



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA E QUÍMICA MEDICINAL

**ESTUDO PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS SULFONAMÍDICOS
E SULFONILIDRAZÔNICOS EFICAZES NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO
PULMONAR CAUSADA POR LPS E SÍLICA EM CAMUNDONGOS**

ÉVERTON TENÓRIO DE SOUZA

2015

Éverton Tenório de Souza

**ESTUDO PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS SULFONAMÍDICOS
E SULFONILIDRAZÔNICOS EFICAZES NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO
PULMONAR CAUSADA POR LPS E SÍLICA EM CAMUNDONGOS**



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadores: Prof^a. Dr^a Patrícia Machado Rodrigues e Silva
Prof^a. Dr^a Lídia Moreira Lima

Rio de Janeiro
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Everton Tenório de

Estudo para identificação de novos compostos sulfonamídicos e sulfonilidrazônicos eficazes no controle da inflamação pulmonar causada por LPS e sílica em camundongos / Everton Tenório de Souza. – Rio de Janeiro: UFRJ. ICB – PPGFQM, 2015.

iv, 112p

Orientadora: Dr^a Patrícia Machado Rodrigues e Silva

Tese (Doutorado). UFRJ. ICB. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. 2015

Referências Bibliográficas: 89p

1. Pulmão 2. Inflamação 3. Fibrose 4. PDE-4 5. Terapia. I Silva, Patrícia Machado Rodrigues. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título

“Estudo para Identificação de Novos Compostos Sulfonamídicos e Sulfonilidrazônicos Eficazes no Controle da Inflamação Pulmonar Causada por LPS e Sílica em Camundongos”

Éverton Tenório de Souza

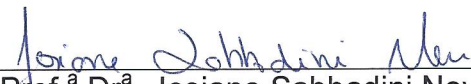
Orientadoras:

Prof.^a Dr.^a Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

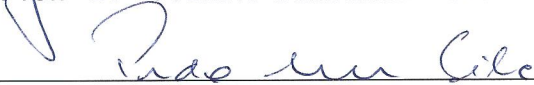
Prof.^a Dr.^a Lidia Moreira Lima

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Farmacologia e Química Medicinal).

Aprovada por:



Prof.^a Dr.^a Josiane Sabbadini Neves



Prof. Dr. Pedro Leme Silva



Prof.^a Dr.^a Adriana Ribeiro Silva



Prof.^a Dr.^a Patrícia Dias Fernandes (revisora)



Prof. Dr. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins (orientadora)

Rio de Janeiro
14 de abril de 2015

*Aos meus PAIS, **Gleice** e **Valter**, e aos meus amados irmãos, Emmerson e Hermanne, que sempre me amaram, incentivaram e proporcionaram, mesmo na ausência do dia-a-dia, tranqüilidade e equilíbrio emocional para que eu pudesse lutar pelos meus ideais com dignidade.*

Não existem palavras para expressar todo o meu amor e minha admiração.

*Que muitas vezes fizeram de suas vidas a minha vida! A eles o meu eterno
AMOR e gratidão!*

AGRADECIMENTOS

À minha família, que mesmo distante sempre esteve presente, me apoiando e incentivando;

À minha orientadora, Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva, por aceitar me orientar, que na sua generosidade concedeu-me a oportunidade de fazer ciência. Pelos ensinamentos, preocupação, confiança, dedicação e críticas construtivas que me fizeram crescer pessoalmente e cientificamente. Tenho plena certeza que todas as oportunidades a mim concedidas jamais serão esquecidas e o aprendizado colhido, será utilizado por toda minha vida;

À minha co-orientadora, Dra. Lídia Moreira Lima, pelo apoio e contribuição para meu crescimento intelectual e científico. Será sempre um exemplo de dedicação à atividade profissional! Pela atenção e ensinamentos no meu dia-a-dia que conduziram o trabalho de maneira sensata e responsável. Agradeço por ter sido a ponte para que eu pudesse ingressar no doutorado. Muito Obrigado!

Ao chefe do laboratório, Dr. Marco Aurélio Martins, pelo exemplo de pesquisador e respeito pela pesquisa. Que honra poder fazer parte de seu grupo, pelas inúmeras conversas e trocas de ideias nos experimentos;

Ao Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro, pela sabedoria, por ser um exemplo de como se fazer pesquisa e pela dedicação a Ciência;

À minha amiga Isabelle Karinne da Costa Nunes pela colaboração com a síntese das substâncias no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®), tornando possível a realização da minha tese e pelo apoio e discussão em vários momentos;

Ao Dr. Vinicius de Frias Carvalho, por ser paciente e pela ajuda constante principalmente com sistema de quantificação da atividade das enzimas PDEs;

À minha orientadora do mestrado, Magna Suzana Alexandre Moreira, por todos os ensinamentos e por ter apresentado a minha co-orientadora, por acreditar em mim e sempre me guiar nas melhores escolhas, além de estar sempre preocupada com meu crescimento pessoal e profissional. Sou eternamente grato por tudo!

Às minhas amigas e irmãs, Katharinne Ingrid de Carvalho e Ana Paula D'Almeida, por cada gesto, palavra de carinho, amor, apoio, lealdade, confiança, otimismo, cuidado, por estarem sempre presente e disponíveis nos melhores momentos da minha vida e até mesmo pelas lágrimas compartilhadas durante este período. Tudo isso foi importante para fazer de cada obstáculo um aprendizado. Vocês me fazem cada dia melhor e sou eternamente grato por fazerem parte da minha vida. Obrigado por fazer com que a saudade de casa não seja tão grande!

Aos meus amigos/irmãos Amanda Matos, Phillipe Barreto, Evandro Lira, Aline Cavalcanti, Diogo José, Yolanda Karla, Viviane Valente, Marina Conceição, Luan Santos, Thauan Santos, Maria Talita, Edson e Guilherme Carneiro pelo amor e incentivo todos esses anos;

A Bianca Torres Ciambarella, por toda força e atenção, pela amizade construída, pela grande ajuda na execução dos experimentos *in vitro*. Muito Obrigado por todos os momentos que passamos juntos e ainda vamos passar. Não tenho como agradecer sua generosidade e palavras de apoio sempre que precisei.

Um enorme agradecimento a Osirene Loureiro (Dadá) por todo apoio e assistência, por estar sempre pronta a ajudar;

À Ana Lucia de Aguiar Pires e a Nathália Andrade, pela grande ajuda no ELISA. Vocês foram peças fundamentais nesse trabalho;

À Dra. Edna Valotta pela agradável e confiável amizade.

À todos os integrantes e aos que passaram pelo Laboratório de Inflamação/IOC, em especial, Andressa Bernardi, Tatiana Paula Ferreira, Roberta Bortolini, Ana Carolina Arantes, Rodrigo Bandeira de Azevedo, Antônio, Andrey Moreira Fernandes, Carolina

Azevedo, Camila Pão, Amanda Cotias e a todos que não citei, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta tese;

À minha mãe por ser peça fundamental na minha vida, por ser meu exemplo, por me ensinar a ser cada dia melhor, por estar sempre presente;

Ao meu pai pelo grande exemplo de caráter, responsabilidade e perseverança;

Às minhas cunhadas Ligia e Gil por todo apoio e torcida em todas as etapas da minha vida... Sei que sempre torceram por mim... e claro, ao meu sobrinho e minhas sobrinhas/afilhadas, Gabriel, Letícia e Cecília, por todos os momentos de alegria e descontração.. AMO VOCÊS TODOS!!!.

Aos meus tios Vandeval e Aparecida por me receberem em sua casa antes de ter um abrigo assim que cheguei ao Rio de Janeiro. Não tenho palavras para expressar o amor e admiração que tenho por vocês.

À todos da família Valente, em especial Aline, Cristiane, Paula, que me acolheram nessa cidade maravilhosa e cuidaram de mim como se fosse parte da família;

Aos poucos e grandes amigos que fiz no Rio de Janeiro, sem precisar citar nomes, pois cada um sabe seu valor na minha vida. Obrigado por tudo!

À equipe do biotério do Pavilhão Osório de Almeida, pelo cuidado constante com os animais, sem a ajuda de vocês não seria possível realizar este trabalho;

À todos os professores da Pós-Graduação, pela grandiosa contribuição na minha formação acadêmica;

À todos os meus amigos de Igaci que sempre torceram pelo meu sucesso... Muito obrigado por cada palavra...

Ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas (UFRJ).

À banca examinadora por aceitar o convite.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ. Colocaria por extenso!

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho e, também, àqueles que passaram de alguma forma por minha vida durante o período do doutoramento.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

ESTUDO PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS SULFONAMÍDICOS E SULFONILIDRAZÔNICOS EFICAZES NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO PULMONAR CAUSADA POR LPS E SÍLICA EM CAMUNDONGOS

Everton Tenório de Souza

Orientadora: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

Co-orientadora: Dra. Lídia Moreira Lima

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

A enzima fosfodiesterase (PDE) tipo 4 tem sido considerada um importante alvo terapêutico para doenças inflamatórias pulmonares. O planejamento, síntese e avaliação do perfil anti-PDE4 de uma série de derivados sulfonamídicos identificou um inibidor seletivo de PDE4, LASSBio-448, com potência e índice terapêutico superiores ao composto referência (R,S)-rolipram, que apresentou atividade antisilicótica, sendo considerado como um potencial protótipo candidato a fármaco anti-inflamatório/antifibrótico. A busca por novos compostos-protótipos é fundamental, e implica no desenvolvimento de etapas posteriores de otimização estrutural que compreendem o desenho estrutural, síntese de novas séries e avaliação do perfil farmacológico comparativo ao protótipo inicial. Neste estudo, objetivamos caracterizar farmacologicamente novos protótipos sulfonamídicos análogos do LASSBio-448 utilizando sistemas *in vitro* e *in vivo*. Os compostos referência rolipram e cilomilaste foram usados para comparação. A triagem de 13 novos compostos sulfonamídicos utilizando-se a tecnologia IMAPTM TR-FRET revelou que os derivados LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 e LASSBio-1632 (10^{-6} – 10^{-4} M) apresentaram atividade inibitória ($\geq 40\%$) sobre a atividade das isoenzimas PDE4A1A e PDE4D3, enquanto nenhum efeito foi notado com PDE4B1 e PDE4C. Utilizando o sistema de ativação de macrófagos alveolares murinos (linhagem AMJ2C11) *in vitro*, verificamos que LPS induziu aumento no conteúdo de TNF secretado, quadro que foi revertido na condição da incubação das células com os derivados testados, à exceção da maior concentração de LASSBio-1632 que aumentou nos níveis de TNF secretado. Teste de viabilidade (MTT) revelou não haver efeito citotóxico pelos compostos, excetuando a maior concentração de LASSBio-1632. Na próxima etapa, avaliamos o potencial dos compostos em modelos de inflamação pulmonar aguda (lesão pulmonar aguda - LPA) e crônica (silicose). Para LPA e silicose foi utilizada estimulação intranasal com LPS (análise 24 h) e com partículas de sílica (28 dias), respectivamente. Verificamos que nos dois modelos experimentais utilizados, o tratamento profilático (LPA) ou terapêutico (silicose) com os compostos LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 e LASSBio-1632 (25 - 100 $\mu\text{mol/kg}$, via oral) mostrou efeito supressor, em níveis diferenciados, sobre o declínio da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas, o infiltrado neutrofílico e a geração de citocinas (TNF- α , IL-6, MIP-1 e MIP-2) no tecido pulmonar. Fibrose e formação de granulomas foram revertidas pelo tratamento com os compostos. O efeito adverso de náusea e vômito, avaliado indiretamente através da indução de sono por quetamina/xilazina, revelou que todos

o derivados apresentam efeito central. Concluimos que quatro novos derivados sulfonamídicos do protótipo LASSBio-448 foram identificados por apresentar atividade anti-PDE4, além de efeito anti-inflamatório e antifibrótico em modelos de inflamação pulmonar aguda e crônica, porém associados à presença de efeito central. Apesar de evidenciarem importantes propriedades terapêuticas, os compostos em destaque precisam ser otimizados para minimização dos efeitos adversos.

Palavras-chave: Pulmão, Inflamação, Fibrose, PDE-4, Terapia.

ABSTRACT

STUDY FOR IDENTIFICATION OF NEW SULFONAMIDE AND SULFONILHIDRAZONE COMPOUNDS EFFECTIVE IN THE CONTROL LUNG INFLAMMATION CAUSED BY LPS AND SILICA IN MICE

Everton Tenório de Souza

Orientadora: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva
Co-orientadora: Dra. Lídia Moreira Lima

Abstract da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

The enzyme phosphodiesterase (PDE) type 4 has been considered an important therapeutic target for inflammatory lung diseases. The design, synthesis and evaluation of anti-PDE4 profile of a series of sulphonamide derivatives identified PDE4 selective inhibitor, LASSBio-448, with therapeutic index and potency higher than of the standard inhibitor (R,S)-rolipram, which showed antisilicosis activity, being considered as a potential candidate prototype anti-inflammatory/antifibrotic drug. The search for new compounds prototypes is essential, and includes the development of later stages of structural optimization comprising the structural design, synthesis of new series and evaluation of comparative pharmacological profile to the initial prototype. In this study aimed to characterize pharmacologically new LASSBio-448 analogs sulfonamide prototypes using *in vitro* and *in vivo* systems. The compounds reference rolipram and cilomilast were used for comparison. The screening of 13 new sulfonamide compounds using the IMAP™ FP PDE technology revealed that the derivative LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 and LASSBio-1632 (10^{-6} – 10^{-4} M) showed inhibitory activity ($\geq 40\%$) on the activity of PDE4A1A and PDE4D3 isoenzymes, while no effect was noted with PDE4B1 and PDE4C. Using the murine alveolar macrophage activation system (AMJ2C11 lineage) *in vitro*, we found that LPS induced increase in TNF secreted content, frame that was reversed in the incubated cells condition with derivatives tested, except for the highest concentration of LASSBio-1632 which increased levels of secreted TNF. Viability assay (MTT) showed no cytotoxic effect of the compounds, except for the highest concentration of LASSBio-1632. In the next step, we evaluate the potential of compounds in acute lung inflammation models (acute lung injury – LPA) and chronic (silicosis). For LPA and silicosis was used intranasal LPS stimulation (24h analysis) and silica particles (28 days), respectively. We found that in both experimental models used, prophylactic treatment (LPA) or therapeutic (silicosis) with the compound LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 and LASSBio-1632 (25 -100 $\mu\text{mol/kg}$, orally) showed effect suppressor, at different levels, on the decline in lung function and airways hyperreactivity, neutrophilic infiltrate and generation of cytokines (TNF- α , IL-6, MIP-1 and MIP-2) in lung tissue. Fibrosis and granuloma formation were reversed by treatment with the compounds. The adverse effect of nausea and vomiting, indirectly assessed by sleep induction by ketamine/xylazine, revealed that all the derivatives showed central effect. We conclude that four new sulfonamide derivatives LASSBio-448 prototype were identified by

presenting anti-PDE4 activity, as well as anti-inflammatory and antifibrotic effects in models of acute and chronic lung inflammation, but associated with the presence of a central effect. Although evidencing important therapeutic properties, the compounds highlighted need be optimized to minimize adverse effects.

Keywords: Lung, Inflammation, Fibrosis, PDE-4, Therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do processo inflamatório ocorrido no pulmão após o depósito de sílica no parênquima pulmonar.....	15
Figura 2: Organização do domínio das PDE4 nas formas super curtas, curtas e longas.....	22
Figura 3: Domínio catalítico da PDE4.....	24
Figura 4: Inibidores seletivos de PDE4 de primeira e segunda geração.....	27
Figura 5: Estrutura química do LASSBio-448.....	32
Figura 6: Princípio IMAP utilizando Fluorescência Polarizada.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Curva dose-resposta de LASSBio-448, seus análogos LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631, LASSBio-1632, rolipram e cilomilaste sobre a atividade catalítica das isoformas de PDE4 humana.....49
- Gráfico 2:** Efeito do tratamento dos análogos do LASSBio-448 sobre a ativação de macrófagos alveolares (AMJ2C11) estimulados com LPS *in vitro*.....51
- Gráfico 3:** Efeito do tratamento dos análogos do LASSBio-448 sobre a taxa de sobrevivência (%) de macrófagos alveolares (AMJ2C11), avaliado pela técnica de MTT.....51
- Gráfico 4:** Efeito do tratamento com o LASSBio-448, seus análogos e cilomilaste sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL).....53
- Gráfico 5:** Área sob a curva (ASC) do efeito do tratamento com cilomilaste (A) e o LASSBio-448 (B) sobre a função pulmonar de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL).....54
- Gráfico 6:** Área sob a curva (ASC) do efeito do tratamento com os compostos análogos de LASSBio-448 sobre a função pulmonar de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL).....55
- Gráfico 7:** Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL).....57
- Gráfico 8:** Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre os níveis (D.O.) da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL).....58
- Gráfico 9:** Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a geração de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL).....60
- Gráfico 10:** Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a geração de quimiocinas inflamatórias no pulmão de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL).....61

- Gráfico 11:** Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos instilados com sílica (10 mg/50µL).....63
- Gráfico 12:** Área sob a curva (ASC) do efeito do tratamento com cilomilaste (A) e o LASSBio-448 (B) sobre a função pulmonar de camundongos instilados com sílica (10 mg/50µL).....64
- Gráfico 13:** Área sob a curva (ASC) do efeito do tratamento com os compostos análogos de LASSBio-448 sobre a função pulmonar de camundongos instilados com sílica (10 mg/50µL).....65
- Gráfico 14:** Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos.....68
- Gráfico 15:** Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a deposição de colágeno no pulmão de camundongos silicóticos.....69
- Gráfico 16:** Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em tecido pulmonar de camundongos silicóticos.....70
- Gráfico 17:** Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a geração de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar de camundongos silicóticos.....72
- Gráfico 18:** Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a geração de quimiocinas inflamatórias no tecido pulmonar de camundongos silicóticos.....73
- Gráfico 19:** Efeito do tratamento com o cilomilaste, LASSBio-448 e seus análogos sobre a proliferação de fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos normais estimulados com IL-13 *in vitro*.....75
- Gráfico 20:** Efeito dos análogos do LASSBio-448 na duração da anestesia induzida pela combinação de ketamina e xilazina em camundongos.....77

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1:** Planejamento estrutural das séries I e II como inibidores de PDE-4 análogos de LASSBio-448.....35
- Esquema 2:** Planejamento estrutural dos compostos sulfonamídicos da série I desenhados por modificações no protótipo inibidores de PDE4 LASSBio-448.....36
- Esquema 3:** Planejamento estrutural dos compostos sulfonilidrazônicos da série II protótipos inibidores de PDE4 análogos conformacionalmente restritos de LASSBio-448.....37
- Esquema 4:** Esquema indução da lesão pulmonar aguda por LPS e tratamentos...38
- Esquema 5:** Esquema indução da silicose experimental e tratamentos.....39
- Esquema 6:** Esquema do retículo de 50 linhas e 100 pontos utilizado para a análise morfométrica.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais famílias de PDEs: especificidade pelo substrato, distribuição celular e tecidual e inibidores de referência.....19

Tabela 2: Análise do percentual de inibição da atividade catalítica da PDE4A1A, PDE4B3, PDE4C e PDE4D3 para compostos derivados do LASSBio-448.....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AHR- Hiper-responsividade das vias aéreas (do inglês, *Airway hyperresponsiveness*);
- AMPc - 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico;
- ANOVA - Análise de variância;
- AP-1 - Proteína ativadora 1 (do inglês, *Activator protein 1*);
- ATP - Trifosfato de adenosina (do inglês, *adenosine triphosphate*);
- BAL – Lavado broncoalveolar (do inglês, *Bronchoalveolar lavage*);
- BSA – Albumina de soro bovino (do inglês, *Bovine serum albumin*);
- CECAL - Centro de experimentação e controle de animais de laboratório;
- CEUA - Comitê de ética no uso de animais;
- CNG - Canal fechado de nucleotídeo cíclico (do inglês, *Cyclic nucleotid gated channel*);
- CO₂ - Dióxido de carbono;
- DMEM - Meio modificado de Dulbecco (do inglês, *Dulbecco's modified eagle medium*);
- D.O. - Densidade óptica;
- DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica (do inglês, *Chronic obstructive pulmonary disease*);
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic acid*);
- ELISA - Ensaio imunoenzimático (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*);
- EPAC - Proteína de troca diretamente ativada por AMPc (do inglês, *Exchange proteins activated by cAMP*);
- EPIs - Equipamentos de proteção individual;
- EPM - Erro padrão da média;
- ERK - Quinases reguladas por sinais extracelulares (do inglês, *extracellular-signal-regulated kinases*);
- ERO - Espécies reativas de oxigênio;
- FGF - Fator de crescimento de fibroblasto (do inglês, *Fibroblast growth factor*);
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz;

GMPc - 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico;

GPCRs - Receptores de membrana acoplados a proteína G (do inglês, *G-protein-coupled receptor*);

GTP - Trifosfato de guanosina (do inglês, *guanosine triphosphate*);

H&E - Hematoxilina e eosina;

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio;

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico;

HIV - Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, *Human immunodeficiency virus*);

HRP - Peroxidase de amoracia rusticana (do inglês, *Horseradish peroxidase*);

HSA - Albumina humana (do inglês, *Human albumin*);

HTAB - Brometo de cetildimetiletilamonônio;

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular 1 (do inglês, *Intercellular adhesion molecule 1*);

IFN γ - Interferon- γ ;

IL (n) - Interleucina (do inglês, *Interleukin*);

INF γ - Interferon (Interferon gama);

IRF-3 - Fator regulatório de interferon-3;

KC - Quimiocina derivada de queratinócitos;

KPO₄ - Fosfato de potássio;

LASSBio® - Laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas;

LPA - Lesão pulmonar aguda;

LPB - Proteína de ligação do lipopolissacarídeo (do inglês, *Lipopolysaccharide binding protein*);

LPS - Lipopolissacarídeo (do inglês, *Lipopolysaccharide*);

LR1 - Regiões de ligação-1;

LR2 - Regiões de ligação-2;

LTB₄ - Leucotrieno B₄;

M1 - Macrófago com polarização do Tipo 1 (do inglês, *Macrophage polarization of type 1*);

M2 - Macrófago com polarização do Tipo 2 (do inglês, *Macrophage polarization of type 2*);

