleda J, Miralles C, Gomez C, Togores B, Sala E, et al. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(4):485-9.
26. Sarkar M, Bhardwaj R, Madabhavi I, Khatana J. Osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med*. 2015;9:5-21.
27. Caughey GE, Preiss AK, Vitry AI, Gilbert AL, Roughead EE. Comorbid diabetes and COPD: impact of corticosteroid use on diabetes complications. *Diabetes Care*. 2013;36(10):3009-14.
28. Maclay JD, MacNee W. Cardiovascular disease in COPD: mechanisms. *Chest*. 2013;143(3):798-807.
29. Amatngalim GD, Hiemstra PS. Airway Epithelial Cell Function and Respiratory Host Defense in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin Med J (Engl)*. 2018;131(9):1099-107.
30. Anthony Tam SW, Delbert Dorscheid, S.F. Paul Man, Don D. Sin. The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Ther Adv Respir Dis*. 2011;5(4):255-73.
31. Geiger S, Hirsch D, Hermann FG. Cell therapy for lung disease. *Eur Respir Rev*. 2017;26(144).
32. Singh D. Small Airway Disease in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2017;80(4):317-24.
33. Shaykhiev R, Crystal RG. Early events in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Smoking-induced reprogramming of airway epithelial basal progenitor cells. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11 Suppl 5:S252-8.
34. Comer DM, Kidney JC, Ennis M, Elborn JS. Airway epithelial cell apoptosis and inflammation in COPD, smokers and nonsmokers. *Eur Respir J*. 2013;41(5):1058-67.
35. Henson PM, Vandivier RW, Douglas IS. Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(8):713-7.
36. Hiemstra PS. Altered macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10 Suppl:S180-5.
37. Vlahos R, Bozinovski S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Front Immunol*. 2014;5:435.

38. Dewhurst JA, Lea S, Hardaker E, Dungwa JV, Ravi AK, Singh D. Characterisation of lung macrophage subpopulations in COPD patients and controls. *Sci Rep*. 2017;7(1):7143.
39. Tetley TD. Macrophages and the Pathogenesis of COPD. *CHEST*. 2002;121(5).
40. Barroso MV, Cattani-Cavaliere I, de Brito-Gitirana L, Fautrel A, Lagente V, Schmidt M, et al. Propolis reversed cigarette smoke-induced emphysema through macrophage alternative activation independent of Nrf2. *Bioorg Med Chem*. 2017;25(20):5557-68.
41. Carlos SPd, Dias AS, Forgiarini Júnior LA, Patricio PD, Graciano T, Nesi RT, et al. Oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in mice: impact on lung tissue and diaphragm muscle. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2014;40(4):411-20.
42. Molet S, Belleguic C, Lena H, Germain N, Bertrand CP, Shapiro SD, et al. Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm Res*. 2005;54(1):31-6.
43. Churg A, Zhou S, Wright JL. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Respir J*. 2012;39(1):197-209.
44. Oliveira da Silva C, Monte-Alto-Costa A, Renovato-Martins M, Viana Nascimento FJ, Dos Santos Valenca S, Lagente V, et al. Time Course of the Phenotype of Blood and Bone Marrow Monocytes and Macrophages in the Lung after Cigarette Smoke Exposure In Vivo. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
45. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CM, Tudhope SJ, Wedzicha JA, et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J*. 2010;35(5):1039-47.
46. Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T, Reyes L, Booy C, Schimmer RC. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respir Res*. 2005;6:61.
47. Johansson A, Lundborg M, Sköld C.M., Lundahl J., Tornling G., Eklund A., & Camner P. Functional, morphological, and phenotypical differences between rat alveolar and interstitial macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1997;16(5):582-88.

48. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, et al. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*. 2013;39(3):599-610.
49. Sabatel C, Radermecker C, Fievez L, Paulissen G, Chakarov S, Fernandes C, et al. Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity*. 2017;46(3):457-73.
50. H. Kawano HK, T. Nakama, T. Hashimoto, E. Umemoto, K. Takeda. IL-10 producing lung interstitial macrophages prevents neutrophilic asthma. *International Immunology*. 2016;28(10):489-501.
51. Ferrari-Lacraz S NL, Chicheportiche R, Welgus HG & Dayer J-M. Human Lung Tissue Macrophages, but not Alveolar Macrophages, Express Matrix Metalloproteinases after Direct Contact with Activated T Lymphocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2001;24(4):442-51.
52. Gernez Y, Tirouvanziam R, Chanez P. Neutrophils in chronic inflammatory airway diseases: can we target them and how? *European Respiratory Journal*. 2010;35(3):467-9.
53. Hoenderdos K, Condliffe A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(5):531-9.
54. Singh D. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Neutrophils and Bacterial Infection: A Complex Web Involving IL-17 and IL-22 Unravels. *EBioMedicine*. 2015;2(1):1580-81.
55. Chapman RW, Minnicozzi M, Celly CS, Phillips JE, Kung TT, Hipkin RW, et al. A novel, orally active CXCR1/2 receptor antagonist, Sch527123, inhibits neutrophil recruitment, mucus production, and goblet cell hyperplasia in animal models of pulmonary inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(2):486-93.
56. Rennard SI, Dale DC, Donohue JF, Kanniss F, Magnussen H, Sutherland ER, et al. CXCR2 Antagonist MK-7123. A Phase 2 Proof-of-Concept Trial for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(9):1001-11.
57. Ekberg-Jansson A, Andersson B, Bake B, Boijesen M, Enander I, Rosengren A, et al. Neutrophil-associated activation markers in healthy smokers relates to a fall in DL(CO) and to emphysematous changes on high resolution CT. *Respir Med*. 2001;95(5):363-73.

58. Spond J, Billah MM, Chapman RW, Egan RW, Hey JA, House A, et al. The role of neutrophils in LPS-induced changes in pulmonary function in conscious rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 2004;17(3):133-40.
59. Kubo S, Kobayashi M, Iwata M, Miyata K, Takahashi K, Shimizu Y. Anti-neutrophilic inflammatory activity of ASP3258, a novel phosphodiesterase type 4 inhibitor. *Int Immunopharmacol.* 2012;12(1):59-63.
60. Bazett M, Biala A, Huff RD, Zeglinski MR, Hansbro PM, Bosiljic M, et al. Attenuating immune pathology using a microbial-based intervention in a mouse model of cigarette smoke-induced lung inflammation. *Respir Res.* 2017;18(1):92.
61. Baraldo SO, L, K.; Turato, G.; Zuin, R.; Saetta M,. The Role of Lymphocytes in the Pathogenesis of Asthma and COPD *Current Medicinal Chemistry.* 2007;14:2250-6.
62. Leckie MJ, Jenkins, G.R., Khan, J., Smith, S.J., Walker, C., Barnes, P.J., Hansel, T.T. Sputum T lymphocytes in asthma, COPD and healthy subjects have the phenotype of activated intraepithelial T cells (CD69+ CD103+). *THORAX.* 2002;58(2):23-9.
63. Wilkinson TMA. Immune checkpoints in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Rev.* 2017;26(144).
64. Ratamales IEW, M; Meshi, B; Coxson, H, O; et al. Amplification of Inflammation in Emphysema and its Association with Latent Adenoviral Infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:469-73.
65. Pinho-Ribeiro V, Melo AC, Kennedy-Feitosa E, Graca-Reis A, Barroso MV, Cattani-Cavaliere I, et al. Atorvastatin and Simvastatin Promoted Mouse Lung Repair After Cigarette Smoke-Induced Emphysema. *Inflammation.* 2017;40(3):965-79.
66. Costa H, C.; Rufino, R.; Lapa S, R, J.; Células Inflamatórias e Seus Mediadores na Patogênese da DPOC. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 2009;55(3):347-54.
67. Zou Y, Chen X, Liu J, Zhou DB, Kuang X, Xiao J, et al. Serum IL-1beta and IL-17 levels in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2017;12:1247-54.
68. Haw TJ, Starkey MR, Pavlidis S, Fricker M, Arthurs AL, Nair PM, et al. Toll-like receptor 2 and 4 have opposing roles in the pathogenesis of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018;314(2):L298-L317.