- MAPK - Proteína ativada pelo mitógeno (do inglês, *Mitogen-activated protein (MAP) kinases*);
- MARCO - Receptor de macrófago com uma estrutura de Colágeno (do inglês, *Macrophage receptor with a collagenous structure*);
- MCP-1 - Proteína quimiotática de monócito-1 (do inglês, *Monocyte chemotactic protein-1*);
- MD-2 - proteína mielóide diferenciadora 2;
- MDC - Quimiocina derivada de monócito (do inglês, *Monocyte derived chemokine*);
- MHC - Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *Major histocompatibility complex*);
- MIP-1 α - Proteína inflamatória de macrófagos - 1alfa (do inglês, *Macrophage inflammatory protein-1 α*);
- MIP-2 - Proteína inflamatória de macrófagos-2 (do inglês, *Macrophage inflammatory protein-2*);
- MMP (n) - Metaloproteinases de matriz (do inglês, *Matrix metalloproteinases*);
- MPO - Mieloperoxidase;
- MTT - Corante de tetrazólio;
- MyD88 - Resposta primária de diferenciação de mielóides 88 (do inglês, *Myeloid differentiation primary response 88*);
- NaCl - Cloreto de sódio;
- NaH₂PO₄ - Fosfato de sódio monobásico;
- NALP3 - Receptor da família tipo NOD, contendo domínio de piridina 3 (do inglês, *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*);
- NaOH - Hidróxido de sódio;
- NaPO₄ - Fosfato de sódio;
- NF- κ B - Fator nuclear kappa de aumento de cadeia leve de linfócitos B ativados (do inglês, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*);
- NOD - Domínio de oligomerização ligados a nucleotídeo (do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain*);
- OMS - Organização Mundial de Saúde;
- PAF - Fator de ativação plaquetária (do inglês, *Platelet activating factor*);
- PBS - Salina tampão fosfato (do inglês, *Phosphate buffered saline*);
- PDE (n) - Fosfodiesterase (do inglês, *Phosphodiesterase*);

PGE2 - Prostaglandina E2;

PKA - Proteína quinase A (do inglês, *Protein Kinase A*);

PKG - Proteína quinase G (do inglês, *Protein Kinase G*);

PMN - Polimorfonuclear (do inglês, *Polymorphonuclear*);

RANTES - Regulada por ativação, expressa e secretada por célula T normal (do inglês, *Regulated on activated normal T cell expressed and secreted*);

RPM - Rotações Por Minuto;

SARA - Síndrome da angústia respiratória do adulto (do inglês, *Adult respiratory distress syndrome*);

SFB - Soro fetal bovino (do inglês, *Fetal bovine serum*);

SiO₂ - Dióxido de silício;

SiOH - Silanol;

SNC - Sistema nervoso central;

STAT - Transdutores de sinais e ativadores de transcrição (do inglês, *Signal transducers and activators of transcription*);

TC - Tomografia computadorizada

TCAR - Tomografia computadorizada de alta resolução

TGF-β - Fator transformador de crescimento beta (do inglês, *Transforming growth factor beta*);

TIR - Receptor Toll/IL-1;

TIRAP - Proteína adaptadora que contém o domínio TIR (do inglês, *Toll-interleukin-1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*);

TLR-4 - Receptor toll Like-4;

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumor necrosis factor-alpha*);

TRAM - Molécula adaptadora relacionada ao TRIF (do inglês, *TRIF-related adaptor molecule*);

TRIF - Domínio TIR contendo adaptador do Indutor de Interferon β (do inglês, *Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein inducing interferon beta*);

UCR (n) - Regiões conservadas (do inglês, *Upstream conserved regions*);

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro;

v.i. - Via de administração intravenosa;

v.in - Via de administração intranasal;

v.ip - Via de administração intraperitoneal;

v.o - Via de administração oral;

v.sc - Via de administração subcutânea;

VCAM-1 - Molécula de adesão de célula vascular 1 (do inglês, *Vascular cell adhesion molecule 1*);

Zn²⁺ - íon Zinco;

Mg²⁺ - íon Magnésio;

α-SMA - Actina de músculo liso do tipo alfa (do inglês, *α-Smooth muscle actin*).

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE GRÁFICOS	xv
LISTA DE ESQUEMAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Proposta e racional do trabalho.....	1
1.2 – Doenças pulmonares.....	2
1.2.1 – Doenças obstrutivas.....	2
1.2.2 – Doenças restritivas.....	5
1.2.2.1 – Silicose.....	6
1.2.2.1.1 – Sílica.....	7
1.2.2.1.2 – Epidemiologia.....	8
1.2.2.1.3 – Classificação clínica e diagnóstico.....	10
1.2.2.1.4 – Fisiopatologia.....	12
1.2.2.1.5 – Prevenção e tratamento.....	15
1.3 Inibidores de enzimas PDEs.....	17
1.3.1 A inibição seletiva de PDE4.....	24
1.4 Planejamento e síntese de novos inibidores de PDE4.....	31
2. OBJETIVOS	33
2.1 – Objetivo geral.....	33
2.2 – Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 – Animais.....	34
3.2 – Planejamento estrutural dos análogos de LASSBio-448.....	34
3.3 – Ensaio para triagem de compostos com atividade anti-PDE4.....	37
3.4 – Indução da lesão pulmonar aguda por lipopolissacarídeo (LPS).....	38
3.5 – Indução da silicose.....	39

3.6 – Tratamentos.....	39
3.7 – Função pulmonar e Hiper-reatividade das vias aéreas.....	40
3.8 – Análise histológica.....	40
3.9 – Análise morfométrica.....	41
3.10 – Quantificação de colágeno.....	42
3.11 – Quantificação de mieloperoxidase (MPO).....	42
3.12 – Quantificação de mediadores por ELISA.....	43
3.13 – Duração da anestesia.....	43
3.14 – Cultura de células.....	44
3.14.1 – Macrófagos alveolares.....	44
3.14.2 – Fibroblastos pulmonares.....	44
3.14.3 – Viabilidade celular.....	45
3.15 – Análise estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 – Atividade enzimática de PDE4 <i>in vitro</i>	46
4.2 – Ativação de macrófagos <i>in vitro</i>	50
4.3 – Modelo de inflamação pulmonar aguda.....	52
4.3.1 – Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas.....	52
4.3.2 – Análise histológica.....	56
4.3.3 – Infiltrado neutrofílico no tecido pulmonar.....	58
4.3.4 – Geração de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar.....	59
4.4 – Modelo de inflamação pulmonar crônica.....	62
4.4.1 – Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas.....	62
4.4.2 – Análise histológica (morfologia e morfometria).....	66
4.4.3 – Infiltrado neutrofílico tecidual.....	70
4.4.4 – Geração de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar.....	71
4.4.5 – Células alvos <i>in vitro</i>	74
4.5 – Avaliação indireta do efeito central em modelo de anestesia por cetamina/xilazina do composto LASSBio-448 e seus análogos.....	76
5. DISCUSSÃO.....	78
6. CONCLUSÃO.....	88
7. REFERÊNCIAS.....	89

1. Introdução

1.1 Proposta e racional do trabalho

Neste projeto de tese tivemos como proposta central a triagem e caracterização farmacológica de novos protótipos sulfonamídicos, candidatos a fármacos, com potencial aplicabilidade no controle de doenças inflamatórias pulmonares, tanto de caráter obstrutivo (lesão pulmonar aguda - LPA) como restritivo (silicose). Esta proposta esteve centrada em estudos anteriores que constataram ter esta classe de moléculas uma potente atividade inibitória sobre a isoenzima fosfodiesterase (PDE) tipo 4 (Kummerle e cols, 2012), considerada como um alvo terapêutico importante no caso de doenças de natureza inflamatória. Esta enzima atua na hidrólise do nucleotídeo 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), um segundo mensageiro intracelular com reconhecida atividade supressora sobre a funcionalidade de células inflamatórias. Estudos recentes demonstraram que o fármaco inibidor de PDE4, roflumilaste, mostrou-se efetivo no controle do quadro inflamatório associado à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), o que determinou sua incorporação na clínica em vários países do mundo (Giembycz e Maurice, 2014; Yan e cols, 2014). No entanto, uma ampla gama de efeitos colaterais, tais como náuseas e vômitos, tem sido associada à ação farmacológica desta classe de fármacos, o que tem tornado imprescindível à busca por compostos mais potentes e seletivos, porém com menos efeitos indesejáveis.

A estratégia utilizada neste trabalho teve como foco a triagem de uma nova série de 13 derivados sulfonamídicos desenhada por modificações estruturais no protótipo arilsulfonamídico (LASSBio-448) descrito por inibir seletivamente a enzima PDE4. Nossa análise constou da verificação de potencial atividade inibitória sobre a isoenzima PDE4 e, posterior avaliação da atividade farmacológica em sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*. Como modelos experimentais de doenças pulmonares, foram utilizados sistemas previamente estabelecidos em camundongos, cujo foco foram os componentes inflamatórios e fibrogênicos verificados na condição de estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) e partículas de sílica.

1.2 Doenças Pulmonares

O pulmão é um órgão que atua de forma efetiva no fenômeno vital de trocas gasosas, apresenta contato permanente com o meio externo, e dessa maneira, fica exposto a agentes potencialmente lesivos que chegam com o ar inspirado, resultando na ocorrência de um espectro abrangente de doenças (Caramori e Adcock, 2003; Moldoveanu e cols, 2009; Uddin e Levy, 2011; Arbex e cols, 2012).

Um diversificado conjunto de doenças acomete o trato respiratório ocasionando o aparecimento de uma resposta inflamatória pulmonar mais aguda, a qual é seguida em tempos mais tardios, pelo desencadeamento de um processo de reparo, associado a uma marcada resposta fibrogênica. Em conjunto, esses eventos levam a uma progressiva alteração da arquitetura das vias aéreas, reduzindo o processo de trocas gasosas e com conseqüente perda funcional do órgão (Caramori e Adcock, 2003; Rimal e cols, 2005). As respostas do trato respiratório à agressão e os padrões resultantes de doenças são determinados, principalmente, pela complexidade estrutural e funcional do sistema.

As disfunções pulmonares podem ser classificadas com base na topologia, etiologia ou de acordo com o distúrbio fisiopatológico por elas desencadeado, podendo ser divididas principalmente em obstrutivas e restritivas, sendo as primeiras caracterizadas pela redução do fluxo aéreo, causada pelo estreitamento ou obstrução das vias aéreas e exemplificada pela LPA, asma e DPOC; e as últimas que afetam a capacidade pulmonar pelo limite na expansibilidade, como verificado no caso das pneumoconioses como a silicose (Gillissen e cols, 2006).

1.2.1 Doenças obstrutivas

As disfunções de caráter obstrutivo são caracterizadas pela presença de edema peribrônquico, com alteração na fisiologia pulmonar, o que leva ao aumento da resistência das vias aéreas ao fluxo de ar, em conseqüência de obstrução completa ou parcial em qualquer região da árvore respiratória, desde a traquéia, grandes brônquios até os bronquíolos respiratórios e terminais. Verifica-se, também, a ocorrência de contração do músculo liso brônquico, com o estreitamento das vias aéreas, além de uma hipersecreção de muco (Laohaburanakit e Chan, 2003; Robbins, 2005; Rushton, 2007; Zhang e Zhou, 2014). As principais desordens

obstrutivas são verificadas em patologias como asma, enfisema, bronquite crônica e LPA. Esta última ou sua forma mais grave, a síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA), é caracterizada por uma lesão capilar alveolar e epitelial que pode ocorrer em inúmeras condições clínicas e, está associada tanto à lesão direta do pulmão quanto indireta no estabelecimento de um processo sistêmico. Representa uma fisiopatologia contínua que ocorre como consequência da exposição direta ou indireta do pulmão a agentes irritantes das vias aéreas (Rubinfeld, 2003). As alterações patológicas incluem lesão endotelial e epitelial, dano alveolar difuso, acompanhado por neutrófilos e macrófagos para o interstício, membrana hialina e edema pulmonar com fluido rico em proteínas no espaço alveolar (Ware e Matthay, 2000; Goodman e cols, 2003), resultando em hipoxemia grave (Zhang e cols, 2009).

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que a LPA resolve com o retorno da função alveolar ao normal ou próximo ao normal em alguns pacientes, enquanto em outros há a persistência e/ou progressão da lesão. Neste caso, como consequências da persistência e progressão são falência múltipla de órgãos, alveolite fibrosante, obliteração vascular pulmonar com hipertensão pulmonar e morte (Moss e Burnham, 2003; Erickson e cols, 2009; Brown e cols, 2011), com a vinculação de fatores genéticos, moleculares, celulares e iatrogênicos como relevantes para o favorecimento do reparo da membrana alveolar (Ware e Matthay, 2000; Matthay e Zimmerman, 2005; Tsushima e cols, 2009; Matthay e cols, 2012). A resolução da LPA requer uma sincronia na reabsorção do edema alveolar, reparo das barreiras epiteliais e endoteliais, e remoção de células inflamatórias e exsudato a partir dos espaços aéreos distais, pois tem sido descrito que fragmentos de ácido hialurônico encontrados no soro de pacientes com LPA desencadeiam a liberação de quimiocinas por macrófagos, além de interagir com os receptores do tipo "Toll", emitindo sinais que limitam a apoptose epitelial e promovem o restabelecimento da integridade do epitélio na lesão pulmonar experimental (Jiang e cols, 2005).

Um dos principais agentes flogísticos pulmonares utilizados em modelos animais experimentais de inflamação aguda é o LPS, uma molécula altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli*. Sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou é fagocitada e degradada pelas células de defesa (Tuin e cols, 2006). O mecanismo de ação do LPS está relacionado com o seu reconhecimento pelas células hospedeiras através do "Toll-like receptor" (TLR)-4, ativando o sistema imune e

promovendo efeitos inflamatórios. Após o reconhecimento e ligação à proteína ligante de LPS “Lipopolysaccharide Binding Protein”(LPB), este complexo acopla-se à molécula CD14 e a proteína mieloide diferenciadora 2 (MD-2), resultando na ativação de uma cascata de sinalização intracelular. Este processo inicia-se com o recrutamento de moléculas adaptadoras, como “myeloid differentiation primary response 88” (MyD88), “toll-interleukin-1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein” (TIRAP), “toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein inducing interferon beta” (TRIF) e “TRIF-related adaptor molecule” (TRAM), ativação de quinases, como “mitogen-activated protein kinase” (MAPK) e dos fatores de transcrição “activator protein 1”(AP-1), “signal transducer and activator of transcription”(Interferon regulatory factor“ (IRF) 3 e do Nuclear Factor kappa B”(NFKb), que ao se translocarem ao núcleo, promovem a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiopatológicos (Peri e cols, 2010; Juskewitch e cols, 2012; Cruz-Machado, 2010).

O TLR-4 é fundamental para o reconhecimento de LPS por diferentes tipos celulares do hospedeiro (Beutler, 2002; Togbe e cols, 2007; Bryant e cols, 2010; Bosmann e cols, 2012). Esta via de sinalização, TLR-4/CD14 e Myd88, é essencial para a inflamação pulmonar resultante da inalação do LPS. Já foi demonstrado que camundongos nocautes de Myd88 apresentaram redução da inflamação aguda após inalação de LPS, avaliada pela infiltração de neutrófilos, extravasamento de proteínas, broncoconstricção, diminuição na produção das citocinas IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da quimiocina derivada de queratinócitos (KC). Entretanto, a broncoconstricção e infiltração de neutrófilos induzidas por LPS dependem da via de sinalização dependente de Myd88, TRIF, IL-1R e IL-18R (Noulin e cols, 2005; Togbe e cols, 2007).

A instilação intranasal ou intratraqueal de LPS em animais se mostrou ativa em provocar uma inflamação pulmonar aguda, seguida pela produção de fator de necrose tumoral (TNF- α), aumento da permeabilidade capilar alveolar e broncoconstricção, devido ao aumento do índice de proteínas no lavado broncoalveolar, indicando o aumento da permeabilidade vascular (Vargaftig, 1997a; Vargaftig, 1997b; Togbe e cols, 2006; Togbe e cols, 2007; Liu e cols, 2013), além de um intenso infiltrado neutrofílico no lavado broncoalveolar com envolvimento de um amplo espectro de mediadores, como IL-1, eicosanoides e fator de ativação plaquetária (PAF), hiper-reatividade das vias aéreas e acúmulo e ativação de

macrófagos, levando-os a liberarem inúmeras citocinas, enzimas lisossomais, tais como elastase e mieloperoxidase (MPO), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e metabólitos do ácido araquidônico (Vargaftig, 1997a; Kline e cols, 1999; Corteling e cols, 2002; Yamada e cols, 2008; Janssen e Henson, 2012). Estes fatores mostraram claramente associados com o desenvolvimento e/ou progressão da LPA/SARA (Ware e Matthay, 2000; Valenca e cols, 2008).

O TNF- α e a IL-1 ocupam lugar de destaque na modulação do fenômeno de permeabilidade vascular a partir da inflamação pulmonar induzida por LPS, uma vez que estes estimulam outras células, tais como macrófagos, neutrófilos, fibroblastos.

Vários desses produtos liberados por neutrófilos e macrófagos ativados atuam como moléculas sinalizadoras para as células que constituem as vias aéreas (músculo liso e células epiteliais) e o parênquima pulmonar (pneumócitos tipo II), promovendo a liberação de citocinas/fatores de crescimento e contribuindo para a manutenção da resposta inflamatória, o que cronicamente ocasiona o remodelamento das vias aéreas e do parênquima pulmonar, causando alterações funcionais e estruturais dos pulmões (Yamada e cols, 2008).

1.2.2 Doenças restritivas

As doenças de caráter restritivo caracterizam-se pela redução da expansão do parênquima pulmonar, o que repercute na redução do volume pulmonar, fazendo com que o pulmão se torne menor mesmo durante o repouso, com conseqüente menor absorção de oxigênio pelo sangue (Fujimura, 2000; Laohaburanakit e Chan, 2003; Robbins, 2005). As doenças restritivas são identificadas por uma redução da capacidade pulmonar total, enquanto o fluxo expiratório apresenta-se normal ou proporcionalmente reduzido. Duas são as condições gerais nas quais podem-se observar alterações de caráter restritivo: (1) distúrbios da parede torácica na presença de pulmões normais como, por exemplo, doenças pleurais e (2) doenças infiltrativas e intersticiais agudas ou crônicas.

Apesar de todo o mecanismo de defesa do nosso organismo, as estruturas alveolares são bastante finas e estão sempre susceptíveis a respostas de natureza inflamatória, pois o pulmão encontra-se exposto a corpos estranhos carregados quando do processo de inspiração. As respostas do trato respiratório à agressão e os padrões resultantes de doenças são determinados, principalmente, pela

complexidade estrutural e funcional do sistema. Muitas das doenças do trato respiratório são de caráter ocupacional como as pneumoconioses. De acordo com o Ministério da Saúde (2006), o termo pneumoconiose (do grego, *conion* = poeira) é amplamente usado quando se designam as pneumopatias relacionadas etiologicamente à inalação de poeiras contendo partículas minerais em ambientes de trabalho (de Capitani e Algranti, 2006). Com o tempo, o termo foi sendo adaptado variando sua denominação de acordo com o material particulado, ou seja, o agente etiológico que desencadeia a reação orgânica, como por exemplo, asbestose (poeira de asbesto), silicose (poeira de sílica), estanhose (poeira do estanho), siderose (poeira de ferro) (Castro e cols, 2005). Apesar de esse conceito conglomerar a maior parte das alterações envolvendo o parênquima pulmonar, ressalta-se o fato de que o termo pneumoconioses pode não ser adequado para algumas pneumopatias mediadas por processos de hipersensibilidade que atingem o pulmão, como as alveolites alérgicas por exposição a poeiras orgânicas, a pneumopatia pelo cobalto e a doença pulmonar pelo berílio, por exemplo (Seaton, 2000; de Capitani e Algranti, 2006). Esses conceitos têm importância quando se estudam os processos fisiopatogênicos subjacentes a determinadas pneumopatias devido à inalação de poeiras.

1.2.2.1 Silicose

A silicose é uma doença pulmonar de caráter ocupacional, caracterizada por ser fibrosante, progressiva, incapacitante, causada pela inalação prolongada e deposição de formas cristalinas de sílica livre (dióxido de silício, SiO_2) nas vias aéreas inferiores (Greenberg e cols, 2007; Costantini e cols, 2011; Pandey e Agarwal, 2012). É irreversível e incurável podendo culminar em graves transtornos a saúde do trabalhador, assim como possui um alto impacto socioeconômico (Carneiro, 2002). Em geral, a silicose tem uma evolução lenta e progressiva, levando à insuficiência respiratória, decorrente de alterações das trocas gasosas e ventilação pulmonar, fator limitante para as atividades corriqueiras do paciente (Seaton, 2000; Rimal e cols, 2005), mesmo em situações em que o paciente não esteja mais exposto à sílica (Addis, 1994).

A exposição prolongada à sílica pode aumentar o risco de desenvolver câncer de pulmão (Carneiro, 2002; Carneiro e cols, 2006; Barboza e cols, 2008; Leung e

cols, 2012), além de tuberculose, o hábito de fumar também é um fator agravante. Maiores morbidades e mortalidades resultam da coexistência de epidemias de silicose, tuberculose, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e fumo na mesma área (Leung e cols, 2012).

1.2.2.1.1 Sílica

A sílica é um composto natural de maior abundância na crosta terrestre, formada por dois átomos de oxigênio e um de silício (SiO_2 , dióxido de silício) e que existe nas formas amorfa e cristalina (Leung e cols, 2012). A primeira, menos tóxica, possui um rearranjo aleatório dos átomos e está presente em lã de vidro, sílica gel, e no vidro sintético (Terra Filho e Santos Ude, 2006). A segunda (forma livre) recebe esse nome devido aos átomos de silício e oxigênio serem orientados e relacionados uns com os outros num padrão fixo (Greenberg e cols, 2007). A sílica cristalina tem a sua molécula arranjada na forma de um cristal tetraédrico tridimensional com radicais dispostos em sua superfície (Zaidi e cols, 1956; Wiessner e cols, 1988; Castranova e cols, 1995; Castranova, 2004; Greenberg e cols, 2007), e é considerada a mais tóxica, estando presente no quartzo, tridimita e cristobalita.

A inalação contínua de poeira contendo partículas de sílica cristalina (inferior a 10 μm , faixa de diâmetro denominada fração respirável), recém-geradas em operações como jateamento de areia, perfuração de rochas, escavação de túneis e moagem alcançam os pulmões, e induzem grande toxicidade para as células pulmonares (Wiessner e cols, 1988; Castranova e cols, 1995; Terra Filho e Santos Ude, 2006; Steenland e Ward, 2014). As partículas inaladas exercem seu efeito tóxico quando em contato com os tecidos do pulmão, sendo dependentes de muitos fatores inerentes as partículas, como as propriedades físicas e químicas (composição química, diâmetro, área de superfície, forma, densidade, solubilidade, reatividade química, propriedades eletrostáticas), as condições de exposição (concentração ambiental de poeira respirável, duração da exposição, temperatura, velocidade do ar, atividade física do trabalhador) e o estado de saúde do trabalhador (gênero, área corporal, idade, estado geral de saúde, doenças pré-adquiridas, hábito de fumar, grau de atividade física na realização do trabalho) (Bon, 2007).