69. Cazzola M, Gabriella Matera M. The additive effect of theophylline on a combination of formoterol and tiotropium in stable COPD: a pilot study. *Respir Med.* 2007;101(5):957-62.
70. Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(4):311-8.
71. Di Stefano A, Coccini T, Roda E, Signorini C, Balbi B, Brunetti G, et al. Blood MCP-1 levels are increased in chronic obstructive pulmonary disease patients with prevalent emphysema. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018;13:1691-700.
72. Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. *Chest.* 2013;144(1):266-73.
73. Birden E, Sahiner, M.U., Sackensen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal.* 2012;5:9-19.
74. McGuinness AJ, Sapey E. Oxidative Stress in COPD: Sources, Markers, and Potential Mechanisms. *J Clin Med.* 2017;6(2).
75. Laurell CBE, S. The Electrophoretic α 1-Globulin Pattern of Serum in α 1-Antitrypsin Deficiency. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.* 1963;15:132-40.
76. Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, Babyak MA, Kaschak M. Experimental Emphysema. *Archives of Environmental Health: An International Journal.* 1965;11(1):50-8.
77. Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(7):543-59.
78. Cazzola M, Page CP, Calzetta L, Matera MG. Pharmacology and therapeutics of bronchodilators. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):450-504.
79. Salpeter SR. Bronchodilators in COPD: Impact of β -agonists and anticholinergics on severe exacerbations. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* 2007;2(1):11-8.
80. Billington CK, Penn RB, Hall IP. beta2 Agonists. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;237:23-40.
81. Rosenberg SR, Kalhan R. Recent advances in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *F1000Res.* 2017;6:863.

82. Cazzola M, Page C. Long-acting bronchodilators in COPD: where are we now and where are we going? *Breathe*. 2014;10(2):110-20.
83. Maia IS, Pincelli MP, Leite VF, Amadera J, Buehler AM. Long-acting muscarinic antagonists vs. long-acting beta 2 agonists in COPD exacerbations: a systematic review and meta-analysis. *J Bras Pneumol*. 2017;43(4):302-12.
84. Barnes PJ. The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease. *The American Journal of Medicine Supplements*. 2004;117(12):24-32.
85. Scullion JE. The development of anticholinergics in the management of COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2007;2(1):33-40.
86. Wollin L, Pieper MP. Tiotropium bromide exerts anti-inflammatory activity in a cigarette smoke mouse model of COPD. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010;23(4):345-54.
87. Michalski JM, Golden G, Ikari J, Rennard SI. PDE4: a novel target in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;91(1):134-42.
88. Mulhall AM, Droege CA, Ernst NE, Panos RJ, Zafar MA. Phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a review of current and developing drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(12):1597-611.
89. Fan Chung K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1-3):110-7.
90. Park JW, Ryter SW, Kyung SY, Lee SP, Jeong SH. The phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast protects against cigarette smoke extract-induced apoptosis in human lung fibroblasts. *Eur J Pharmacol*. 2013;706(1-3):76-83.
91. Grundy S, Plumb J, Kaur M, Ray D, Singh D. Additive anti-inflammatory effects of corticosteroids and phosphodiesterase-4 inhibitors in COPD CD8 cells. *Respir Res*. 2016;17:9.
92. Kawamatawong T. Roles of roflumilast, a selective phosphodiesterase 4 inhibitor, in airway diseases. *J Thorac Dis*. 2017;9(4):1144-54.
93. Spina D. PDE4 inhibitors: current status. *Br J Pharmacol*. 2008;155(3):308-15.
94. WANG d, Xiangli, C. Evaluation of PDE4 inhibition for COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2006;1(4):373-79.

95. Martorana PA, Lunghi B, Lucattelli M, De Cunto G, Beume R, Lungarella G. Effect of roflumilast on inflammatory cells in the lungs of cigarette smoke-exposed mice. *BMC Pulm Med.* 2008;8:17.
96. Martorana PA, Beume R, Lucattelli M, Wollin L, Lungarella G. Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(7):848-53.
97. Cortijo J, Iranzo A, Milara X, Mata M, Cerda-Nicolas M, Ruiz-Sauri A, et al. Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury. *Br J Pharmacol.* 2009;156(3):534-44.
98. Kwatra G, Mukhopadhyay S. Topical Corticosteroids: Pharmacology. 2018:11-22.
99. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):233-47.
100. Falk JA, Minai OA, Mosenifar Z. Inhaled and systemic corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(4):506-12.
101. Ernst P, Saad N, Suissa S. Inhaled corticosteroids in COPD: the clinical evidence. *Eur Respir J.* 2015;45(2):525-37.
102. Park HY, Man SF, Sin DD. Inhaled corticosteroids for chronic obstructive pulmonary disease. *BMJ.* 2012;345:e6843.
103. Adcock IM, Ito Kazuhiro. Glucocorticoid Pathways in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Therapy. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2.
104. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016;42(1):15-31, vii.
105. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science.* 1998;94(557-72).
106. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(3):636-45.
107. van Rossum EF, Lamberts SW. Glucocorticoid resistance syndrome: A diagnostic and therapeutic approach. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006;20(4):611-26.
108. Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Chrousos GP. Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1563-72.