Esse dano se dá inicialmente devido a presença do silanol (SiOH), composto químico encontrado na superfície da sílica e que podem atuar como doadores de

hidrogênio e formar pontes de hidrogênio com grupos de oxigênio e nitrogênio em membranas biológicas (Nash e cols, 1966; Castranova, 2004). Esta estreita interação entre as membranas das células e sílica resulta em perda da integridade da membrana, extravasamento da enzima lisossomal e lesão tecidual. Estes processos podem contribuir para o desenvolvimento de fibrose pulmonar (Castranova, 2004). Agentes que atuam como aceptores de hidrogênio, tais como polivinil piridina-N-óxido ou organo-silanos, revestem a superfície da sílica e efetivamente diminuem a toxicidade da sílica, tanto em modelos *in vivo* como *in vitro* (Castranova e cols, 1995).

1.2.2.1.2 Epidemiologia

A silicose continua sendo a pneumoconiose mais prevalente no Brasil e no mundo. Os países desenvolvidos possuem menor incidência, por haver uma maior conscientização das empresas e trabalhadores para o cumprimento dos atos preventivos e incentivo para a substituição de algumas operações. Entretanto, nos países em desenvolvimento não há um investimento adequado no que se refere à fiscalização, adequação e orientação nos ambientes de trabalho que lidam com a sílica, o que dificulta a eliminação à exposição, observando assim alto índice de incidência e prevalência (De Capitani, 2006; Leung e cols, 2012). Como a silicose é uma doença de desenvolvimento lento e pode progredir independente da exposição continuada, boa parte dos casos é diagnosticada somente anos após o trabalhador estar afastado da exposição (Mendes, 1979).

Inúmeros casos são diagnosticados a cada ano em diversas partes do mundo. Estudos epidemiológicos mostram que no Vietnã, a silicose é considerada a doença ocupacional de maior prevalência, dados mostram que o número de casos é de aproximadamente 9 mil, sendo uma das maiores causas de concessão de benefícios previdenciários aos trabalhadores. Na China, durante o período de 1991-1995, foram registrados 500 mil casos de silicose, o maior número de pacientes com silicose, com cerca de 6 mil novos casos e mais de 24 mil mortes anualmente. O problema é particularmente mais grave entre os trabalhadores das minas de pequena escala nos países em desenvolvimento (Leung e cols, 2012). No período de 2001-2010, somente na cidade de Guangzhou, na China, ocorreram 380 casos de doenças ocupacionais, destas, 20% foram identificadas como pneumoconioses e

77,6% deles, eram silicose (Lin e cols, 2012). Em 2010, foram relatados 23.812 novos casos de pneumoconioses distribuído por todo o País, destes 9870 casos eram de silicose (Wang e Zhang, 2012).

Apesar das pneumoconioses serem mais monitoradas em países desenvolvidos, a silicose não deixa de ser uma questão de saúde ocupacional nestes países, pois estudos têm mostrado que por volta de 600 mil trabalhadores do Reino Unido e mais de 3 milhões de trabalhadores na Europa foram expostos a sílica no período de 1990-1993. Nos EUA, estima-se que 2,2 milhões de trabalhadores norte-americanos estão expostos à sílica, 1,85 milhões deles na indústria da construção, o que se traduz em cerca de 1 a 2 trabalhadores para cada 100.

No Brasil não existem estudos suficientes que permitam quantificar a situação dos ambientes de trabalho quanto à exposição à sílica, porém estima-se que seja superior a 6 milhões de trabalhadores expostos, sendo as principais atividades com registro de prevalência distribuída entre: indústria de cerâmica com 3,9%, atividades em pedreiras entre 3,0% a 16%, jateamento de areia na indústria naval com 23,6% e perfuração de poços com 17%, principalmente na região Sul e Sudeste devido ao desenvolvimento industrial e do tipo de ocupação desenvolvida (Carneiro e Algrantti, 2014). As estimativas sobre prevalência da silicose no Brasil sugerem a existência no país, de 25 a 30 mil casos desta doença (Mesquita Júnior e cols, 2006). Minas Gerais é o estado brasileiro, segundo o Ministério da Saúde, com maior número de casos de silicose, sendo as atividades mais comuns a mineração, garimpo e lapidação, trabalhos esses realizados em condições rudimentares e sem nenhum controle ou fiscalização. Em apenas uma mina de ouro, localizada neste estado, mais de 4.500 trabalhadores foram registrados desenvolverem silicose entre 1978-1998 (Leung e cols, 2012).

Apesar de o jateamento ter sido proibido pelo Ministério do Trabalho e Emprego desde 2005 (De Capitani, 2006), ainda encontram-se casos de silicose no Brasil por esta atividade ocupacional. No entanto, muitos ex-trabalhadores de estaleiros na cidade de São Gonçalo, Estado do Rio de Janeiro, ainda vivem as sequelas da doença (Ferreira e cols, 2006; Marchiori e cols 2006; Lopes e cols, 2012). A exposição ao jateamento parece ser a mais perigosa dentre as outras fontes conhecidas de poeira de sílica, em decorrência da exposição intensa durante

longas jornadas de trabalho, em condições precárias de higiene e sem o uso de qualquer equipamento respiratório de proteção (Bakan e cols, 2011).

1.2.2.1.3 Classificação clínica e diagnóstico

A silicose existe em três formas de apresentação clínica: aguda, acelerada e crônica, estas relacionadas com a taxa de deposição e quantidade de partículas de sílica inaladas. A forma aguda (silicoproteinose) é a mais rara desta doença e pode desenvolver-se após meses ou poucos anos de exposição frequente a altos níveis de poeira respirável contendo sílica, como ocorre em jateamento de areia ou perfuração de rochas (Terra Filho e Santos Ude, 2006). Histologicamente é representada pela proteinose alveolar associada a infiltrado inflamatório intersticial, hipertrofia dos pneumócitos II, assim como, excessiva produção de surfactante, que se depositam nos alvéolos (Ding e cols, 2002; Terra Filho e Santos Ude, 2006; Greenberg e cols, 2007). A dispneia pode ser incapacitante, podendo evoluir para a morte por insuficiência respiratória, ocorre tosse seca, perda de peso e comprometimento do estado geral. Ao exame físico auscultam-se crepitações difusas e o padrão radiológico é bem diferente das outras formas, sendo representados por infiltrações alveolares difusas e progressivas, muitas vezes acompanhadas por nodulações mal definidas (Colbeck, 1998; Terra Filho e Santos Ude, 2006; Pandey e Agarwal, 2012; Dang e cols, 2013).

Na forma acelerada suas manifestações ocorrem entre as formas aguda e crônica, geralmente após um período de exposição de cinco a dez anos. As manifestações clínicas são semelhantes à forma crônica e as alterações patológicas são representadas pela presença de granulomas ou nódulos silicóticos, porém seu desenvolvimento ocorre em estágios mais iniciais, com intensa inflamação e descamação celular nos alvéolos, decorrente de hiperplasia e hipertrofia de pneumócitos II, além de um intenso infiltrado de macrófagos e partículas de sílica. Os sintomas respiratórios costumam ser precoces e limitantes, com grande potencial de evolução para a forma complicada da doença, como a formação de conglomerados e fibrose maciça, sendo observada esta forma em cavadores de poços (Colbeck, 1998; Ding e cols, 2002; Terra Filho e Santos Ude, 2006).

A silicose crônica (forma nodular simples) é a forma de apresentação mais comum e geralmente ocorre após mais de dez a quinze anos de exposição ou de

latência, caracterizada por um intenso infiltrado celular, deposição de colágeno e presença de nódulos no interstício pulmonar, ao redor de bronquíolos respiratórios e dos vasos, caracterizando a fibrose pulmonar. A análise histológica revela a presença de nódulos com camadas de colágeno e presença de estruturas polarizadas à luz, com a progressão da doença, os nódulos podem coalescer formando aglomerados maiores e substituindo o parênquima pulmonar por fibrose colágena, os pacientes costumam ser assintomáticos ou apresentar sintomas que são precedidos pelas alterações radiológicas. Tem evolução insidiosa e pode evoluir com sintomas de dispneia progressiva, sendo observado em trabalhadores das indústrias de cerâmica (Colbeck, 1998; Terra Filho e Santos Ude, 2006; Greenberg e cols, 2007). Pacientes com silicose crônica podem apresentar condições associadas como tuberculose e câncer (Leung e cols, 2012). Trabalhadores de minas de carvão contraem um tipo similar de doença chamado pneumoconiose de trabalhadores de minas de carvão ocasionada pela exposição de poeira de carvão contendo sílica (Pandey e Agarwal, 2012; Dang e cols, 2013).

Na maioria das vezes, a exposição à sílica está associada a outras doenças, como por exemplo, doenças autoimunes (Brown e cols, 2003; Terra Filho e Santos Ude, 2006); neoplasias (Peretz e cols, 2006; Greenberg e cols, 2007); tuberculose (teWaternaude e cols, 2006; Greenberg e cols, 2007; Barboza e cols, 2008), o que dificulta ainda mais a saúde do trabalhador e conseqüentemente o seu diagnóstico.

O diagnóstico da silicose geralmente baseia-se na história de exposição à sílica e alterações radiológicas compatíveis (Terra Filho e Santos Ude, 2006), juntamente com a exclusão de outros diagnósticos concorrentes, como tuberculose cutânea aguda, infecções fúngicas, carcinomatose, sarcoidose, fibrose pulmonar idiopática e outras doenças pulmonares intersticiais. Embora, de maneira geral, o estudo radiológico de pacientes silicóticos seja feito com radiografias convencionais, a tomografia computadorizada (TC), especialmente a de alta resolução (TCAR), pode dar informações adicionais importantes, tanto na detecção precoce de pequenas opacidades quanto no estadiamento da doença e na identificação de possíveis complicações (Hnizdo e Murray, 1998; Ding e cols, 2002; Carneiro e cols, 2006; Ferreira e cols, 2006; Greenberg e cols, 2007). Estudos sugerem que a alta resolução é mais sensível do que a radiografia convencional na detecção de características específicas, como mudanças nodulares em parênquima pulmonar; fibrose maciça progressiva; bolhas; enfisema; e mudanças na pleura, mediastino e

hilo na silicose (Mosiewicz e cols, 2004; Lopes e cols, 2008; Sun e cols, 2008). Além disso, a de alta resolução tem uma melhor correlação com a função pulmonar (Mosiewicz e cols, 2004; Sun e cols, 2008), parâmetro importante que auxilia no diagnóstico, principalmente nas formas mais graves e avançadas da doença, avaliando a presença de alterações funcionais e monitorando a evolução do paciente (Terra Filho e Santos Ude, 2006). Investigações de caráter invasivo, como a biópsia pulmonar, raramente são necessárias para o diagnóstico da silicose, mas podem ser feitas para excluir outras doenças potencialmente tratáveis ou na avaliação de casos avançados da doença para um posterior transplante de pulmão. Além disso, broncoscopia e lavado broncoalveolar podem ser úteis para o diagnóstico de silicoproteinose (Leung e cols, 2012), assim como, análise por imagens, através da ressonância magnética e radiografia digitalizada ajudando na análise e acompanhamento da silicose (Begin e cols, 1987).

1.2.2.1.4 Fisiopatologia

A silicose caracteriza-se pela formação de pequenos nódulos arredondados nos pulmões de pessoas expostas a inalação de grandes quantidades de poeira de sílica cristalina ao longo do tempo (Greenberg e cols, 2007; Costantini e cols, 2011; Pandey e Agarwal, 2012). A deposição de sílica nos pulmões ativa, inicialmente, as células residentes, principalmente macrófagos e células epiteliais (Hamilton e cols, 2008; Song e cols, 2014). Os macrófagos alveolares são encontrados, em geral, nas vias aéreas, no interstício pulmonar e no interior dos alvéolos e constituem uma das primeiras células que entram em contato com o agente agressor. Seu papel é fundamental para a eliminação de partículas inaladas, atuando em conjunto com as células epiteliais (Miyata e van Eeden, 2011).

Devido às propriedades de superfície, a sílica cristalina induz a ativação de macrófagos alveolares através de sua atuação em receptores do tipo “scavengers”, como “macrophage receptor with a collagenous structure” (MARCO) (Kobzik, 1995; Hamilton e cols, 2006; Miyata e van Eeden, 2011). Apesar de haver evidências de que a ligação da partícula de sílica nos receptores “scavengers” atua diminuindo a resposta inflamatória (Beamer e Holian, 2005), o estresse oxidativo produzido em resposta a fagocitose da partícula de sílica por essas células que liberam espécies reativas de oxigênio formadas durante a ruptura ou esmagamento da sílica

(Castranova, 2004), induz a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, levando a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1, que dão início à síntese de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, as interleucinas (IL)-1, -6 e -8 e o TNF- α (Li e cols, 2003; Castranova, 2004; Miyata e van Eeden, 2011).

Estudos prévios mostraram que a endocitose das partículas de sílica induz a ativação do inflamossoma “NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3” (NALP3), este processo estaria associado ao dano do lisossoma, desestabilização da membrana e o influxo de potássio (Cassel e cols, 2008; Hornung e cols, 2008; Song e cols, 2014), contribuindo para o desenvolvimento da silicose. O NALP3 é um receptor citoplasmático que pertence à família dos receptores do tipo NOD símile. Estes sofrem o processo de oligomerização quando ativados e transformam-se no inflamassoma NALP3, que promove a ativação da caspase-1 e consequente clivagem de pró-IL-1 β e pró IL-18 a IL-1 β e IL-18, respectivamente (Petrilli e cols, 2007; Song e cols, 2014). Essas citocinas são capazes de ativar células endoteliais e neutrófilos a expressar moléculas de adesão como “intercellular adhesion molecule” (ICAM-1) e “vascular cell adhesion molecule 1” (VCAM-1), facilitando o recrutamento de leucócitos para o interstício alveolar; ativar e estimular a proliferação de linfócitos e induzir resposta inflamatória sistêmica (Witko-Sarsat e cols, 2000; Scabilloni e cols, 2005; Fichtner-Feigl e cols, 2006; Manoury e cols, 2007; Phan, 2008). Por sua vez, os linfócitos ativados produzem citocinas (como a linfotóxina e o IFN- γ) responsáveis pela quimiotaxia e ativação de monócitos e neutrófilos (Davis e cols, 2001; Miyata e van Eeden, 2011; Song e cols, 2012).

Os macrófagos alveolares exercem uma importante ação no desenvolvimento e progressão da silicose através da liberação de diversos mediadores, tais como: enzimas e espécies reativas de oxigênio que promovem dano pulmonar através da ativação de NADPH-oxidase; citocinas e quimiocinas capazes de ativar e recrutar células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos e linfócitos; e fatores fibrogênicos, os quais induzem a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Castranova e Vallyathan, 2000; Rimal e cols, 2005; Huaux, 2007). Os mecanismos que levam ao acúmulo de colágeno e a proliferação da matriz extracelular no modelo de silicose ainda não estão totalmente esclarecidos. Algumas citocinas fibrogênicas têm importante ação no contexto da silicose humana e experimental. Foi demonstrado que o TNF- α tem sua expressão aumentada em macrófagos alveolares na fibrose induzida por sílica (Gossart e cols, 1996), e que o anticorpo anti-TNF- α é capaz de

prevenir o desenvolvimento da fibrose (Piguet e cols, 1990). O fator transformador de crescimento β (TGF- β) também tem sua expressão aumentada e associada com populações de células dispersas no granuloma, principalmente em macrófagos, fibroblastos e epitélio alveolar hiperplásico (Jagirdar e cols, 1996; Mariani e cols, 1996; Sun e cols, 2010). Os neutrófilos também encontram-se associados aos macrófagos, e constituem a primeira etapa da fase aguda da inflamação. Além disso, os macrófagos e neutrófilos exercem importante ação no processo fibrótico, uma vez que são responsáveis pela produção de enzimas capazes de degradar a matriz extracelular como metaloproteases de matriz (MMP) 2 e 9 (Corbel e cols, 2003), o que leva à lesão de células endoteliais e pneumócitos tipo I, assim como hipertrofia e hiperplasia de pneumócitos tipo II. Estes juntamente com as células epiteliais e os macrófagos produzem citocinas prófibrogênicas como TGF- β , IL-13 e TNF- α que promovem a ativação e recrutamento de fibroblastos, resultando na produção de liberação de colágeno, e assim, contribuindo para a formação de granulomas (Figura 1) (Arcangeli e cols, 2001; Fubini e Hubbard, 2003; Fichtner-Feigl e cols, 2006; Hamilton e cols, 2008; Phan, 2008; Sun e cols, 2010).

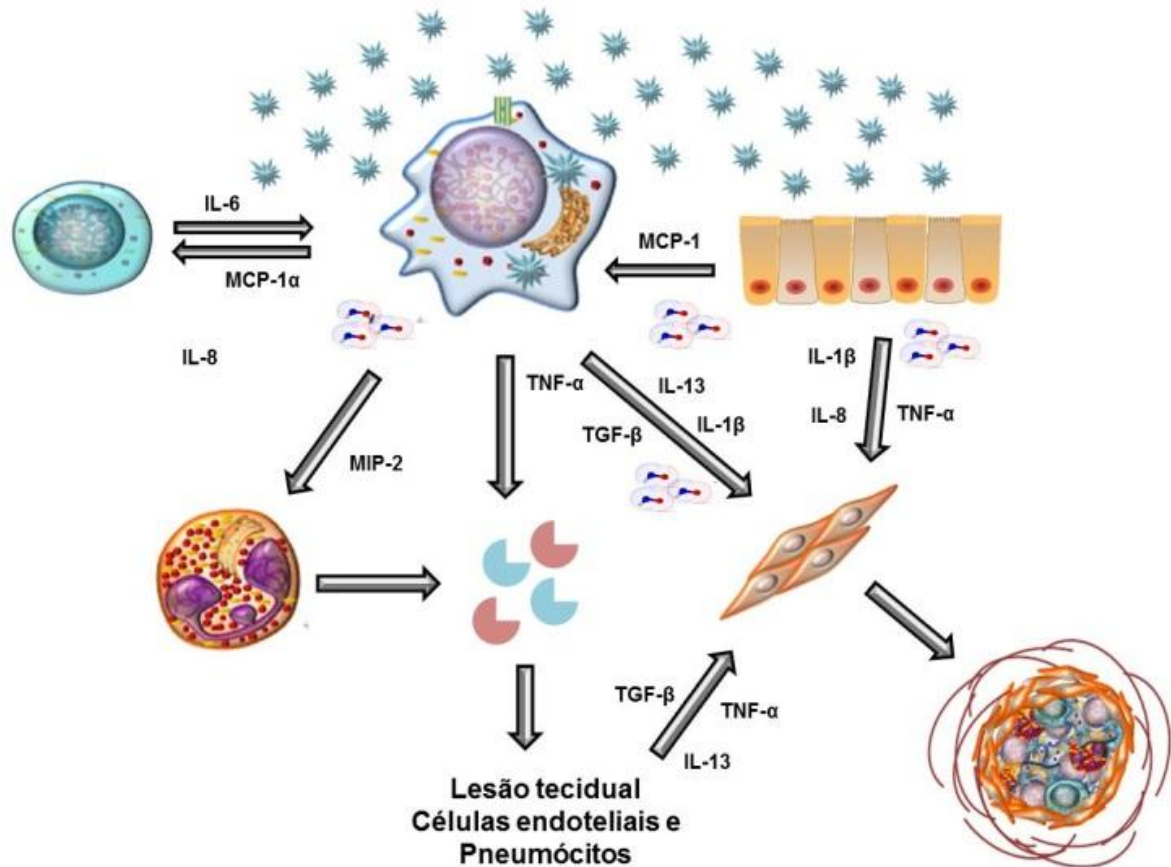


Figura 1. Esquema representativo do processo inflamatório ocorrido no pulmão após o depósito de sílica no parênquima pulmonar. Está representada a ativação de células residentes (células epiteliais e macrófagos alveolares) por partículas de sílica, havendo liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e mediadores inflamatórios e fibrogênicos que induzem o recrutamento de leucócitos para o local da lesão e ativação de fibroblastos pulmonares. Os macrófagos e neutrófilos produzem enzimas capazes de degradar matriz extracelular como metaloproteases-2 e 9 (MMPs), levando à lesão de células endoteliais e pneumócitos I, assim como, hipertrofia e hiperplasia de pneumócitos II, que juntamente com as células epiteliais e os macrófagos produzem citocinas pró-fibrogênicas responsáveis por recrutar e ativar células mesenquimatosas (fibroblastos) a ocuparem grande parte da lesão, resultando na indução da fibrose. Macrófagos; Linfócitos; Neutrófilos; Células epiteliais; Fibroblastos; Espécies reativas de oxigênio (ERO); MMP-9; MMP-2; Partícula de sílica; Granuloma. Adaptado de Ciambarella (2013).

1.2.2.1.5 Prevenção e Tratamento

Apesar do decréscimo da prevalência da silicose com o passar dos anos, principalmente após a implementação de planos de precaução, ainda hoje, sua incidência é alta, em grande parte devido à má utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) e do controle da poeira no ambiente de trabalho. Atualmente o controle e a regulamentação da exposição de profissionais a partículas

minerais como a sílica, constituem as principais medidas de prevenção à ocorrência da silicose (Leung e cols, 2012). Dentre essas medidas designadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca-se o controle da fonte de poeira através da eliminação ou substituição de materiais, modificação ou substituição de processos e equipamentos, manutenção dos equipamentos, utilização de métodos úmidos e alteração das práticas de trabalho (Terra Filho e Santos Ude, 2006; Greenberg e cols, 2007; Santos e cols, 2010). Além disso, o treinamento dos trabalhadores sobre Boas Práticas de Trabalho, higiene pessoal e a utilização de EPIs, como capacetes que forneçam ar externo puro, máscara para completa filtração do ar e óculos de proteção, constituem medidas para amenizar a exposição e o risco do trabalhador às partículas de sílica e conseqüentemente ao desenvolvimento da doença (Terra Filho e Santos Ude, 2006; Greenberg e cols, 2007).

A silicose, assim como outras doenças de caráter fibrótico, não são passíveis de tratamento até o presente momento, o que tem motivado a realização de estudos a fim de que se identifiquem compostos eficazes (Ji e cols, 2009; Lassance e cols, 2009; Wang e cols, 2009; Wang e cols, 2010; Maron-Gutierrez e cols, 2011; Takato e cols, 2011). A fim de melhorar a condição de vida do paciente, sugerem-se medidas como a interrupção da exposição à sílica em estágio inicial da doença; a oxigenioterapia, pois pacientes pneumoconióticos podem evoluir para insuficiência respiratória crônica; e nos casos mais graves o transplante de pulmão passa a ser uma alternativa, porém ainda há um grande risco, tanto para o doador quanto para o paciente, que é de não sobreviver após a operação devido a complicações pós-cirúrgicas (Greenberg e cols, 2007; Singer e cols, 2012).