109. Rodriguez JM, Monsalves-Alvarez M, Henriquez S, Llanos MN, Troncoso R. Glucocorticoid resistance in chronic diseases. *Steroids*. 2016;115:182-92.
110. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in airway disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):264-8.
111. Hoonhorst SJ, ten Hacken NH, Vonk JM, Timens W, Hiemstra PS, Lapperre TS, et al. Steroid resistance in COPD? Overlap and differential anti-inflammatory effects in smokers and ex-smokers. *PLoS One*. 2014;9(2):e87443.
112. Hodge G, Roscioli E, Jersmann H, Tran HB, Holmes M, Reynolds PN, et al. Steroid resistance in COPD is associated with impaired molecular chaperone Hsp90 expression by pro-inflammatory lymphocytes. *Respir Res*. 2016;17(1):135.
113. Wang DXWJ, L. Feng X. Xiaoying, L. Meijin, M. The Effect of Lidocaine on Early Postoperative Cognitive Dysfunction After Coronary Artery Bypass Surgery. *Anesth Analg*. 2002;95(5):1134-41.
114. Pelz K, Wiedmann-Al-Ahmad M, Bogdan C, Otten JE. Analysis of the antimicrobial activity of local anaesthetics used for dental analgesia. *J Med Microbiol*. 2008;57(Pt 1):88-94.
115. Sakaguchi M, Kuroda Y, Hirose M. The antiproliferative effect of lidocaine on human tongue cancer cells with inhibition of the activity of epidermal growth factor receptor. *Anesth Analg*. 2006;102(4):1103-7.
116. Jurj A, Tomuleasa C, Tat TT, Berindan-Neagoe I, Vesa SV, Ionescu DC. Antiproliferative and Apoptotic Effects of Lidocaine on Human Hepatocarcinoma Cells. A preliminary study. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2017;26(1):45-50.
117. Gray A, Marrero-Berrios I, Weinberg J, Manchikalapati D, SchianodiCola J, Schloss RS, et al. The effect of local anesthetic on pro-inflammatory macrophage modulation by mesenchymal stromal cells. *Int Immunopharmacol*. 2016;33:48-54.
118. Piegeler T, Votta-Velis EG, Bakhshi FR, Mao M, Carnegie G, Bonini MG, et al. Endothelial barrier protection by local anesthetics: ropivacaine and lidocaine block tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell Src activation. *Anesthesiology*. 2014;120(6):1414-28.
119. Wang L, Wang M, Li S, Wu H, Shen Q, Zhang S, et al. Nebulized lidocaine ameliorates allergic airway inflammation via downregulation of TLR2. *Mol Immunol*. 2018;97:94-100.

120. Hollmann MW DM. Local anesthetics and the inflammatory response: A new therapeutic indication ? . *Anesthesiology*. 2000;93(3):858-75.
121. Eipe. N. GS, Penning J. Intravenous lidocaine for acute pain: an evidence-based clinical update. *BJA Education*. 2016;16(9):292-8.
122. Maiara Ferreira de Souza DCK. The analgesic effect of intravenous lidocaine in the treatment of chronic pain: a literature review. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2014;54(5):386-92.
123. Gray A, Marrero-Berrios I, Ghodbane M, Maguire T, Weinberg J, Manchikalapati D, et al. Effect of Local Anesthetics on Human Mesenchymal Stromal Cell Secretion. *Nano Life*. 2015;5(2):1550001-14.
124. Hunt LW, Frigas E, Butterfield JH, Kita H, Blomgren J, Dunnette SL, et al. Treatment of asthma with nebulized lidocaine: a randomized, placebo-controlled study. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(5):853-9.
125. Scholz A KN, Hempelmann G, Vogel W. Complex blockade of TTX-resistant Na⁺ currents by lidocaine and bupivacaine reduce firing frequency in DRG neurons. *J Neurophysiol*. 1998;79(4):1746-54.
126. Hollman MW FL, Byford AM, Durieux ME. Local anesthetic inhibition of m1 muscarinic acetylcholine signaling. *Anesthesiology*. 2000;93(2):479-509.
127. Hattori M DS, Nozaki M, Niwa M, Shimonaka H. The inhibitory effects of local anesthetics on superoxide generation of neutrophils correlate with their partition coefficients. *Anesth Analg*. 1997;84(2):405-12.
128. Hollmann MDMarkus W GA, Jelacin N, Durieux MDPDMarcel E. Local Anesthetic Effects on Priming and Activation of Human Neutrophils. *Anesthesiology*. 2001;95(1):113-22.
129. Nishina K MK, Takao Y, Shiga M, Maekawa N, Obara H. Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology*. 1998;88(5):1300-9