Várias modalidades de tratamento têm sido testadas com o objetivo de reduzir a resposta inflamatória à sílica. Em alguns casos recomenda-se a lavagem broncoalveolar para remoção das partículas e o uso de alumínio como modificador das propriedades superficiais das partículas, até o uso de corticosteroides, imunossupressores e broncodilatadores. Entretanto, nenhuma destas abordagens mostrou-se eficaz na melhoria do quadro clínico e dos parâmetros de função pulmonar (Greenberg e cols, 2007; Leung e cols, 2012).

Nos últimos anos, a terapia com células-troncos tem registrado efeitos benéficos no tratamento da silicose em modelos de animais experimentais, por reduzir diversos parâmetros da doença, como expressão de citocinas, deposição de

colágeno, área do granuloma e melhora da função pulmonar (Lassance, Prota et al. 2009; Maron-Gutierrez, Castiglione et al. 2011), além de reparar tecidos lesionados modulando o processo inflamatório e substituindo células lesadas (Lopes-Pacheco e cols, 2013).

Como não há tratamento efetivo para silicose, então, a prevenção, diagnóstico precoce e prognóstico são cruciais para o tratamento. Sendo assim, uma atenção considerável tem sido dada a utilização de biomarcadores na prevenção de doenças ocupacionais, estes que são capazes de avaliar a exposição, identificarem mudanças ou efeitos iniciais da exposição, mudanças patológicas previamente ao desenvolvimento da doença, bem como predizer suscetibilidade para a doença (Gulumian e cols, 2006). Dessa forma, os biomarcadores apresentam um grande potencial de melhorar o processo de avaliação de risco em ambientes de trabalho e em particular, doenças pulmonares, possibilitando a tomada de ações preventivas e assegurando a sobrevivência de pessoas afetadas (Pandey e Agarwal, 2012).

Um importante alvo terapêutico que tem sido estudado para o tratamento de doenças pulmonares crônicas são as enzimas PDEs, em especial a PDE4, devido a estudos promissores com inibidores seletivos desta isoenzima, sintetizados e testados clinicamente em diferentes distúrbios inflamatórios crônicos como asma e a DPOC (Brown, 2007; Field, 2008; Kodimuthali e cols, 2008; Tatlicioglu, 2008; Giembycz e Maurice, 2014). Existem de fato inúmeros exemplos onde o aumento dos níveis intracelulares de AMPc, associado a inibição de PDE4, causa redução expressiva da função pró-inflamatória de leucócitos e células estruturais presentes nos pulmões (Caramori e Adcock, 2003; Barnes, 2006).

1.3 Inibidores de enzimas PDEs

As enzimas PDEs compõem uma superfamília de enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos cíclicos intracelulares, o AMPc ou 3',5'-monofosfato de guanossina cíclico (GMPc) na ligação 3'-éster de fosfato, inativando-os. Estes nucleotídeos são formados a partir de trifosfato de adenosina (ATP) e trifosfato de guanossina (GTP) pela ação catalítica da adenilato ciclase ou guanilato ciclase, respectivamente, em resposta à ativação de receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCRs) (Conti e Beavo, 2007).

A atividade das PDEs foi descrita pela primeira vez em 1962 por Butcher e Sutherland, quase que imediatamente após a descoberta do AMPc, posteriormente do GMPc, no intuito de proporcionar uma poderosa ferramenta para aumentar as oportunidades na descoberta de medicamentos, visto que, apresentaram um papel funcional bastante amplo em vários modelos experimentais (Butcher e Sutherland, 1962; Sutherland e cols, 1962; Lugnier, 2006; Keravis e Lugnier, 2012). Há muito tempo que as PDEs têm sido consideradas como alvos para o desenvolvimento de fármacos. Na década de 80, três tipos de PDEs (PDE1, PDE2 e PDE3) tinham sido descritas em tecidos cardiovasculares, com base em estudos de cromatografia. Hoje em dia, os avanços na metodologia e tecnologia têm favorecido o desenvolvimento e conhecimento a respeito das famílias de PDE (Keravis e Lugnier, 2012).

Estas enzimas são ativadas diretamente (por exemplo, forskolin para adenilil ciclase e óxido nítrico para guanilato ciclase) ou indiretamente através de receptores de superfície celular, por exemplo, agonistas β -adrenérgicos e prostaglandina E2 (PGE2) para adenilato ciclase e atriopeptina para guanilato ciclase. À medida que as concentrações intracelulares dos nucleotídeos cíclicos elevam eles se ligam e ativam suas enzimas alvo, proteína quinase A (PKA) e proteína quinase G (PKG). Estas proteínas quinases fosforilam substratos (por exemplo, canais iônicos, proteínas contráteis, fatores de transcrição) que regulam funções celulares essenciais (Lugnier, 2006; Kodimuthali e cols, 2008).

Os nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) são importantes segundos mensageiros intracelulares que desempenham um papel chave na mediação de respostas celulares a vários hormônios e neurotransmissores, assim como ativam múltiplos alvos, como PKA, PKG, proteína de troca diretamente ativada por AMPc (EPAC), canal fechado de nucleotídeo cíclico (CNG), bem como as próprias PDEs. Dentre esses alvos, destacamos as proteínas quinases A e G, pois elas controlam as respostas celulares funcionais, tais como o cálcio intracelular, proliferação celular, inflamação, e a transcrição (Lugnier, 2006; Kodimuthali e cols, 2008).

Atualmente, têm sido identificados mais de 20 genes que codificam as PDEs no genoma humano com mais de 50 proteínas diferentes de PDE, e as proteínas correspondentes foram caracterizadas de acordo com suas propriedades reguladoras e físico-químicas (Bender e cols, 2004; Maurice e cols, 2014). Com base na cinética, bioquímica, regulação e propriedades farmacológicas, essas PDEs podem ainda ser subdivididas em 11 famílias (PDE1-PDE11) (Conti e Beavo, 2007;

Francis e cols, 2011; Keravis e Lugnier, 2012; Maurice e cols, 2014), estas que se diferem uma das outras quanto à sequência de aminoácidos, especificidade pelo substrato, modulação da atividade enzimática, propriedades farmacológicas e distribuição nas células e tecidos (Tabela 1) (Bender e Beavo, 2006; Conti e Beavo, 2007; Francis e cols, 2011; Keravis e Lugnier, 2012; Maurice e cols, 2014).

Tabela 1: Principais famílias de PDEs: especificidade pelo substrato, distribuição celular e tecidual e inibidores de referência

Família	Especificidade	K _m (μM)		Distribuição	Inibidores
		AMPC/GMPc			
PDE1 (3)	estimulada por Ca ²⁺ /Calmodulina	0,3-124/0,6-6		Coração, cérebro, pulmão, músculo liso	Nimodipina, IC86340, IC224, IC295, dioclein
PDE2 (1)	Estimulada por GMPc	15/15		Glândula adrenal, coração, pulmão, fígado, plaquetas, células endoteliais	EHNA, BAY-60-7750, PDP, IC933, oxindole, ND7001
PDE3 (2)	Seletiva para AMPc, Inibida por GMPc	0,2/0,1		Coração, músculo liso, pulmão, fígado, plaquetas, adipócitos,	Cilostamida, Milrinona, Siguazodan, cilostazol
PDE4 (4)	Específica para AMPc, insensível para GMPc	2/ >300		Cérebro, células de sertoli, rim, fígado, coração, músculo liso, células endoteliais	Rolipram, Roflumilaste, Cilomilast, NCS 613
PDE5 (1)	Específica para GMPc	150/1		Pulmão, plaquetas, músculo liso, coração, células endoteliais, cérebro	Zaprinast, DMPPO, sildenafil, tadalafil, vardenafil
PDE6 (3)	Específica para GMPc	2000/60		Fotorreceptores, glândula pineal, pulmão	Zaprinast, DMPPO, sildenafil, vardenafil
PDE7 (2)	Específica para AMPc insensível a rolipram alta afinidade	0,2/ > 1000		Músculo esquelético, coração, rim, cérebro, pâncreas, linfócitos T	BRL 50481, IC242, ASB16165
PDE8 (2)	Seletiva para GMPc, insensível a rolipram	0,06/NA		Testículos, olhos, fígado, músculo esquelético, coração, rim, ovário, cérebro, linfócitos T, tireóide	PF-04957325
PDE9 (1)	Específica para GMPc	NA/0,07-0,17		Rim, fígado, pulmão, cérebro	BAY-73-6691, PF-04447943
PDE10 (1)	Sensível a GMPc, Seletivo para AMPc	0,02-1/13		Testículo, cérebro, tireóide	Papaverina, TP-10, MP-10
PDE11 (1)	Sensível a GMPc, especificidade dupla	0,5-2/0,3-1		Músculo esquelético, próstata, glândula pituitária, fígado, coração	Nenhum seletivo

(N) = número de genes. Adaptado de Bender e Beavo, 2006; Francis e cols, 2009, Lugnier e cols, 2006; Keravis, 2012. NA, não aplicável.

Das 11 famílias, algumas têm preferência por hidrolisar seletivamente AMPc (PDEs 4, 7 e 8), enquanto outras hidrolisam GMPc (PDEs 5, 6 e 9) e algumas hidrolisam ambos os nucleotídeos cíclicos (PDEs 1, 2, 3, 10 e 11) (Maurice, Ke et al. 2014). Das famílias que são hidrolisadas por duplo substrato, vale salientar que no interior das células a hidrólise de um nucleotídeo pode ser inibida competitivamente por outro, em função da sua relação com o sítio catalítico (Conti e Beavo, 2007; Francis e cols, 2011; Keravis e Lugnier, 2012).

Dentre todas as famílias de PDEs, destaca-se a PDE4, família multigênica, que tem atraído atenção considerável nos últimos anos, devido ao fato de que pode ser encontrada em diferentes tipos de celulares e tecidos, incluindo: leucócitos das vias aéreas, músculo liso vascular, endotélio e cérebro (Houslay, Schafer et al. 2005). Assim, o envolvimento da PDE4 em processos patológicos associados com estes tecidos sugere um grande potencial uso terapêutico para intervenção farmacológica em uma variedade de doenças inflamatórias, vasculares e neurológicas (Lugnier, 2006; Keravis e Lugnier, 2012; Maurice e cols, 2014).

A PDE4 é a principal enzima que hidrolisa o AMPc em células inflamatórias e imunes e representa a maior família de PDE, constituída por quatro genes (PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D), que diferem na sua sensibilidade aos inibidores, tais como rolipram, cilomilaste e roflumilaste (Houslay, 2010; Rabe, 2011). As isoformas de PDE4 são expressas em diversos tipos celulares que são considerados alvos de medicamentos para o tratamento de doenças respiratórias, como a asma e DPOC (Keravis e Lugnier, 2012; Page e Spina, 2012; Beghe e cols, 2013). As isoformas PDE4A, B, e D são de grande relevância em doenças que apresentam um caráter inflamatório, devido a sua expressão em células inflamatórias humanas (células T e B, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e epiteliais das vias aéreas), mas vale salientar que os efeitos adversos relacionados aos inibidores de PDE4 está fortemente ligada com a inibição da PDE4D (Robichaud e cols 2002a/b). Já a isoforma PDE4C é encontrada principalmente nos testículos, músculo esquelético, e sistema nervoso central (SNC) (Lugnier, 2006; Kodimuthali e cols, 2008).

Por ser uma enzima altamente expressa em leucócitos e em outras células inflamatórias envolvidas na patogênese das doenças pulmonares inflamatórias, a inibição de PDE4 demonstrou um efeito anti-inflamatório e, assim, uma eficácia terapêutica. No início da década de 1990, o foco para o uso de inibidores de PDE4

foi à asma, no entanto, a eficácia inconsistente e limitada e os efeitos colaterais desses compostos fez dos corticoides inalatórios uma alternativa mais segura e eficaz. De fato, a falta de um fármaco anti-inflamatório eficaz para o tratamento da DPOC tem mudado o interesse no desenvolvimento de medicamentos para DPOC nos últimos anos (Rabe, 2011; Michalski e cols, 2012).

Estruturalmente, as PDEs são formadas por 3 domínios funcionais (organização estrutural comum às isoformas de PDEs): um domínio regulador hidrofóbico N-terminal (específico da isoforma) que apresenta sítios responsáveis pela localização subcelular das PDEs, um domínio regulador C-terminal (específico da subfamília) e um domínio catalítico conservado na porção central, em que ocorre a hidrólise do AMPc (Maurice, Ke et al. 2014). Além desses domínios, apresenta 1 a 2 regiões conservadas chamadas “upstream conserved region” (UCR1 e/ou UCR2), conservada apenas entre os genes PDE4 (Houslay e cols, 2005; Whitaker e Cooper, 2009). Os domínios N e C-terminal apresentam uma homologia moderada entre as famílias (Essayan, 2001), sendo as sequências de aminoácidos terminais bem diferentes entre as famílias. Estes dois domínios carregam as características de cada família de PDE relacionadas a cada isoforma em particular (Xu e cols, 2000).

As PDEs apresentam-se na forma de monômeros, dímeros ou tetrâmeros cuja dimerização parece ter o envolvimento da região C-terminal (Essayan, 1999; Richter e cols, 2001). A região N-terminal está relacionada com a regulação alostérica (a exemplo de sítios de fosforilação presentes nas PDEs 4), capacidade de associação à membrana e apresentar-se como alvo para interações proteína-proteína de isoformas (Essayan, 1999; Richter e cols, 2001).

As PDEs 4 apresentam vários “splices” alternativos de RNAm codificando as isoformas de PDE4 em longa, curta e super curta. Essa classificação é baseada na inclusão/exclusão da região UCR1 e tamanho relativo da UCR2. A isoenzima PDE4 longa apresenta a região contendo uma sequência única de aminoácidos conservados (UCR1 e UCR2), a isoenzima PDE4 curta não apresenta a região UCR1 e a isoenzima PDE4 super curta apresenta apenas a metade do UCR2 (Keravis e Lugnier, 2012). UCR1 e UCR2 estão localizadas entre a extremidade N-terminal e o domínio catalítico das enzimas PDE4, conectando-se ao domínio catalítico através da região UCR2 (Figura 2). Esta por sua vez pode regular a região catalítica da PDE4 através da formação de interações eletrostáticas (Beard e cols, 2000). A região conservada UCR1 contém um sítio de fosforilação da PKA que após

a fosforilação diminui a capacidade de interação com UCR2 e deste modo ativa a atividade da PDE4 (Beard e cols, 2000; Richter e Conti, 2002; Richter e Conti, 2004; Keravis e Lugnier, 2012) A extremidade da região C-terminal do domínio catalítico contém um local de fosforilação de “extracellular-signal-regulated kinases” (ERK); sua fosforilação induz a ativação de formas curtas de PDE4 e a inibição de formas longas de PDE4 (Baillie e cols, 2000). As regiões conservadas UCR1 e UCR2 apresentam uma interação potencialmente eletrostática e ligam-se através da região de ligação LR1 e a UCR2 ligada ao domínio catalítico através da região de ligação LR2. Frente as UCRs conservadas, ambas as regiões de ligação (LR1 e LR2) são altamente variáveis na sua sequência de aminoácidos entre os genes de PDE4 (Houslay e cols, 2007).

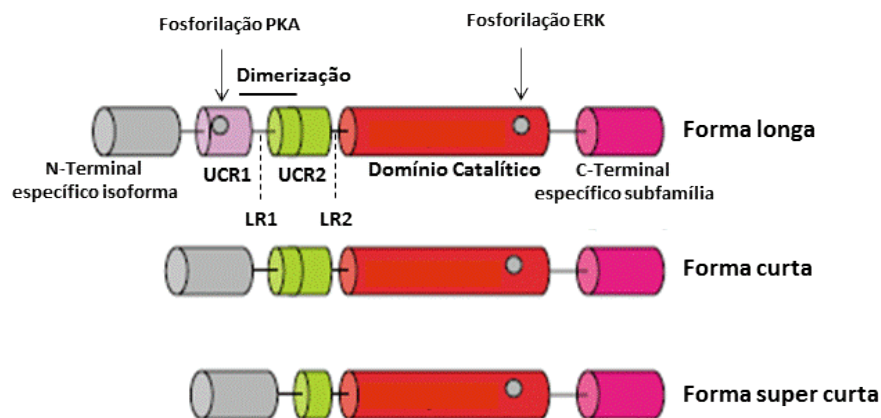


Figura 2: Organização do domínio das PDE4 nas formas super curtas, curtas e longas. O domínio catalítico conservado (mostrado em vermelho) está localizado na porção carboxi-terminal (C-terminal) das fosfodiesterases (PDEs). A região N-terminal específica da isoforma demonstrada em cinza e a região C-terminal específica de subfamília demonstrada em rosa. As regiões reguladoras UCR1 e UCR2 são demonstradas em conjunto com o domínio catalítico e locais de fosforilação de PKA (no UCR1) e ERK (no domínio catalítico). Regiões ligantes (LR1 e LR2) representados pelas linhas tracejadas. Adaptado de Houslay e cols, 2005. *Drug Discovery today*. Vol. 10, 22: 5493–5496.

O domínio catalítico central das PDE4s é altamente conservado (ca. 320-350 aminoácidos), apresentando grande homologia com as demais famílias (identidade sequencial >80% entre as famílias) e é a região responsável pela hidrólise do AMPc. A primeira estrutura do domínio catalítico a ser ilustrada foi a da PDE4B (Conti e cols, 2003; Lugnier, 2006) servindo de base para os estudos das demais PDE4s, inclusive para as outras famílias de PDEs. A composição do domínio catalítico permite uma variação na disposição e agrupamentos das 17 α -hélices que o

formam, de modo a expor resíduos críticos para a ligação do substrato e coordenação de íons metálicos envolvidos na catálise, ou mesmo gerar diferentes estados conformacionais do sítio catalítico (Xu e cols, 2000).

Os diferentes estados conformacionais podem estar associados à presença de variantes que apresentam ambos UCR1 e UCR2, que se comportam como dímeros, enquanto que as variantes com apenas uma das duas UCRs se comportam como monômeros (Lugnier, 2006). Esta dimerização provavelmente é crucial para a transmissão de alterações conformacionais na região N-terminal e alterações na conformação do domínio catalítico. Está bem esclarecido que alguns inibidores de PDE4, a exemplo do protótipo rolipram, se ligam à enzima com uma cinética que indica a presença de múltiplos estados conformacionais (Souness e Rao, 1997).

A presença de múltiplas conformações de PDE4 é relevante para a concepção de novos fármacos, visto que tem sido proposto que a conformação de baixa afinidade (apoenzima – ausência de coordenação com o íon metálico) está associada com os efeitos terapêuticos de inibidores de PDE4, enquanto que a conformação de alta afinidade (holoenzima - coordenação com o íon metálico) se correlaciona com efeitos indesejáveis no sistema nervoso e digestivo (náuseas e êmese) (Souness e Rao, 1997; Torphy, 1998). Foi observado que os compostos que não interagem com o estado de alta afinidade da enzima frequentemente não são eméticos (Souness e Rao, 1997).

Para identificar e compreender o domínio catalítico central das PDE4 e a interação com seus inibidores (figura 3), tem sido realizado estudos de cristalografia de raio-x. Estes estudos demonstraram três regiões importantes no domínio catalítico: a) região ligante de metal bivalente, representado pela letra M (Zn^{2+} , Mg^{2+} , que podem se coordenar ou não com os ligantes), esta que forma um complexo com o grupamento fosfato do AMPc; b) "bolsão" preenchido por solvente representado pela letra 'S', e c) uma região que forma um grampo (chamado de "bolso Q"), que contém resíduos de aminoácidos glutamina altamente conservados. A região do "bolso Q" é responsável pela formação de ligações de hidrogênio com os grupos purina do AMPc (Card e cols, 2004; Page e Spina, 2012; Maurice e cols, 2014). Os inibidores de PDE4 ocupam este sítio ativo através de importantes interações evitando o metabolismo AMPc, como a ligação indireta dos íons metálicos através da formação de pontes de hidrogênio com a água, interações hidrofóbicas entre a

estrutura desses inibidores e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (como a fenilalanina e isoleucina) que ancoram o inibidor dentro do sítio ativo e através de ligação de hidrogênio entre os substituintes ligados ao anel aromático destes inibidores e resíduos de glutamina (aminoácido invariante no bolso Q) que é normalmente ocupado pelo núcleo purínico do AMPc, impedindo assim, o seu metabolismo (Xu e cols, 2000; Card e cols, 2004; Wang e cols, 2007; Page e Spina, 2012; Maurice e cols, 2014). Sugere-se que esta região do domínio catalítico seja responsável pela principal interação com seus inibidores. Dessa forma, vários são os desafios para a síntese de inibidores isoforma-seletivos de PDEs, pois a alta homologia entre os resíduos de aminoácidos na região do bolso Q dificulta essa descoberta (Hagen e cols, 2014).

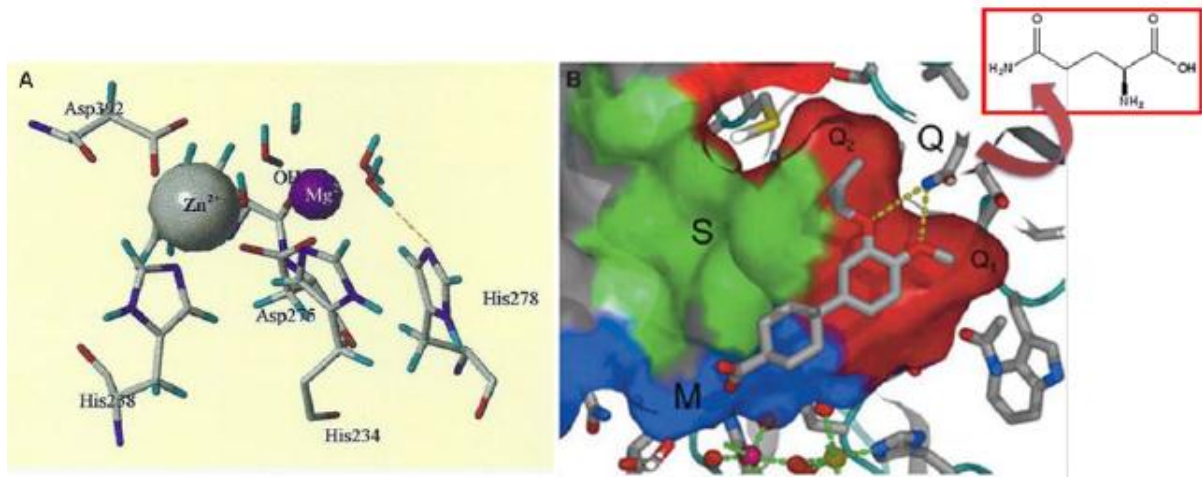


Figura 3: Domínio catalítico da PDE4. A) sítio metálico da PDE4B; B) representação do sítio ativo da PDE4B destacando as três regiões representados por M (sítio metálico), S (sítio preenchido por solvente) e Q (bolso Q - co-cristalização com o inibidor cilomilaste (2), evidenciando as interações do grupo alcoxifenila com o resíduo de aminoácido glutamina 369). Adaptado de CARD e cols, 2004, Structure 12: 2233-2247.