130. Hakansson HF, Smailagic A, Brunmark C, Miller-Larsson A, Lal H. Altered lung function relates to inflammation in an acute LPS mouse model. *Pulm Pharmacol Ther.* 2012;25(5):399-406.
131. Sinclair R EA, Gretzer C, Cassuto J, Thomsen P. Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB4 release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 1993;37(2):159-65.
132. Van Der Wal S, Vaneker M, Steegers M, Van Berkum B, Kox M, Van Der Laak J, et al. Lidocaine increases the anti-inflammatory cytokine IL-10 following mechanical ventilation in healthy mice. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2015;59(1):47-55.
133. Tanaka A, Minoguchi K, Oda N, Yokoe T, Matsuo H, Okada S, et al. Inhibitory effect of lidocaine on T cells from patients with allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2002;109(3):485-90.
134. Olsen PC, Martins, M. A. Medicação anti-inflamatória alternativa aos glicocorticóides para o tratamento da asma: papel dos modificadores de leucotrienos, estabilizadores de mastócitos e outras perspectivas. *Pulmão RJ.* 2012;21(2):65-9.
135. Burches BR, Jr., Warner DO. Bronchospasm after intravenous lidocaine. *Anesth Analg.* 2008;107(4):1260-2.
136. da Costa JC, Olsen PC, de Azeredo Siqueira R, de Frias Carvalho V, Serra MF, Alves LA, et al. JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(1):219-25.
137. Olsen PC, Coelho LP, da Costa JC, Cordeiro RS, Silva PM, Martins MA. Two for one: cyclic AMP mediates the anti-inflammatory and anti-spasmodic properties of the non-anesthetic lidocaine analog JMF2-1. *Eur J Pharmacol.* 2012;680(1-3):102-7.
138. Costa JC, Neves JS, de Souza MV, Siqueira RA, Romeiro NC, Boechat N, et al. Synthesis and antispasmodic activity of lidocaine derivatives endowed with reduced local anesthetic action. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(3):1162-6.
139. Olsen PC, Ferreira TP, Serra MF, Farias-Filho FA, Fonseca BP, Viola JP, et al. Lidocaine-derivative JMF2-1 prevents ovalbumin-induced airway inflammation by regulating the function and survival of T cells. *Clin Exp Allergy.* 2011;41(2):250-9.
140. Serra MF, Neves JS, Couto GC, Cotias AC, Pao CR, Olsen PC, et al. JM25-1, a Lidocaine Analog Combining Airway Relaxant and Antiinflammatory Properties: Implications for New Bronchospasm Therapy. *Anesthesiology.* 2016;124(1):109-20.

141. Jarvis B, Coukell, AJ. Mexiletine. *Drugs*. 1998;56(4):691-707.
142. Marmura MJ, Passero FC, Jr., Young WB. Mexiletine for refractory chronic daily headache: a report of nine cases. *Headache*. 2008;48(10):1506-10.
143. Roselli M, Carocci A, Budriesi R, Micucci M, Toma M, Di Cesare Mannelli L, et al. Synthesis, antiarrhythmic activity, and toxicological evaluation of mexiletine analogues. *Eur J Med Chem*. 2016;121:300-7.
144. Groeben H, Foster, M.W., Brown, H. R. Intravenous Lidocaine and Oral Mexiletine Block Reflex Bronchoconstriction in Asthmatic Subjects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1996;154:885-88.
145. Jon P. Monk RNB. Mexiletine. *Drugs*. 1990;40(3):374-411.
146. Hamelmann. E. SJT, Oshiba. A., Larsen. G.L., Irvin. C. G. Noninvasive Measurement of Airway Responsiveness in Allergic Mice Using Barometric Plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:766-75.
147. Barnes PJ, Stockley RA. COPD: current therapeutic interventions and future approaches. *Eur Respir J*. 2005;25(6):1084-106.
148. Ishibashi M, Yamazaki, Y., Miledi, R., Sumikawa, K. Nicotinic and muscarinic agonists and acetylcholinesterase inhibitors stimulate a common pathway to enhance GluN2B-NMDAR responses. *PNAS*. 2014;111(34):12539-43.
149. Coburn RF, Baron, C.B. Coupling mechanisms in airway smooth muscle. *American Physiological Society*. 1990;2:119-33.
150. Chand N, Dhawan, B.N., Simal, R.C., Rahmani, N. H., Shukla, R. K., & Altura, B.M. Reactivity of trachea, bronchi, and lung strips to histamine and carbachol in rhesus monkeys *Journal of Applied Physiology*. 1980;49(4):729-34.
151. Barrio J, Cortijo, J., Milara, J., Mata, M., Guijarro, R., Blasco, P., & Morcillo, E.J. In vitro tracheal hyperresponsiveness to muscarinic receptor stimulation by carbachol in a rat model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*. 2006;26(3):327-33.
152. Cozzi E, Ackerman KG, Lundquist A, Drazen JM, Boyce JA, Beier DR. The naive airway hyperresponsiveness of the A/J mouse is Kit-mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(31):12787-92.
153. Wedzicha JA, Calverley PM, Seemungal TA, Hagan G, Ansari Z, Stockley RA, et al. The prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations by

- salmeterol/fluticasone propionate or tiotropium bromide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(1):19-26.
154. Calverley MAP AJ, Bartolome Celli MA, Ferguson GT, Jenkins C, Jones WP, Yates JC, Vestbo J. Salmeterol and Fluticasone Propionate and Survival in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The New England Journal of Medicine.* 2007;356(8).
155. Guhan AR CS, Osborne J, Lewis S, Bennett J, Tattersfield AE. Systemic effects of formoterol and salmeterol: a dose-response comparison in healthy subjects. *Thorax.* 2000;55:650-56.
156. Ono K KT, Arita M. Comparison of the inhibitory effects of mexiletine and lidocaine on the calcium current of single ventricular cells. *Life Sciences.* 1986;39:1465-70.
157. Yunoki M, Nakahara T, Mitani A, Maruko T, Kubota Y, Sakamoto K, et al. Lidocaine attenuates muscarinic receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in airway smooth muscle. *European Journal of Pharmacology.* 2003;470(1-2):65-71.
158. Kai T NJ, Kobayashi S, Takahashi S, Yoshitake J, Kanaide H. Effects of Lidocaine on Intracellular Ca²⁺ and tension in airway smooth muscle. *Anesthesiology.* 1993;78(954-65).
159. D'Almeida APL, Pacheco de Oliveira MT, de Souza ET, de Sa Coutinho D, Ciambarella BT, Gomes CR, et al. alpha-bisabolol-loaded lipid-core nanocapsules reduce lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:4479-91.
160. Eutamene H, Theodorou V, Schmidlin F, Tondereau V, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, et al. LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK. *Eur Respir J.* 2005;25(5):789-96.
161. Kwak HJ, Song JS, Heo JY, Yang SD, Nam JY, Cheon HG. Roflumilast inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators via suppression of nuclear factor-kappaB, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(3):1188-95.
162. Liu F, Li W, Pauluhn J, Trubel H, Wang C. Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats: comparative assessment of intratracheal instillation and aerosol inhalation. *Toxicology.* 2013;304:158-66.