1.3.1 A inibição seletiva de PDE4

Inibidores seletivos das diversas famílias de PDE têm sido importantes para delinear as funções celulares e vias de sinalização específicas que são reguladas por PDEs específicas em animais e diferentes células (Beghe e cols, 2013; Maurice e cols, 2014).

Como já mencionado, a inibição da PDE nas células participantes do processo inflamatório, eleva os níveis intracelulares de AMPc, ativando cascatas de fosforilação de proteínas específicas que levam a uma variedade de respostas

funcionais. A maior concentração de AMPc promove regulação negativa da resposta inflamatória, por inibição da liberação de mediadores inflamatórios tais como as citocinas TNF- α , IL-2, IL-12, IFN- γ e autacoides como o leucotrieno B4 (LTB4). Esses mediadores celulares desempenham um papel importante na asma, DPOC, SARA, fibrose pulmonar idiopática, hipertensão pulmonar, rinite alérgica, artrite reumatoide, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, e esclerose múltipla (Turner e cols, 1993; Dinter, 2000; Kodimuthali e cols, 2008; Strupp, 2010; Diamant e Spina, 2011; Page e Spina, 2012; Kumar e cols, 2013; Maurice e cols, 2014). Paralelamente, a elevação dos níveis intracelulares de AMPc promove o relaxamento da musculatura lisa e, conseqüente broncodilatação, atividade altamente benéfica para o tratamento de doenças respiratórias como a asma e DPOC (Ngkelo e Adcock, 2013). Os níveis elevados desses nucleotídeos cíclicos têm vários outros benefícios que incluem a supressão da desgranulação de neutrófilos, inibição da liberação de mediadores dos mastócitos, a inibição da desgranulação de basófilos e inibição da ativação de monócitos e macrófagos ou inibição da resposta imune (Tilley e Maurice, 2005; Beghe e cols, 2013; Buenestado e cols, 2013).

A incapacidade da maior parte dos agentes disponíveis em distinguir as diferentes isoformas específicas das famílias de PDEs tem limitado seu valor (Beghe e cols, 2013; Maurice e cols, 2014). Dessa forma, estudos com camundongos nocautes para PDEs, RNA de interferência ou estudos que destacam a associação de diferentes mutações das PDEs com doenças humanas específicas tem sido relevantes (Spina, 2008).

Camundongos transgênicos para PDE4 demonstraram claramente o papel funcional das isoformas de PDE4. Camundongos deficientes para PDE4D são caracterizadas pelo crescimento retardado, diminuição da viabilidade e fertilidade feminina (Jin e cols, 1999), bem como apresentam um perfil antidepressivo, sugerindo que a sinalização de cAMP regulada pela PDE4D pode desempenhar um papel na patofisiologia da depressão e farmacoterapia (Lugnier, 2006).

Tem sido reportado que as vias de sinalização do cAMP e cGMP são importantes na cognição, bem como em funções e disfunções comportamentais. Estudos recentes confirmam que certas PDEs podem ser alvos para melhorar déficits cognitivos ou comportamentais. De fato, o rolipram, inibidor de PDE4, que foi

inicialmente desenvolvido como antidepressivo, demonstrou melhorar a memória e cognição a longo prazo em roedores.

Além disso, camundongos deficientes para PDE4D não desenvolvem hiperreatividade das vias aéreas a estimulação colinérgica, mesmo na ausência da sensibilização, e parece que essa resposta está associada a um aumento da produção de prostaglandina nas vias aéreas desses animais. No entanto, essa resposta foi específica para metacolina, porque a obstrução das vias aéreas em resposta a serotonina não foi afetada nesses camundongos. Estes estudos demonstram o papel importante das diferentes isoformas de PDE4 na regulação da inflamação das vias aéreas, proporcionando uma base racional para o desenvolvimento de novas terapias para diversas doenças pulmonares (Spina, 2008; Maurice e cols, 2014).

Dessa forma, o reconhecimento de que a diversidade molecular da PDE4 está acoplada à regulação de processos fisiológicos e fisiopatológicos específicos e funcionalmente importantes, tem estimulado nessas últimas décadas as indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de inibidores específicos que são seletivos para as isoformas de PDE4 (Hatzelmann e cols, 2010; Kummerle e cols, 2012; Maurice e cols, 2014).

Apesar da ampla gama de efeitos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* que os inibidores de PDE4 de primeira, rolipram (1), e segunda geração, cilomilaste (2) e roflumilaste (3) (Figura 4), apresentam, tais como anti-inflamatórios e imunomoduladores (Page e Spina, 2011; Jin e cols, 2012), antidepressivos e anti-esquizofrenia (Siuciak, 2008; Zhang, 2009) e melhora cognitiva (Rose e cols, 2005; Ghavami e cols, 2006), cabe salientar que o desenvolvimento de inibidores de PDE4 mais seguros representa um desafio, face aos efeitos adversos presentes.

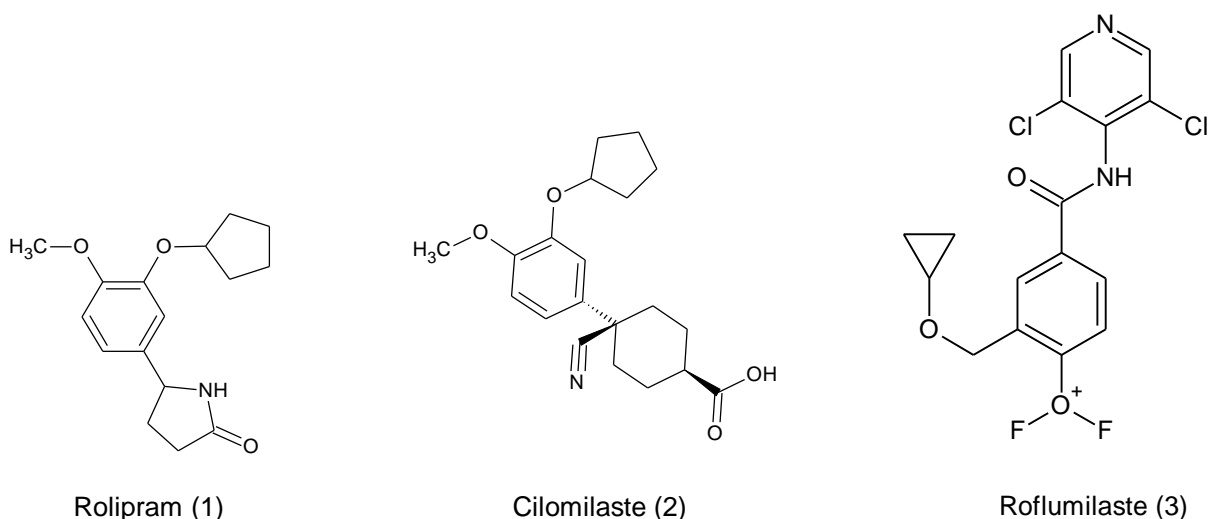


Figura 4: Inibidores seletivos de PDE4 de primeira (1) e segunda geração (2,3).

A diversidade molecular entre as PDEs foi reconhecida muito antes da Biologia e da Genética Molecular, revelando a complexidade e o grande número de PDEs. O reconhecimento de que a diversidade das PDEs é atrelada à regulação de processos fisiológicos e fisiopatológicos importantes tem estimulado a indústria farmacêutica no desenvolvimento de inibidores de segunda geração específicos que são seletivos para as famílias de PDE.

O primeiro inibidor de PDE descrito na literatura foi a teofilina, uma metilxantina de estrutura química similar à cafeína e a teobromina, utilizada para o tratamento da asma por mais de 60 anos (Butcher e Sutherland, 1962).

Por causa de sua enorme presença em tecidos e sua eficácia em modelos pré-clínicos, enzimas da família PDE3 e PDE4 foram os primeiros alvos terapêuticos. Na verdade, os inibidores de PDE3, incluindo milrinona, demonstraram ter atividade inotrópica, cardiotônica, broncodilatadora e vasodilatadora em várias espécies e foram inicialmente desenvolvidas como uma nova classe de agentes cardiotônicos na intenção de substituir ou acrescentar a glicosídeos cardíacos no tratamento da insuficiência cardíaca (Movsesian e cols, 2011; Schudt e cols, 2011; Maurice e cols, 2014).

Os inibidores de PDE4 têm atividades antidepressivas e anti-inflamatórias, mas foram inicialmente desenvolvidos para o tratamento de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e asma (Rabe, 2011; Schudt e cols, 2011; Michalski e cols, 2012; Vijayan, 2013; Giembycz e Maurice, 2014; Song e Tang, 2014). Infelizmente, as esperanças que surgiram com os estudos pré-clínicos não foram

completamente realizados em ensaios clínicos, e muitos desses inibidores PDE3 e PDE4 de segunda geração no início não foram aprovados devido à falta de eficácia e a presença de efeitos colaterais indesejáveis. Com o avanço da ciência, outros inibidores de segunda geração de PDE3 e PDE4, com perfis de risco-benefício mais favorável já estão disponíveis (Movsesian e cols, 2011; Schudt e cols, 2011; Tenor e cols, 2011).

Um dos primeiros inibidores seletivos PDE4 e mais extensivamente estudado foi o rolipram (ZK 62711), considerado um protótipo inibidor de PDE4 de primeira geração, foi inicialmente desenvolvido pela Schering AG como um agente antidepressivo (Wachtel, 1983), além de propriedades anti-inflamatórias, imunossupressoras (Sommer e cols, 1995) e efeitos antitumorais. O rolipram mostrou-se um potente inibidor de PDE dependente-AMPC em homogenatos de cérebro de ratos e sua elevada seletividade pela PDE4 foi demonstrada em PDE purificada de tecido vascular (Souness e Rao, 1997).

Contudo, apesar da comprovada eficácia terapêutica do rolipram frente a processos inflamatórios agudos e crônicos, a exemplo da sua capacidade de inibir a biossíntese de TNF- α , seu desenvolvimento como agente terapêutico foi interrompido, principalmente devido ao fato dele apresentar efeitos indesejados, comuns a vários outros inibidores de PDE4, tais como náuseas, vômitos e aumento da secreção de ácido gástrico (estudos evidenciaram que o rolipram provoca êmese em furões, mesmo em doses tão baixas quanto 0,1 mg/kg por via oral) (Giembycz, 2002). O rolipram também demonstrou ação terapêutica no tratamento da esclerose múltipla (Barad e cols, 1998; Navikas e cols, 1998; Bielekova e cols, 2009; Paintlia e cols, 2009) e esquizofrenia (Maxwell e cols, 2004; Kanen e cols, 2007). Diversos efeitos benéficos do rolipram têm sido observados em animais experimentais, tais como: melhora da memória de longo prazo, maior estado de vigília (Barad e cols, 1998; Lelkes e cols, 1998; Akar e cols, 2014) e aumento da neuroproteção (Block e cols, 2001; Paintlia e cols, 2009). A distribuição das isoformas de PDE4 no SNC, e a descoberta de sua expressão em células da microglia (PDE4B) e oligodendrócitos (PDE4A, B e D) (Whitaker e cols, 2008) levou investigação de uma possível ação neuroprotetora do rolipram após a lesão traumática do SNC. Foi demonstrado que em comparação com o estado não lesionado, houve a reversão da lesão, subsequente após o tratamento com rolipram. A inibição de PDE4 pelo rolipram ou outros agentes tem sido previamente atribuída a sua potente ação anti-inflamatória

(Dastidar e cols, 2007; Whitaker e cols, 2008) e este pode ser o mecanismo principal pelo qual rolipram proporciona neuroproteção após trauma do SNC (Schaal e cols, 2012).

Um segundo composto identificado foi o cilomilaste (SB-2077499 - Ariflo®, descoberto através de estudos que visavam à busca de inibidores seletivos de PDE4 desprovidos de ação no SNC, pelo laboratório farmacêutico na época SmithKline & Beecham (atual GlaxoSmithKline) (Barnette e cols, 1998; Griswold e cols, 1998). Este composto é um inibidor de PDE4 seletivo de segunda geração, desenvolvido para o tratamento da DPOC (Rennard e cols, 2008; Antoniu, 2011). O cilomilaste mostrou ter propriedades anti-inflamatórias e alguma eficácia clínica, incluindo a melhoria da função pulmonar e prevenção de exacerbações em pacientes com DPOC (Pace e cols, 2011; Page e Spina, 2012). No entanto, seu uso foi limitado pela eficácia inconsistente e efeitos colaterais significativos, especialmente gastrointestinais (Page e Spina, 2012; Beghe e cols, 2013; Chong e cols, 2013; Ngkelo e Adcock, 2013; Abbott-Banner e Page, 2014; Maurice e cols, 2014).

Em estudos clínicos, o cilomilaste mostrou-se capaz de induzir êmese nas primeiras doses, porém este efeito era abolido com o tratamento contínuo (Zussman e cols, 2001). Assim, em abril de 2003, cilomilaste surgiu como favorito para o tratamento de doenças inflamatórias das vias aéreas, tais como a asma e a DPOC. A eficácia e segurança terapêutica do cilomilaste foram averiguadas em vários ensaios clínicos de pacientes com DPOC. Estes estudos apontaram que na dose de 15mg, via oral, duas vezes ao dia havia uma melhora significativa da função pulmonar, bem como uma redução do risco de exacerbações agudas e da falta de ar, conseqüentemente atenuava a necessidade do uso de broncodilatador com melhora na qualidade de vida dos pacientes. O cilomilaste também se mostrou seguro e bem tolerado, porém, não diferente com o modo de ação dos inibidores da PDE4, apresentou como efeitos adversos mais comuns, diarreia, dor abdominal e náuseas (Chung, 2006; Page e Spina, 2012; Beghe e cols, 2013).

Como mais recente, encontra-se o composto roflumilaste (Daxas® Nycomed; Daliresp® Forest Pham. Inc.), atualmente comercializado, com longa ação anti-inflamatória e foi desenvolvido para reverter à inflamação sistêmica e pulmonar associada à DPOC. Foi aprovado na União Europeia para o tratamento da DPOC grave associada à bronquite crônica (Hatzelmann e cols, 2010; Price e cols, 2010; Page e Spina, 2012) e em março de 2011, ganhou a aprovação do FDA nos Estados

Unidos para reduzir as exacerbações da DPOC. É o único inibidor que até agora possui eficácia clínica com efeitos secundários limitados e toleráveis (Page e Spina, 2012; Beghe e cols, 2013; Chong e cols, 2013; Ngkelo e Adcock, 2013; Abbott-Banner e Page, 2014; Maurice e cols, 2014). O roflumilaste mostrou possuir uma potência elevada e seletividade por inibição competitiva da PDE4, sem afetar qualquer outra isoforma, a partir de vários tipos celulares e tecidos (Hatzelmann e cols, 2010). Apresentou potência similar para PDE4A e “splicing” variantes de 4B e 4D, na ordem de nanomolar. A afinidade para as “splicing” variantes de PDE4C apresentou uma potência 5 a 10 vezes inferior. Sua seletividade e mecanismo de ação também são observados para o N-óxido roflumilaste, principal metabolito ativo de roflumilaste, gerado por ação oxidativa de enzimas do sistema do citocromo P450 (CYP3A4/1A2) (Page e Spina, 2012).

Comparado ao cilomilaste, suas principais vantagens foram a administração oral dose única diária (500 µg) e efeitos adversos menos acentuados. Em ensaios clínicos de DPOC, aproximadamente 16% dos pacientes apresentaram reações adversas com a administração do roflumilaste (comparativamente a 5% no grupo tratado com placebo). As reações adversas mais frequentes foram diarreia (5,9%), redução de peso (3,4%), náusea (2,9%), dor abdominal (1,9%) e cefaleia (1,7%). A maioria destas reações adversas foi de intensidade leve ou moderada, ocorrendo principalmente nas primeiras semanas de tratamento e desaparecendo com o tratamento contínuo (Hatzelmann e cols, 2010; Price e cols, 2010; Page e Spina, 2012).

Os efeitos colaterais e a falta de tratamentos alternativos para doenças inflamatórias pulmonares crônicas, continuam a estimular os esforços na busca de um novo e seguro inibidor de PDE4, que foram ainda mais incentivados pela aprovação do roflumilaste para uso no tratamento desta doença (Price e cols, 2010; Gienbycz e Maurice, 2014).

Apesar do sucesso terapêutico de vários inibidores de PDE (PDE3, 4 e 5), seus efeitos colaterais limitam sua utilização. Os inibidores de PDE4, rolipram e cilomilaste, falharam em ensaios clínicos, devido aos efeitos colaterais, náusea e vômitos, estes associados ao centro emético no cérebro.

1.4 Planejamento e síntese de novos inibidores de PDE4

O Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) tem acumulado grande experiência na identificação e compreensão das razões moleculares de novos protótipos anti-inflamatórios (Lima e cols, 2000) e, contribuído com a pesquisa de novos inibidores de PDE4 através do planejamento racional de uma série de novos inibidores de PDE4 desenhada a partir de um protótipo descrito na literatura por Montana e cols (1998). Os autores delinearam uma série de novos inibidores de PDE4 a partir de modificações estruturais no rolipram, com o intuito de desenvolver compostos ativos por via oral que não reproduzissem as características indesejáveis do mesmo. Estes estudos evidenciaram que a substituição dos grupos amida e ciclopentila no rolipram pelos grupos sulfonamida e metoxila respectivamente, aumentou a atividade inibitória da PDE4 da nova série em relação a este composto e diminuiu seus efeitos adversos (Montana e cols, 1998).

Considerando os resultados de Montana e cols. (1998), o LASSBio apresentou o planejamento, síntese e perfil inibitório sobre a fosfodiesterase 4 de derivados 5-N-fenetil-6-metilbenzo[d][1,3] dioxola 5-sulfonamida funcionalizados, desenhada por modificações estruturais no protótipo arilsulfonamídico, descrito por inibir seletivamente a PDE-4 bruta, com potência e índice terapêutico superiores aos (R,S)-rolipram. O desenho da nova série foi realizado aplicando-se à estrutura química do protótipo estratégias clássicas da química medicinal, como o bioisosterismo não clássico (Lima and Barreiro 2005). Achados prévios revelaram a propriedade inibitória de uma série de compostos sulfonamídicos sobre a PDE4, uma enzima identificada em diferentes tipos celulares e considerada como alvo terapêutico relevante nas doenças inflamatórias pulmonares (Beasley e cols, 1998; Keravis e Lugnier, 2012; Page e Spina, 2012; Beghe e cols, 2013).

Uma vez caracterizado o perfil anti-PDE4 dos compostos, o LASSBio-448 (Figura 5) apesar de não ter se mostrado o mais potente, foi selecionado como protótipo da série utilizando-se como critério sua simplicidade estrutural, uma vez que, tal característica permitiria modificações estruturais adicionais. Desta forma, esse composto foi avaliado quanto a sua capacidade em inibir as diferentes isoformas de PDEs, no intuito de caracterizar seu perfil de seletividade anti-PDE. Os resultados evidenciaram a seletividade do LASSBio-448 para as isoformas de PDE4

quando testado na concentração de 30 μM , bem como a modulação da resposta inflamatória, remodelamento, hiper-reatividade das vias aéreas e fibrose, associadas a disfunções pulmonares inflamatórias crônicas como a asma, DPOC e a silicose (Cardozo, 2010). Contudo, sua baixa potência, associada a sua capacidade em induzir êmese, efeito adverso típico dos inibidores de PDE4, comprometem sua eventual aplicação como um candidato promissor a fármaco inibidor de PDE4, sugerindo a necessidade de otimização estrutural para ajustes de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas que por sua vez compreendem etapa de desenho estrutural, síntese de uma nova série e avaliação farmacológica comparativa ao protótipo inicial (Nunes, 2013).

Assim, a validação clínica de inibidores de PDE4 como fármacos anti-inflamatórios/anti-fibróticos em doenças pulmonares como a LPA e a silicose, representa uma perspectiva importante no campo da saúde pública, permitindo uma redução nos gastos investidos no tratamento paliativo da silicose, bem como no número de internações.

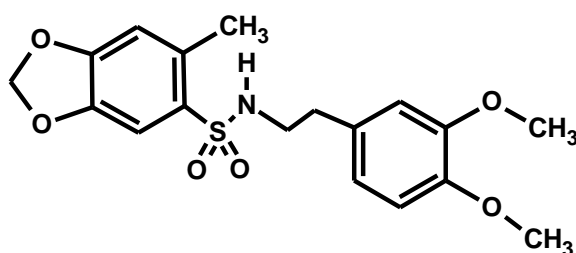


Figura 5: Estrutura química do LASSBio-448.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Neste projeto objetivamos realizar a triagem de uma série de compostos sulfonamídicos e sulfonilidrazônicos, desenhados como inibidores de fosfodiesterase 4, a partir de modificações estruturais realizadas do protótipo LASSBio-448. Este estudo incluiu, também, a análise farmacológica do efeito destes compostos em sistemas *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Triagem dos derivados de LASSBio-448 quanto à atividade inibitória sobre a enzima PDE4;

2.2.2 Triagem dos derivados de LASSBio-448 em sistema de ativação de macrófagos alveolares estimulados com LPS *in vitro*;

2.2.3. Avaliação do efeito dos derivados de LASSBio-448 selecionados nas etapas anteriores, em modelos experimentais de doença pulmonar aguda e crônica (silicose). Foram analisados os parâmetros de função pulmonar, componentes inflamatório e fibrogênico e geração de citocinas no tecido pulmonar. A potencial atividade sobre fibroblastos *in vitro* foi também investigada.

2.2.4. Avaliação do efeito central dos derivados de LASSBio-448 selecionados no modelo experimental de anestesia por cetamina/xilazina.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

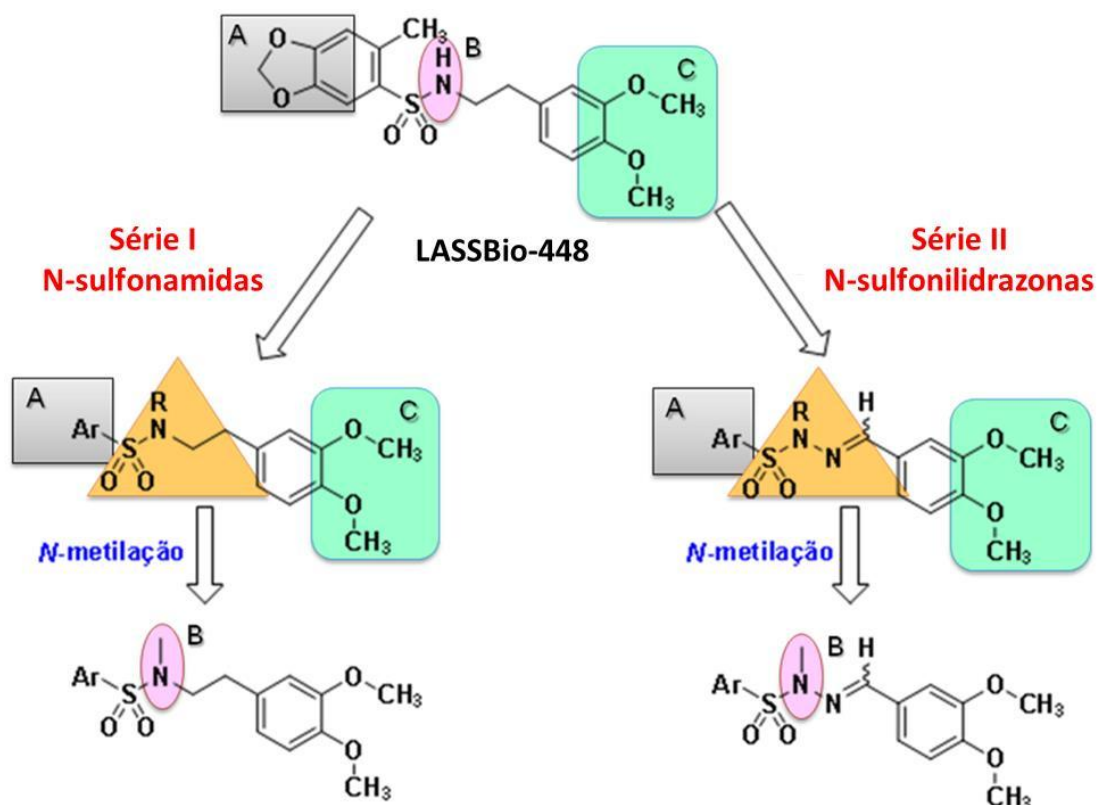
Foram utilizados camundongos machos e fêmeas (18 – 20 g) da cepa AJ, e camundongos machos da cepa Swiss-Webster, provenientes do Centro de Experimentação e Controle de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em estantes aclimatizadas com temperatura e umidade controladas ($21 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 10\%$, respectivamente), sendo submetidos ao ciclo de claro e escuro de 12 h e livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz sob Licença nº L-034/09.

3.2 Planejamento estrutural dos análogos de LASSBio-448¹

A construção racional das duas séries de compostos, sulfonamídicos (série I) e sulfonilidrazônicos (série II), foi planejada utilizando-se estratégias clássicas da Química Medicinal (Lima e Barreiro 2005; Barreiro e Fraga 2008) sobre a estrutura do protótipo LASSBio-448 (Figura 5). O desenho molecular foi realizado propondo-se a variação da natureza das subunidades arila ligada ao átomo de enxofre da função sulfonamida de LASSBio-448. A eleição da subunidade arila e seus substituintes foi planejada com o objetivo de investigar a relevância da diversidade de interações moleculares e propriedades físico-químicas introduzidas pelas modificações.

Resultados obtidos por Nunes e cols. indicaram que os compostos *N*-metilados apresentaram maior potência frente à inibição de PDE4, indicando uma influência positiva da presença da metila como substituinte do nitrogênio sulfonamídico. Desta feita, a estratégia de homologação baseada na introdução do grupo metila nos *N* sp³ da função sulfonamida e sulfonilidrazona (subunidade **B**, Esquema 1). A *N*-metilação visou investigar sua contribuição na modulação das propriedades anti-PDE4, decorrente de alterações conformacionais e estéricas introduzidas nos compostos das séries I e II. O sistema 3,4-dimetoxifenila foi mantido como substituinte em **C** (Esquema 1), por representar, de acordo com os resultados de inibição enzimática, a unidade farmacofórica para a atividade inibitória da PDE4.

¹Realizado por Isabelle Karine da Costa Nunes, constituindo objeto de sua tese de Doutorado, sob a orientação da Dr^a. Lídia Moreira Lima do LASSBio® -UFRJ, defendida em 2013.

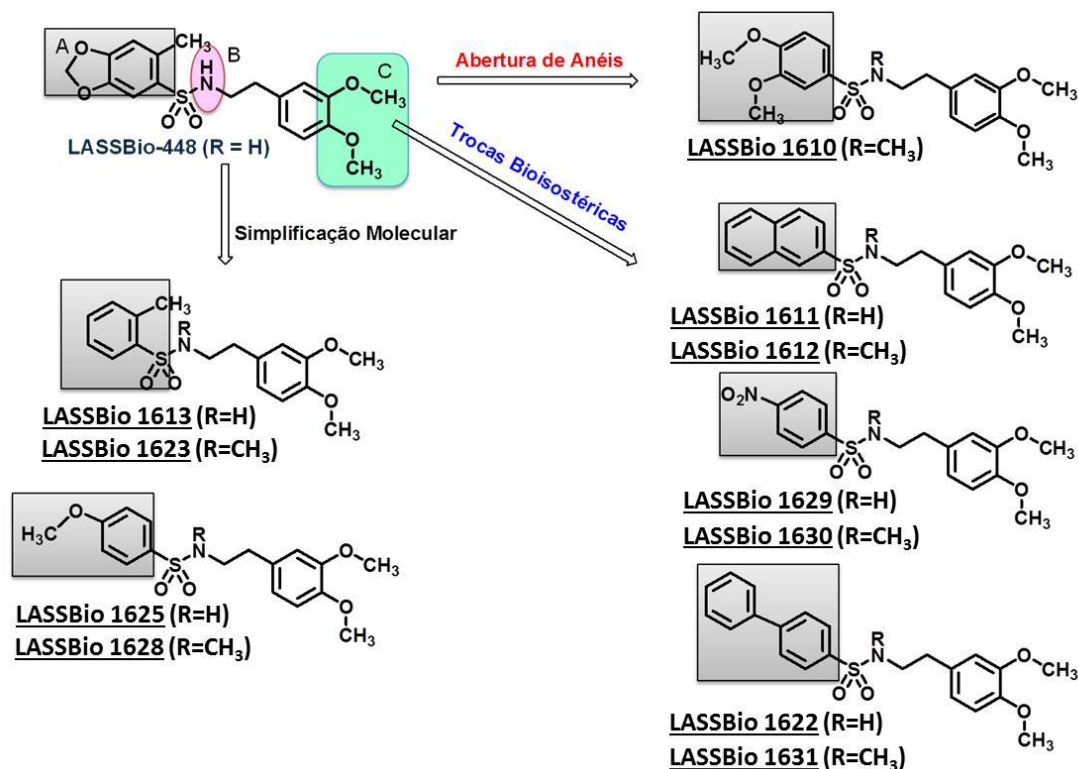


Esquema 1: Planejamento estrutural das séries I e II como inibidores de PDE-4 análogos de LASSBio-448. Adaptado de Nunes (2013).

O planejamento estrutural dos derivados sulfonamídicos da série I (Esquema 2), foi realizado através da remoção da subunidade metilenodioxila e substituição na subunidade arila (**A**) de LASSBio-448, por grupos elétron retiradores e ou elétron doadores.

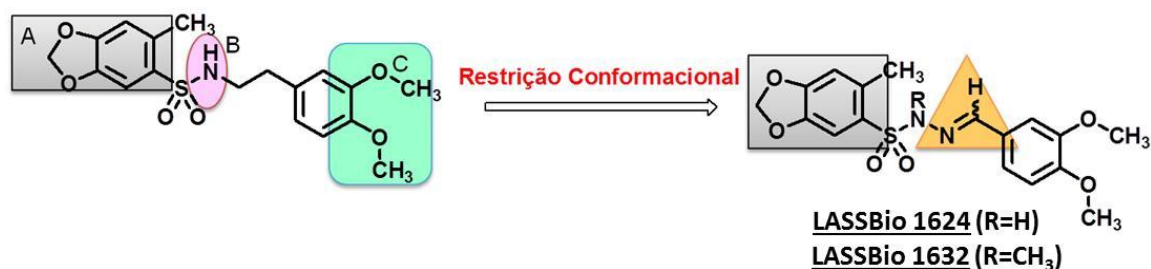
Deste modo, foram propostos anéis aromáticos mono substituídos, *i.e.* *para*-nitro (LASSBio-1629 e -1630), *para*-metoxila (LASSBio-1625 e -1628) e *orto*-metila (LASSBio-1613 e -1623), visando compreender as contribuições de suas diferentes propriedades eletrônicas para atividade anti-PDE4 (Esquema 2). A troca do anel fenila de LASSBio-448 pelos substituintes 1-naftila (LASSBio-1611 e -1612) e 1-bifenila (LASSBio-1622 e -1631), foi proposta considerando a presença destas subunidades em várias substâncias de origem natural como terpenos peptídeos, policetídeos e alcaloides com propriedades farmacológicas (Martins, 2010) e visaram explorar a contribuição de interações hidrofóbicas com o sítio ativo da PDE4. Tais modificações visaram estudar as diferenças conformacionais para a atividade anti-PDE. Ademais, visou reproduzir a presença da subunidade

dimetoxifenila, farmacofórica em ambas as extremidade dos compostos (LASSBio-1612) (Lima e Barreiro, 2005).



Esquema 2: Planejamento estrutural dos compostos sulfonamídicos da série I desenhados por modificações no protótipo inibidores de PDE4 LASSBio-448. Adaptado de Nunes (2013).

Para o desenho estrutural da série II (Esquema 3) a partir do protótipo LASSBio-448 aplicou-se a estratégia de bioisoterismo não-clássico de restrição conformacional pela substituição da unidade etila pela imina (N=C), resultando na construção da função sulfonilidrazona. Tal modificação teve como objetivo observar se haveria aumento da afinidade destes compostos por seu alvo molecular (*i.e* PDE4), através da redução da liberdade conformacional presente na sulfonamida LASSBio-448 (Kummerle e cols, 2012). De forma análoga, a série I, foi proposta a homologação dos compostos da série II a partir da N-metilação do N da função sulfonilidrazona.



Esquema 3: Planejamento estrutural dos compostos sulfonilidrazônicos da série II protótipos inibidores de PDE4 análogos conformacionalmente restritos de LASSBio-448. Adaptado de Nunes (2013).

3.3 Ensaio para triagem de compostos com atividade anti-PDE4

O ensaio da avaliação da atividade anti-PDE4 foi realizado através de uma reação enzimática utilizando o AMPc como substrato fluorescente. A tecnologia IMAP FP consiste de um sistema de análise para triagem de fosfodiesterases independente de anticorpos e baseado nas interações específicas de alta afinidade do grupo fosfato por metais trivalentes à base de nanopartículas. Esta interação do reagente de ligação aos metais trivalentes e o grupo fosfato gerado sobre monofosfato de nucleotídeos a partir de AMPc/GMPc, por meio de fosfodiesterase, leva a uma redução na velocidade de rotação do substrato e, portanto, aumenta a sua polarização (Figura 6).

Em resumo, a uma placa preta de baixa afinidade de 96 poços e de fundo chato, foram adicionados 25 μ L do reagente FAM-cAMP (200 nM), 5 μ L dos compostos a serem testados (Concentração final = 300 pM a 100 μ M) e 20 μ L de PDE4A1A (0,2 mg/mL), PDE4B1 (1,26 mg/mL), PDE4C (0,07 mg/mL) ou PDE4D3 (0,28 mg/mL). Após homogeneização e incubação de 1 h à temperatura ambiente, foram adicionados 120 μ L da solução de ligação, ao que se seguiu nova incubação de 1 h à temperatura ambiente. As leituras de fluorescência polarizada foram realizadas a 485 nm de excitação e 520 nm de emissão em leitor SpectraMax M5 (Molecular Devices). Reagentes: IMAP™ FP Screening Express with Progressive Binding Kit e FAM-Cyclic-3',5'-AMP (Molecular Devices); Rolipram (Sigma); PDE4A1A; PDE4B1; PDE4C e PDE4D3 (BPS).

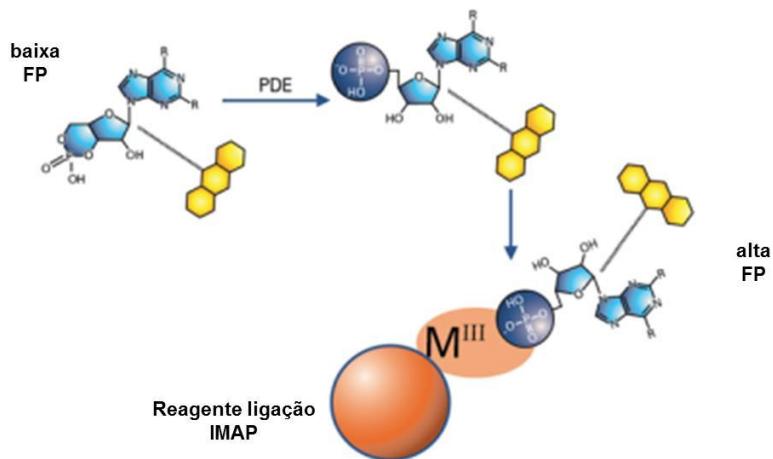
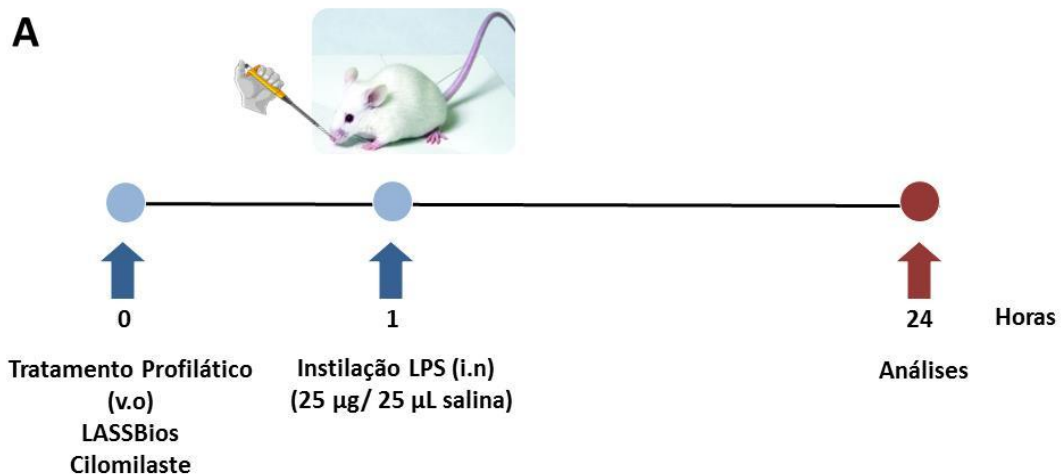


Figura 6: Princípio IMAP utilizando Fluorescência Polarizada.

3.4 Indução da lesão pulmonar aguda por lipopolissacarídeo (LPS)

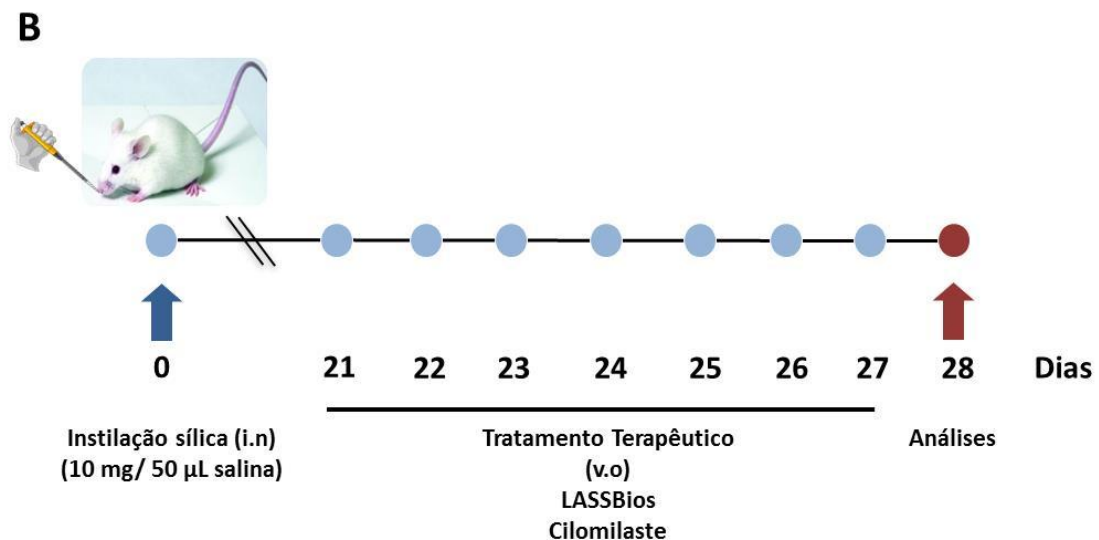
Para indução da inflamação pulmonar aguda foi utilizada estimulação com lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli* 0127:B8 (L-3880, Lot 87H4082), Sigma-Aldrich, EUA) (Esquema 4). Os animais foram submetidos à anestesia mediante aerolização de uma mistura contendo isoflurano (0,5%) e ar atmosférico, até completa sedação. Em seguida, os animais foram instilados por via intranasal com LPS 25 µg/25 µL salina, gotejados em ambas as narinas com auxílio de uma pipeta automática. Os animais do grupo controle receberam igual volume de salina estéril intranasal (Kümmerle e cols, 2012)



Esquema 4: Esquema indução da lesão pulmonar aguda por LPS e tratamentos

3.5 Indução da Silicose

Para indução da silicose, os animais foram submetidos à anestesia mediante aerolização de uma mistura contendo isoflurano (0,5%) e ar atmosférico, até completa sedação. Em seguida, os animais foram instilados, por via intranasal com 10 mg sílica/50 μ L salina (SiO_2 ; partícula: 0,5 - 10 μ m; Sigma-Aldrich, EUA), gotejados em ambas as narinas com auxílio de uma pipeta automática (Esquema 5). Os animais do grupo controle receberam igual volume de salina estéril intranasal (Ciambarella, 2013).



Esquema 5: Esquema indução da silicose experimental e tratamentos

3.6 Tratamentos

Os animais receberam a administração dos compostos por via oral, seguindo protocolo específico e conforme modelo experimental utilizado. No caso da estimulação com LPS, os animais receberam administração dos compostos LASSBios (6,25, 12,5 e 25 μ mol/kg) e do inibidor de PDE 4 clássico cilomilaste (3 μ mol/kg), 1 hora antes da instilação com o LPS.

No caso da estimulação com partículas de sílica, os compostos LASSBios (1, 3 e 10 μ mol/kg), foram administrados diariamente, durante 7 dias consecutivos, iniciando-se 21 dias após o desafio. Os compostos LASSBios foram dissolvidos com Tween 80 (%) e cilomilaste (3 μ mol/kg) em salina 0.9%, imediatamente antes do uso.

3.7 Função Pulmonar e Hiper-reatividade das Vias Aéreas

Para os testes de mecânica respiratória, avaliando os parâmetros de resistência das vias aéreas ($\text{cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}/\text{mL}$) e elastância pulmonar ($\text{cmH}_2\text{O}/\text{mL}$), referentes à função pulmonar, foram mensurados em pletismógrafo barométrico de corpo inteiro invasivo (Finepointe, Buxco Research System). Para tanto, os camundongos foram anestesiados com nembutal (Pentobarbital) (60 mg/kg, i.p.) e curarizados com brometo de pancurônio (Pavulon®, 1 mg/kg). Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e traqueostomizados, dispostos em câmaras individualizadas e aquecidas (37°C), e feita inserção de uma cânula que é conectada a um pneumotacógrafo para captura da pressão esofágica (Mortola & Noworaj, 1983). A cânula traqueal foi conectada a um ventilador mecânico, com fluxo (200 μL) e volume (2 - 5 mL) corrente sendo mantidos constantes, para registro dos parâmetros da função pulmonar. Após a estabilização dos valores de resistência e elastância, os animais foram submetidos à aerolização com PBS e ao agente broncoconstritor metacolina (3 - 27 mg/mL), sendo em seguida feita a medida da função pulmonar por um período de 5 minutos. Os valores de resistência e elastância foram registrados e avaliados no Software Buxco Biosystem XA (Hoymann 2007).

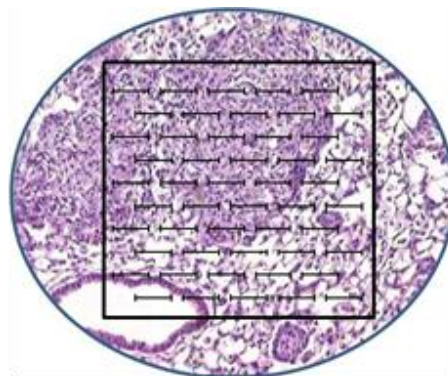
3.8 Análise Histológica

Os animais foram eutanasiados com pentobarbital sódico (250 mg/kg); exanguinados através de um corte na veia cava abdominal e o pulmão foi perfundido com solução de salina (NaCl 0,9%) e EDTA (10 mM), através da inserção de um escalpe no coração (ventrículo direito). O lobo esquerdo foi retirado e fixado em solução Milloning (155 mM NaH_2PO_4 ; 105 mM NaOH; Formol 10%; qsp H_2O destilada 1L), sendo mantido por no mínimo 48 horas. Após a etapa de fixação, o tecido foi desidratado através de sucessivos banhos em soluções com concentrações crescentes de etanol (70 a 100%), por aproximadamente 10 minutos em cada etapa. O material foi clarificado em xilol por aproximadamente 15 min e submetido a sucessivos banhos de parafina até a sua inclusão e confecção dos blocos. As amostras de tecido foram cortadas em micrótomo (Leica – RM 2125RT) na espessura de 5 μm , e submetidas à coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E)

para visualização dos componentes pulmonares estruturais e a Picrus sirius para visualização de fibras colágenas (Montes e Junqueira, 1991). Foram realizados cortes para imunohistoquímica separadamente. As análises foram realizadas em microscópio de luz (Olympus U-TV1X), acoplado a uma câmera de vídeo (Olympus Q Color 3 – 0044C-194), e a captura realizada mediante o uso de um “software” de análise (Q Capture). As imagens foram analisadas através do software Image-Pro plus (Media Cybernetics).