163. Lefort J ML, Vargaftig B. Administration of Escherichia coli Endotoxin to Mice Induces Glucocorticosteroid-Resistant Bronchoconstriction and Vasopermeation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;24:345-51.
164. Knapp S. LPS and bacterial lung inflammation models. *Drug Discovery Today: Disease Models.* 2009;6(4):113-8.
165. Korkmaz B, Jenne DE, Gauthier F. Relevance of the mouse model as a therapeutic approach for neutrophil proteinase 3-associated human diseases. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(4):1198-205.
166. Mikawa K MN, Kahoru N, Takao Y, Yaku H, Obara H. Effect of lidocaine pretreatment on endotoxin-induced lung injury in rabbits. *Anesthesiology.* 1994;81(3):689-99.
167. Paróczai M, Röth, E., & Kárpáti, E. Bisaramil and Antiarrhythmics as inhibitors of free radical generation. *Pharmacological Research.* 1997;35(4):279-85.
168. Schmidt W, Schmidt, H., Bauer H, Gebhard, M. M., Martin, E. Influence of Lidocaine on Endotoxin-induced Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion and Macromolecular Leakage in Vivo. *Anesthesiology.* 1997;87:617-24.
169. Ronchetti S, Migliorati G, Bruscoli S, Riccardi C. Defining the role of glucocorticoids in inflammation. *Clin Sci (Lond).* 2018;132(14):1529-43.
170. Serra MF, Cotias AC, Pao CRR, Daleprane JB, Jurgilas PB, Couto GC, et al. Repeated Allergen Exposure in A/J Mice Causes Steroid-Insensitive Asthma via a Defect in Glucocorticoid Receptor Bioavailability. *J Immunol.* 2018;201(3):851-60.
171. Ueda K, Nishimoto Y, Kimura G, Masuko T, Barnes PJ, Ito K, et al. Repeated lipopolysaccharide exposure causes corticosteroid insensitive airway inflammation via activation of phosphoinositide-3-kinase delta pathway. *Biochem Biophys Rep.* 2016;7:367-73.
172. Kimura G, Ueda K, Eto S, Watanabe Y, Masuko T, Kusama T, et al. Toll-like receptor 3 stimulation causes corticosteroid-refractory airway neutrophilia and hyperresponsiveness in mice. *Chest.* 2013;144(1):99-105.
173. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun.* 2010;2(3):216-27.

174. McCracken JM, Allen LA. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death*. 2014;7:15-23.
175. Liles CW, Dale, D.C., Klebanoff, J. Glucocorticoids Inhibit Apoptosis of Human Neutrophils. *Blood*. 1995;86(8):3181-8.
176. Plumb J, Gaffey K, Kane B, Malia-Milanes B, Shah R, Bentley A, et al. Reduced glucocorticoid receptor expression and function in airway neutrophils. *Int Immunopharmacol*. 2012;12(1):26-33.
177. D'Hulst A I, Vermaelen KY, Brusselle GG, Joos GF, Pauwels RA. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J*. 2005;26(2):204-13.
178. Miller KaF, John R. Evidence of transient effect by lidocaine on alveolar macrophage morphology. *Journal of Immunological Methods*. 1981;43:163-8.
179. Blidberg K, Palmberg L, Dahlen B, Lantz AS, Larsson K. Increased neutrophil migration in smokers with or without chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2012;17(5):854-60.
180. Stefano DA, Capelli, A., Donner F.C. Role of Interleukin-8 in the Pathogenesis and Treatment of COPD. *Chest*. 2004;126(3):676-8.
181. Maiga MC, Ahidjo BA, Maiga M, Bishai WR. Roflumilast, a Type 4 Phosphodiesterase Inhibitor, Shows Promising Adjunctive, Host-Directed Therapeutic Activity in a Mouse Model of Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7888-90.
182. Milara J, Morell A, Ballester B, Sanz C, Freire J, Qian X, et al. Roflumilast improves corticosteroid resistance COPD bronchial epithelial cells stimulated with toll like receptor 3 agonist. *Respir Res*. 2015;16:12.
183. Suzuki N, Hasegawa-Moriyama M, Takahashi Y, Kamikubo Y, Sakurai T, Inada E. Lidocaine Attenuates the Development of Diabetic-Induced Tactile Allodynia by Inhibiting Microglial Activation. *Anesthesia & Analgesia*. 2011;113(4):941-6.
184. Lanzetti M, Barroso MV, Nesi RT, Lopes AA, Trajano ETL, Alves JN, et al. Ready-to-drink matte® tea shows anti-inflammatory and antioxidant properties on a cigarette smoke exposure model. *Food Research International*. 2012;48(2):798-801.
185. De Bellis M, Sanarica F, Carocci A, Lentini G, Pierno S, Rolland JF, et al. Dual Action of Mexiletine and Its Pyrroline Derivatives as Skeletal Muscle Sodium Channel

Blockers and Anti-oxidant Compounds: Toward Novel Therapeutic Potential. *Front Pharmacol.* 2017;8:907.

186. Demirpençe E, Caner H., Bavbek M., Kiliç, K. Antioxidant Action of the Antiarrhythmic Drug Mexiletine in Brain Membranes. *Jpn J Pharmacology.* 1999;81:7-11.