3.9 Análise morfométrica

Para a análise morfométrica, os cortes histológicos corados com H&E, foram analisados em microscópio de luz (BX51, Olympus) e fotografados através de câmera digital (C-7070, Olympus). Após a capturas das imagens, a morfometria foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”), que tem como base um sistema de ocular acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos paralelamente (Esquema 6). Através da utilização da objetiva de 20x foi realizada a contagem dos pontos coincidentes com área onde haja presença de granuloma, feita em dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. O número de pontos contados foi dividido pelo número total de pontos no retículo, obtendo-se assim a fração da área do tecido pulmonar ocupado por granuloma, sendo o resultado expresso sob a forma de percentual (Cruz-Orive e Weibel, 1990; Sake e cols, 1994).



Esquema 6: Esquema do retículo de 50 linhas e 100 pontos utilizado para a análise morfométrica.

3.10 Quantificação de colágeno

A técnica de Sircol® (Kit Biocolor, Inglaterra) tem como base a análise quantitativa de colágeno. As amostras foram previamente maceradas em 1 mL de solução de homogeneização (Tris-Base 0,05M; NaCl 1M; inibidores de protease – Complete, Roche, pH 7.5) e incubados “overnight” à 4°C. Após esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação por 15.000 x *g* por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e com 20 µL foi realizada a reação. Inicialmente foram adicionados 250 µL do reagente Sircol dye às amostras. As mesmas permaneceram sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente e após esse período foram centrifugadas à 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensado em 250 µL do reagente Alkaline. Em seguida, homogeneizado por 10 minutos e 200 µL da amostra final foram transferidos para placas de 96 poços. A análise foi realizada em espectrofotômetro, a absorbância determinada no comprimento de 555 nm e o resultado expresso em µg colágeno/mg de tecido.

3.11 Quantificação de mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da presença de polimorfonucleares neutrófilos foi realizada de forma indireta mediante quantificação da MPO, uma enzima armazenada no interior dos grânulos destas células. Para tanto, os pulmões foram homogeneizados (Politron PT-3000 (Brinkman) em solução contendo HTAB (brometo de cetildimetiletilamonônio) 0,5%, 5 µM EDTA (Etileno Diamino Tricloro Acético) e PBS 1X; centrifugados por 15 min a 3.082 x *g* a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi recentrifugado por 15 min a 15.294 x *g* a 4°C. Pipetaram-se 50 µL da amostra em duplicata na placa de 96 poços, 50 µL da solução de homogeneização, 50 µL de orto-dianisidina (0,68 mg/mL) e 50 µL de H₂O₂ (0,006%). Após 5 min, foram adicionados 50 µL de azida 1% para parar a reação. A análise da densidade óptica foi realizada em leitora de placa SpectraMax M5 (Molecular Devices) em comprimento de onda de 460 nm (Ferreira e cols, 2007).

3.12 Quantificação de mediadores por ELISA

O tecido pulmonar foi homogeneizado em 1mL de solução de PBS contendo Triton (0,1%) e inibidores de protease (complete, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel Suíça) e mantidos à 4°C “overnight”. As amostras foram centrifugadas a 2019 x g por 10 minutos e o sobrenadante separado para posterior análise. Em placa de 96 poços de fundo chato, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo capturador diluído em tampão PBS 1%, por um período de incubação de 18 h à temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados quatro vezes com tampão 1 (timerosal, KPO₄ 1M e Tween 20 0,005%) (300 µL/poço). Posteriormente, para bloquear os sítios inespecíficos foram adicionados à placa 250 µL da solução contendo PBS/BSA 1%, por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi novamente lavada com o tampão 1 e, em seguida, foram adicionadas as amostras e os padrões diluídos em tampão PBS/BSA 1% e adicionados aos poços (100 µL/poço). Após o período de incubação (2 h à 37°C), foram realizadas novas lavagens com o tampão 2 (timerosal, NaPO₄ 1M, KCl 2,7M e Tween 20 0,005%) (300 µL/ poço). Em seguida, foi adicionado o anticorpo detector biotilado (100 µg/mL) e a incubação manteve-se por 1 h à 20°C. Os poços foram novamente lavados com o tampão 2, seguido pela fase de incubação durante 1 h à temperatura ambiente com a mistura neutravidina-“horseradish peroxidase” (HRP) diluída no tampão BSA 1%. Após a última lavagem com tampão 2 foi adicionado o substrato (K-blue ®) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (aproximadamente de 5 a 30 min), que foi interrompida, após a adição de H₂SO₄ 0,19 N. A análise espectrofotométrica foi realizada em leitor de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices) em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de citocina ou quimiocina (pg) por pulmão direito.

3.13 Duração da anestesia

Para análise do tempo de anestesia, os camundongos A/J foram anestesiados com uma combinação de cetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal em injeção única. Após 15 min, os animais foram tratados por via subcutânea com os compostos LASSBios (6,25 - 100 µmol/kg) e, subsequentemente colocados em decúbito dorsal. O composto padrão, rolipram, foi

utilizado na dose de 50 $\mu\text{mol/kg}$. O retorno do reflexo de endireitamento (saída da posição de decúbito dorsal para ventral) foi utilizado como um “endpoint” para medir a duração da anestesia. No caso dos animais controles, assim como nos grupos tratados, o tempo “cut-off” foi de 120 minutos após a administração dos compostos testes. Para os animais que não retornaram à posição supina, registramos a máxima quantidade de tempo permitido (Robichaud e cols, 2001 e 2002a/b).

3.14 Cultura de Células

3.14.1 Macrófagos Alveolares

Foi utilizada a linhagem de macrófagos alveolares murinos AMJ2C11, proveniente do banco de célula do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (1×10^6 U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL), e para a realização do experimento foi utilizada a concentração de $0,25 \times 10^6$ células/poço. As células foram incubadas em meio DMEM com 2% de SBF “overnight” à 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram estimuladas com LPS por um período 6 h, em estufa à 37°C com 5% de CO₂, e o sobrenadante recolhido e armazenado em freezer -80°C para quantificação da produção de TNF- α por ELISA. No caso dos tratamentos, adicionamos os compostos LASSBios e cilomilaste (10^{-6} à 10^{-4} M) 1 h antes da estimulação com LPS.

3.14.2 Fibroblastos Pulmonares

Os fibroblastos pulmonares foram obtidos de camundongos instilados com salina (7 dias), a partir de processo de digestão enzimática colagenase tipo I (1 mg/mL) durante 2 horas. As amostras foram centrifugadas a $504 \times g$, à 4 °C durante 10 min e o “pellet” ressuspenso e plaqueado em garrafa médias contendo meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (1×10^6 U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL). Após a terceira passagem, as células foram submetidas ao processo de tripsinização (Tripsina 1,25 g/L + EDTA 0,2 g/L), contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $12,5 \times 10^3$ células/poço. Para a análise da proliferação celular foi utilizada a técnica de

incorporação de timidina⁺³H. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram incubadas com LASSBio-448, LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631, LASSBio-1632, rolipram e cilomilaste (10^{-6} à 10^{-4} M) e, em seguida, estimuladas com IL-13 (40 ng/mL). Após 20 horas foram adicionados 0,5 μ Ci de timidina⁺³H (Metil-³H-Timidina; Amersham) e, feita incubação por 4 horas. O DNA marcado foi transferido para um filtro que posteriormente, foi imerso em líquido de cintilação. A leitura da radioatividade foi realizada em contador beta (Beckman, Série LS-6500).

3.14.3 Viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o ensaio colorimétrico com base na utilização do reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Para tanto as células foram tripsinizadas, e em seguida adicionadas a placas de 96 poços, na densidade de 2×10^4 células por poço. Uma hora após, os compostos foram adicionados e incubação por 21 horas. Em seguida, foi adicionado a solução de MTT (0,5 mg/mL) e as células foram incubadas durante 3 horas. Após esse período a placa foi centrifugada à $2.800 \times g$ por 3 minutos à 4°C . O sobrenadante foi descartado e os cristais residuais dissolvidos com DMSO 100%. A análise da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro a 540nm.

3.15 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de “Newman-Keuls-Student”. Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o teste “t” de Student para amostras não pareadas. No caso da análise da área de granuloma os parâmetros apresentados em forma percentual foram submetidos à transformação arcoseno a fim de tornar sua distribuição próxima ao normal, permitindo, assim, a realização dos testes de variância descritos acima (Zar, 1996). Para ambos os testes, os valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

A proposta do presente estudo foi a identificação e caracterização farmacológica de uma série de derivados da classe das sulfonamidas, desenhada a partir do protótipo LASSBio-448, tendo como base a utilização de sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*.

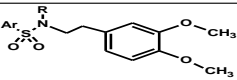
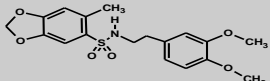
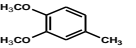
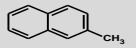
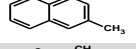
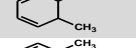
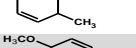
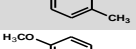
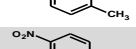
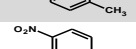
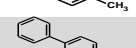
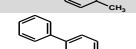

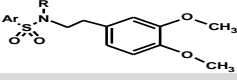
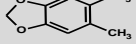
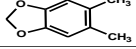
4.1. Atividade enzimática de PDE4 *in vitro*

Inicialmente foi realizada a triagem de uma nova série de derivados de LASSBio-448, que teve como princípio a inibição da atividade enzimática de isoformas de PDE4 humana (A1A, B1, C e D3), utilizando o sistema de IMAP™ TR-FRE de *binding* progressivo. Os compostos foram inicialmente testados nas concentrações de 10 µM e 100 µM (Tabela 2), sendo posteriormente selecionados aqueles que inibiram em torno de ou acima de 50% alguma das isoenzimas de PDE4 testadas. Conforme pode ser visto na tabela 2, os compostos de referência rolipram e cilomilaste apresentaram atividade inibitória sobre as quatro isoformas de PDE4, com o último mostrando-se mais potente. O protótipo LASSBio-448 apresentou menor efeito inibitório quando comparado àquele do rolipram e do cilomilaste, no que tange as enzimas PDE4A1A e PDE4C, enquanto que nenhuma ação foi detectada na PDE4B1 e PDE4D3. Com base na inibição da atividade das enzimas em 50% ou mais, os derivados LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 e LASSBio-1632 foram selecionados para os estudos subsequentes, considerando-se as isoenzimas PDE4A1A e PDE4D3. Nenhum dos derivados apresentou efeito supressor sobre as isoformas PDE4B1 e PDE4C.

De forma complementar, a análise da curva de efeito revelou que os compostos referência rolipram e cilomilaste apresentaram valores de CI50 de 351,7 nM, 954,2 nM, 914,8 nM, 638,9 nM e 231,7 nM, 295,7 nM, 444,3 nM, 285,3 nM para as isoformas PDE4A1A, PDE4B3, PDE4C e PDE4D3, respectivamente (Gráfico 1A-D). Em conjunto, nossos resultados mostraram uma melhora na atividade dos compostos LASSBio-1612, -1628 e -1631 em relação ao protótipo LASSBio-448, verificada nas maiores concentrações, porém não foi possível determinar suas potências (Gráfico 1). Entretanto, LASSBio-1632, apresentou CI50 de 477,1 nM e 703,1 nM para PDE4A e PDE4D, respectivamente, valores semelhantes aos do

padrão rolipram, cujas CI_{50} foram de 351,7 nM e 638,9 nM. O LASSBio-1632 apresentou maior seletividade para as isoformas de PDE4A e PDE4D diferentemente do padrão cilomilaste que não se mostrou seletivo para as isoformas estudadas.

Tabela 2: Análise do percentual de inibição da atividade catalítica da PDE4A1A, PDE4B3, PDE4C e PDE4D3 por compostos derivados do LASSBio-448.

Compostos	Ar	R	Porcentagem de Inibição							
			PDE4A1A		PDE4B1		PDE4C		PDE4D3	
			10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M
	-----	-----	91,0 \pm 0,4	97,9 \pm 1,3	52,9 \pm 1,2	73,0 \pm 1,3	9,31 \pm 1,3	68,9 \pm 1,6	72,9 \pm 1,2	93,0 \pm 1,3
Cilomilaste	-----	-----	91,3 \pm 0	99,3 \pm 3,6	91,3 \pm 2,7	98,1 \pm 2,9	98,5 \pm 3,6	99,3 \pm 0	98,8 \pm 2,1	99,4 \pm 4,1
LASSBio-448			11,8 \pm 1,1	50,3 \pm 0,8	0,9 \pm 0,9	0 \pm 0	21,3 \pm 1,3	51,3 \pm 0,8	0 \pm 0	5,8 \pm 5,8
LASSBio-1610		CH ₃	37,1 \pm 1,7	75,9 \pm 0,6	12,0 \pm 4,3	0,9 \pm 0,9	16,4 \pm 4,6	61,1 \pm 2,7	31,1 \pm 1,1	82,7 \pm 1,3
LASSBio-1611		H	30,4 \pm 1,2	87 \pm 0,3	0,7 \pm 0,4	0,3 \pm 0,3	12,1 \pm 5,2	50,0 \pm 5,2	9,1 \pm 2,1	45,7 \pm 6,5
LASSBio-1612		CH ₃	89,9 \pm 10,1	97,6 \pm 2,4	12,2 \pm 1,7	8,4 \pm 0,6	30,1 \pm 1,0	44,0 \pm 13,0	50,1 \pm 2,1	73,9 \pm 3,8
LASSBio-1613		H	6,1 \pm 9,0	42,9 \pm 3,5	0 \pm 0	0 \pm 0	0,5 \pm 0,5	24,6 \pm 0	4,2 \pm 0,5	41,7 \pm 0,3
LASSBio-1623		CH ₃	25,9 \pm 0,3	71,7 \pm 1,0	26,5 \pm 1,1	0 \pm 1,7	0 \pm 0	50,0 \pm 2,1	27,6 \pm 0,9	81,4 \pm 2,3
LASSBio-1625		H	11,0 \pm 1,6	47,2 \pm 1,2	0 \pm 0	0 \pm 0	20,7 \pm 4,2	42,2 \pm 0,3	23,8 \pm 0,3	73,5 \pm 0,2
LASSBio-1628		CH ₃	44,0 \pm 5,6	79,1 \pm 2,0	33,0 \pm 0,4	5,6 \pm 5,6	23,5 \pm 3,1	45,9 \pm 1,7	35,6 \pm 0,5	71,9 \pm 1,6
LASSBio-1629		H	0,0 \pm 0,0	4,0 \pm 4,0	13,8 \pm 13,8	0 \pm 0	0 \pm 0	3,7 \pm 3,7	0 \pm 0	0 \pm 0
LASSBio-1630		CH ₃	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0 \pm 0	6,8 \pm 6,8	19,0 \pm 19,0	2,8 \pm 2,8	0 \pm 0	13,4 \pm 5,7
LASSBio-1622		H	14,8 \pm 0,9	66,2 \pm 4,9	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	10,8 \pm 0,6	24,8 \pm 1,8
LASSBio-1631		CH ₃	47,8 \pm 0,5	65,6 \pm 0,1	7,1 \pm 1,0	0 \pm 0	26,6 \pm 26,6	36,0 \pm 2,0	56,3 \pm 2,5	60,4 \pm 2,6
										
LASSBio-1624		H	3,6 \pm 2,7	17,8 \pm 1,8	0 \pm 0	3,62 \pm 0	5,9 \pm 2,3	5,9 \pm 5,9	8,8 \pm 0,6	14,5 \pm 0,3
LASSBio-1632		CH ₃	90,4 \pm 0,2	95,4 \pm 1,9	22,7 \pm 2,4	0,8 \pm 0,5	25,5 \pm 10,2	3,4 \pm 0,6	90,7 \pm 1,5	93,0 \pm 0,8

Os compostos de referência rolipram e cilomilaste foram utilizados como controles. Os valores representam média \pm erro padrão da média de duplicatas de 3 experimentos independentes.

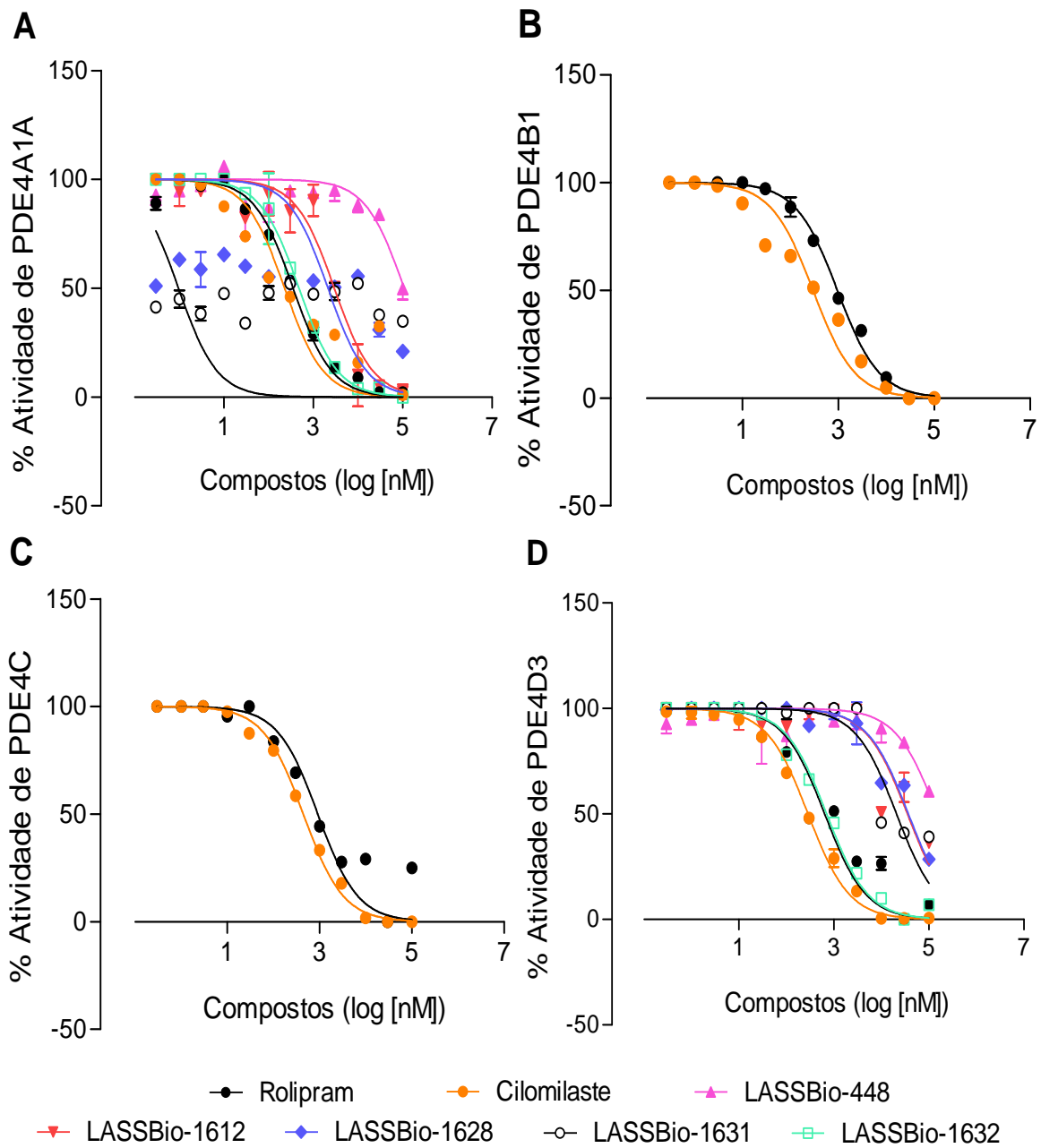


Gráfico 1: Curva dose-resposta da atividade catalítica dos derivados de LASSBio-448 sobre as isoenzimas PDE4A1A (A), PDE4B1 (B), PDE4C (C) e PDE4D3 (D). Foram avaliados os compostos referências rolipram e cilomilaste, além de LASSBio-448 e seus derivados LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631, LASSBio-1632. Os valores representam média \pm E.P.M. de duplicatas de 3 experimentos independentes.

4.2 Ativação de macrófagos *in vitro*

Considerando-se que os macrófagos são células fundamentais para o desenvolvimento da resposta inflamatória, principalmente de natureza inata, partimos para avaliar o potencial efeito dos quatro derivados selecionados sobre a ativação de macrófagos alveolares murinos (linhagem AMJ2C11). Para tanto as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS - 1 µg/ml) *in vitro* e tivemos a produção da citocina TNF- α como sistema de análise.

Conforme evidenciado no Gráfico 2, a estimulação dos macrófagos com LPS levou a um marcado aumento nos níveis de TNF- α no sobrenadante, 6h após, em comparação ao verificado na condição das células controles (incubadas apenas com meio). O pré-tratamento das células, por 1 h, com o fármaco de referência rolipram assim como com os compostos com LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631, nas concentrações de 1 – 100 µM, reduziu significativamente a produção de TNF- α pelos macrófagos. Entretanto, no caso do composto LASSBio-1632, verificamos que nas menores concentrações (1 – 10 µM) houve inibição da produção de TNF- α , enquanto que a concentração de 100 µM induziu uma exacerbação nos níveis desta citocina secretada no sobrenadante (Gráfico 2). Estes dados se mostram correlacionados com aqueles observados na condição das células controles, onde nenhum efeito foi detectado com os compostos LASSBio-1612 LASSBio-1628 e LASSBio-1631, porém LASSBio-1632 induziu aumento dos níveis de TNF- α .

Passamos, então, ao teste de viabilidade celular. Vimos que a incubação com o padrão rolipram (10 e 100 µM) e LASSBio-1632 na maior concentração (100 µM) apresentaram atividade citotóxica, enquanto que os demais compostos não apresentaram qualquer efeito (Gráfico 3).

Considerando os achados acima descritos, indicativos da existência de quatro compostos detentores de atividade inibitória sobre isoenzimas da PDE4 e inibitória sobre a funcionalidade de macrófagos, como passo seguinte partimos para investigar o potencial efeito dos referidos compostos (LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631, LASSBio-1632) sobre modelos experimentais de inflamação pulmonar aguda e crônica em camundongos.

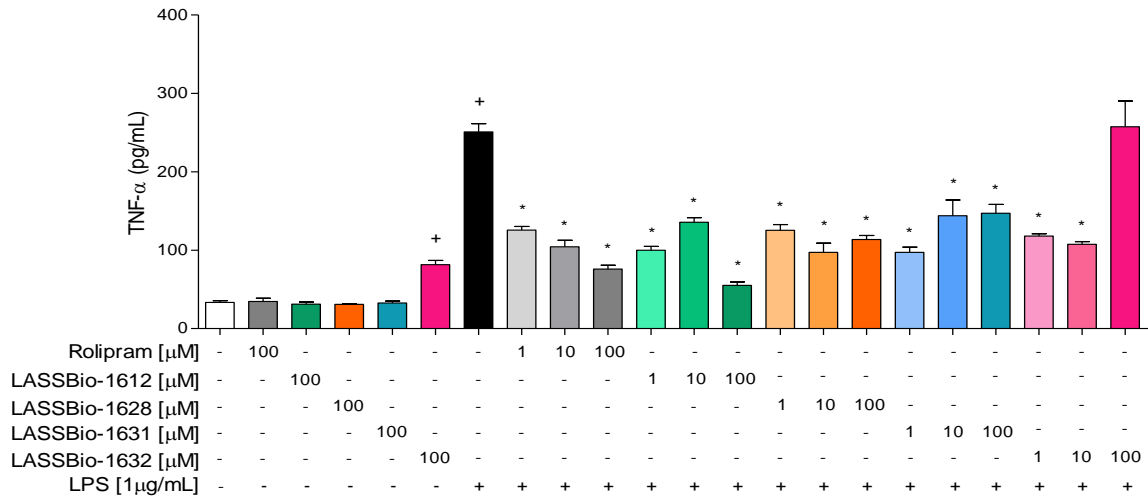


Gráfico 2: Efeito do tratamento dos derivados do LASSBio-448 sobre a ativação de macrófagos alveolares (AMJ2C11) estimulados com LPS *in vitro*. Quantificação de TNF- α do sobrenadante 6 horas após estímulo com LPS (1 μ g/mL). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de triplicata por grupo. O gráfico é representativo de quatro experimentos. + $P < 0,05$ comparado ao grupo não-estimulado; * $P < 0,05$ comparado ao grupo estimulado com LPS.

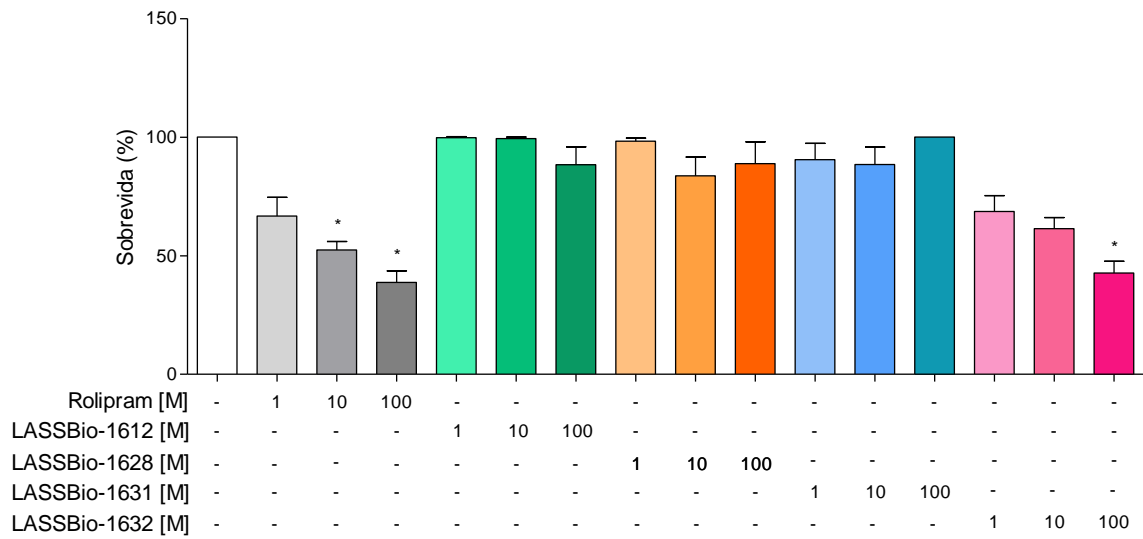


Gráfico 3: Efeito do tratamento dos derivados do LASSBio-448 sobre a taxa de sobrevivida (%) de macrófagos alveolares (AMJ2C11), avaliado pela técnica de MTT. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de triplicata por grupo, representativo de 4 experimentos independentes. + $P < 0,05$ comparado ao grupo não-estimulado; * $P < 0,05$ comparado ao grupo estimulado com LPS 1 μ g/mL.

4.3 Modelo de inflamação pulmonar aguda

Em um primeiro momento, nosso interesse foi avaliar a atividade anti-inflamatória do composto LASSBio-448 e seus derivados. O modelo empregado foi o de lesão pulmonar aguda (LPA), tendo como base a instilação intranasal de LPS em camundongos. De forma a definirmos a dose de escolha para utilização do composto de referência, cilomilaste, foram realizados ensaios nos quais foram testadas as doses de 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/kg}$. Com base no efeito inibitório de cilomilaste sobre as alterações de função pulmonar e o perfil de celularidade no lavado broncoalveolar, tivemos como escolha a menor dose que apresentou o melhor efeito - 3 $\mu\text{mol/kg}$ (dados não mostrados). Esta foi, então, a dose utilizada nos experimentos subsequentes para efeito de comparação com os derivados do protótipo LASSBio-448.

4.3.1 Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas

Conforme ilustrado no Gráfico 4, verificamos que os animais estimulados com LPS apresentaram os níveis basais aumentados de resistência das vias aéreas (Gráfico 4A) e elastância pulmonar (Gráfico 4B), quando comparados aos do grupo controle. Essa resposta foi ainda mais expressiva após administração de concentrações crescentes (3 – 27 mg/mL) do agonista colinérgico broncoconstritor metacolina, caracterizando assim um estado de hiper-reatividade pulmonar associado à condição de estimulação com LPS. Quando do tratamento com os compostos LASSBio-448 e seus derivados (6,25, 12,5 e 25 $\mu\text{mol/kg}$) e com cilomilaste (3 $\mu\text{mol/kg}$), verificamos inibição da resposta de alteração de função pulmonar, tanto em resistência (Gráfico 4A) como elastância (Gráfico 4B), resposta claramente visualizada nos gráficos 5 e 6 representativos da área sob a curva.

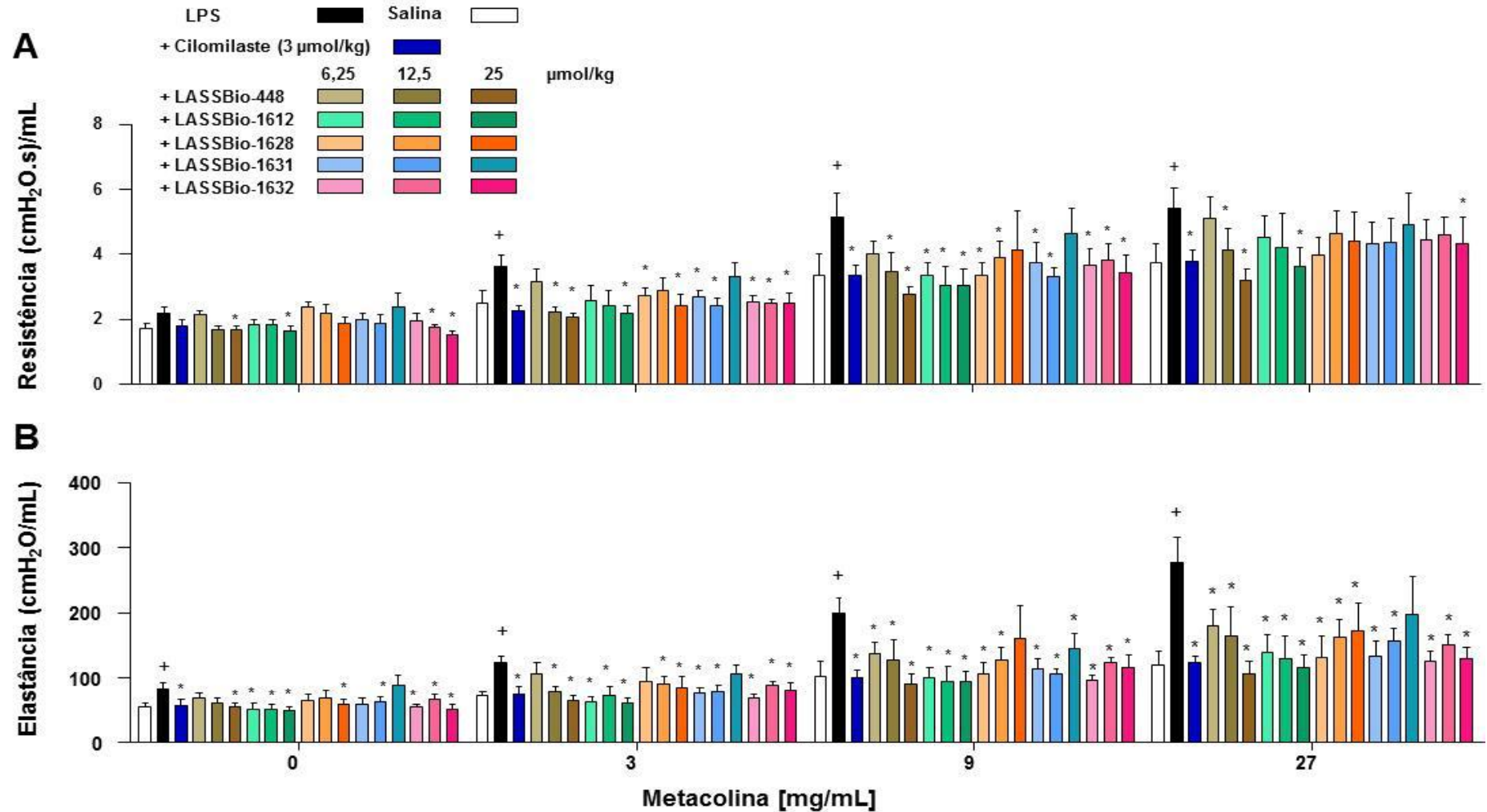


Gráfico 4: Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL). O fármaco de referência cilomilaste foi utilizado para comparação. Foram avaliados os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonares na condição de aerolização de PBS e de metacolina (3 - 27 mg/ml), 24h após LPS. Os animais foram tratados com os compostos, por via oral, 1 h antes da estimulação. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de um n experimental de 7 animais por grupo. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle; * $P < 0,05$ em comparação ao grupo LPS.

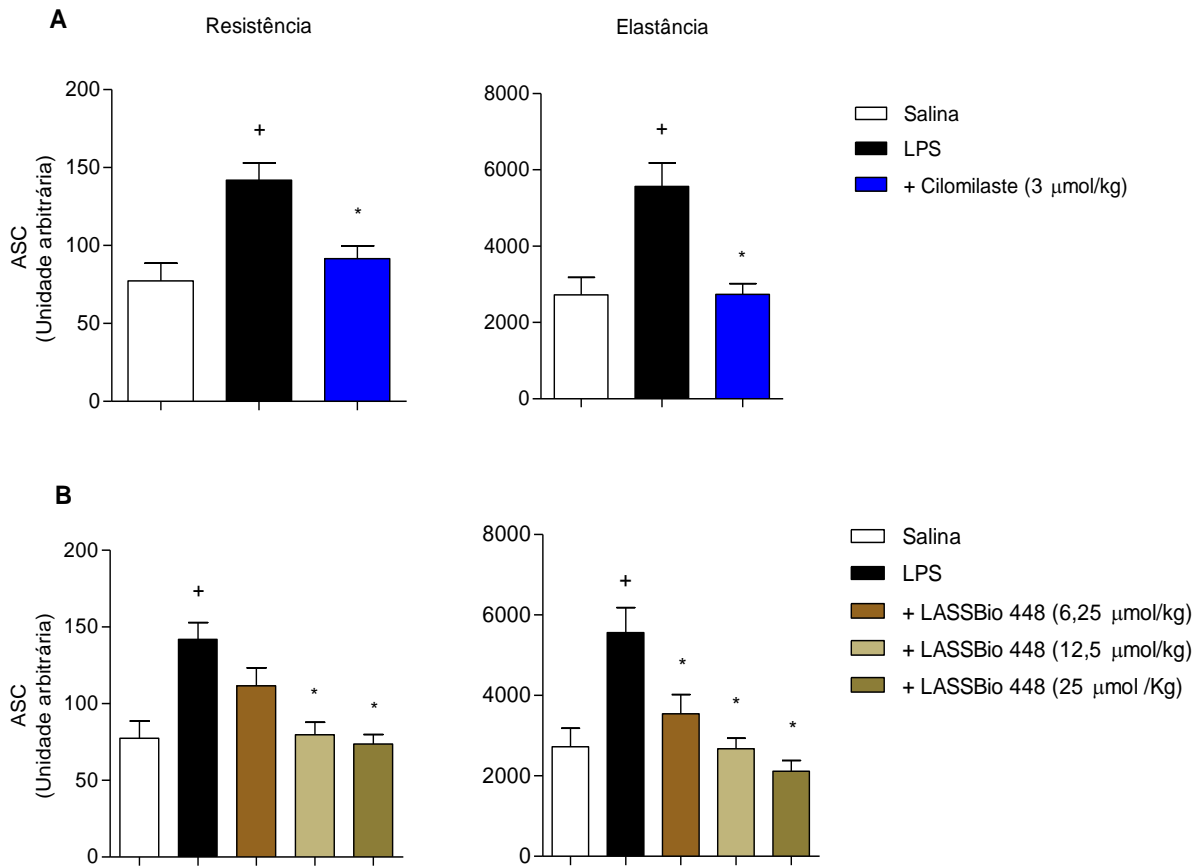


Gráfico 5: Área sob a curva (ASC) do efeito do tratamento com cilomilaste (A) e o LASSBio-448 (B) sobre a função pulmonar (resistência, gráficos à esquerda e elastância gráficos à direita) de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL). O fármaco de referência cilomilaste foi utilizado para comparação. Os animais foram tratados com os compostos, por via oral, 1 h antes da estimulação. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de um n experimental de 7 animais por grupo. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle; * $P < 0,05$ em comparação ao grupo LPS.

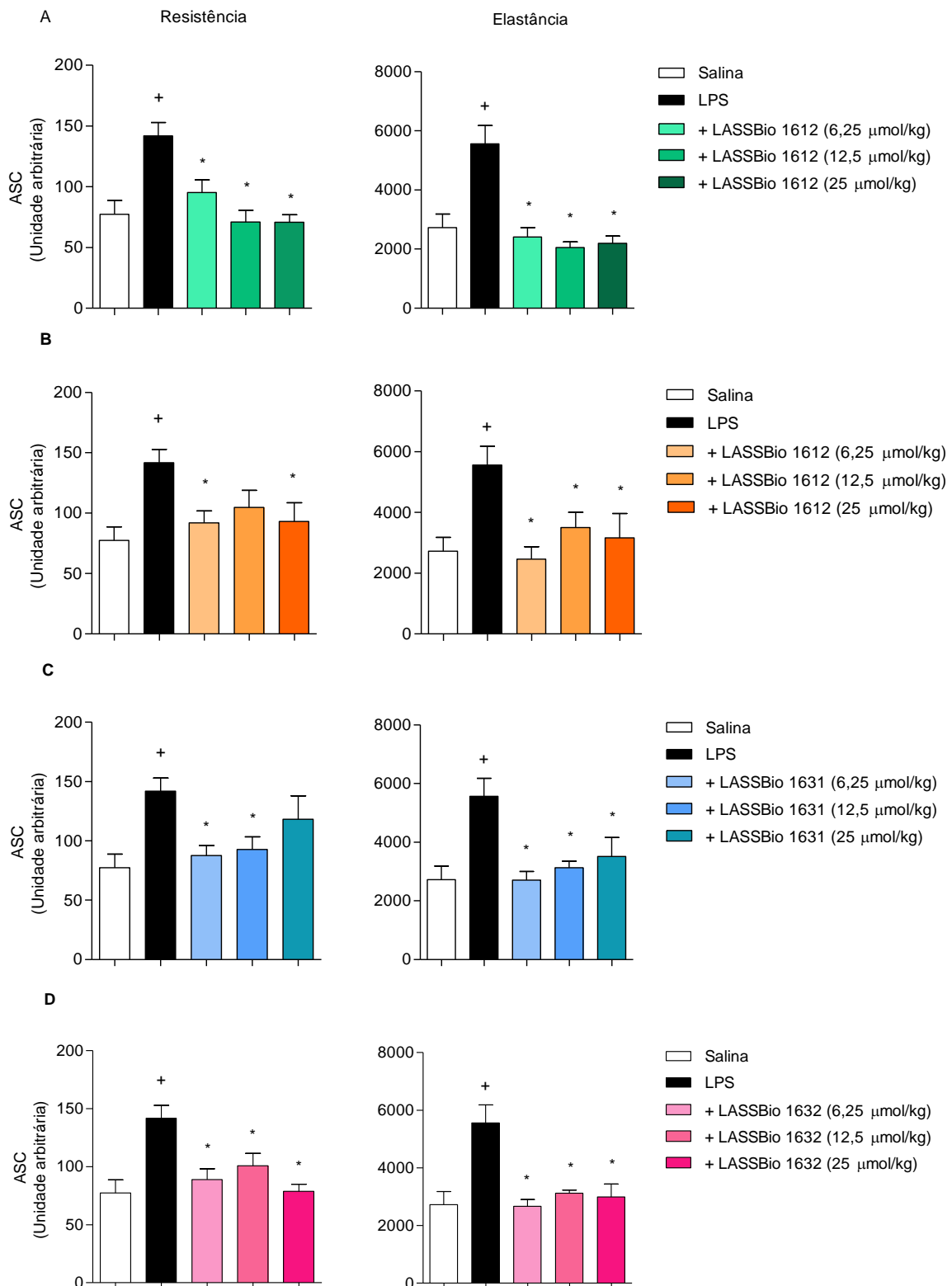


Gráfico 6: Área sob a curva (ASC) do efeito do tratamento com os compostos análogos de LASSBio-448 sobre os parâmetros de resistência (painéis à esquerda) e elastância (painéis à direita) pulmonares de camundongos desafiados com LPS (25 μg/25μL). Os animais foram tratados com os compostos, por via oral, 1 h antes da estimulação. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de um n experimental de 7 animais por grupo. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle; * $P < 0,05$ em comparação ao grupo LPS.

4.3.2 Análise histológica

Como análise complementar, verificamos que cortes de tecido submetidos à coloração clássica com hematoxilina-eosina (H&E), permitiram evidenciar que os animais instilados com salina (controles) apresentaram um padrão morfológico pulmonar normal, onde puderam ser observadas vias aéreas preservadas, assim como septos e sacos alveolares claramente identificados (Gráfico 7A). No caso dos animais instilados com LPS (Gráfico 7B), foram observadas alterações significativas na arquitetura do tecido pulmonar, com visualização de edema e de um intenso infiltrado leucocitário presente em torno das vias aéreas e disperso no parênquima. O tratamento com o cilomilaste (Gráfico 7C), LASSBio-448 (Gráfico 7D) e seus análogos (Gráficos 7E-H) foi capaz de inibir o componente inflamatório tecidual pulmonar em comparação aos animais desafiados com LPS.

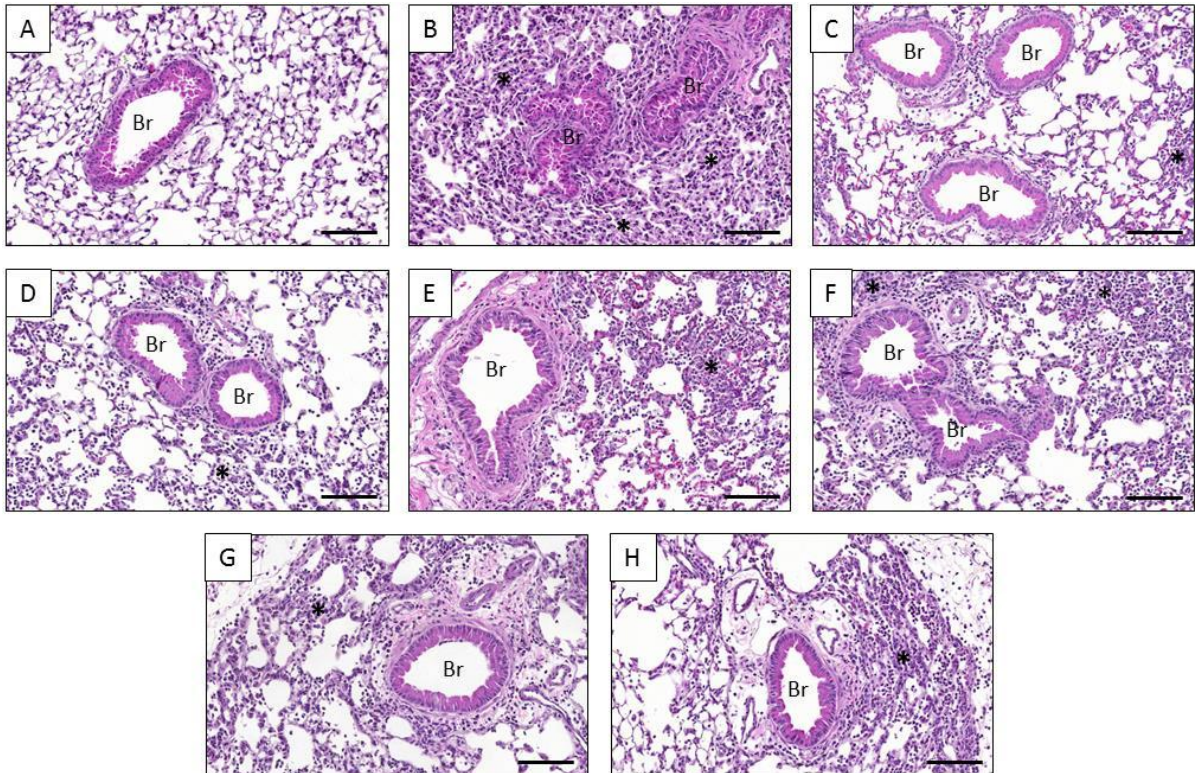


Gráfico 7: Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos desafiados com LPS (25 $\mu\text{g}/25\mu\text{L}$). O fármaco de referência cilomilaste foi utilizado para comparação. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (**A**); LPS (**B**); LPS e tratados com cilomilaste (3 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) (**C**); LPS e tratados com LASSBio-448 (25 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) (**D**); LPS e tratados com LASSBio-1612 (25 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) (**E**); LPS e tratados com LASSBio-1628 (25 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) (**F**); LPS e tratados com LASSBio-1631 (25 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) (**G**) e LPS e tratados com LASSBio-1632 (25 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) (**H**). As imagens são representativas de 7 animais por grupo. Barra = 100 μm ; **Br** = bronquíolos; * = infiltrado leucocitário.

4.3.3 Infiltrado neutrofílico tecidual

O acúmulo de neutrófilos foi avaliado pela quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO), uma enzima presente nos grânulos intracelulares, que fornece evidência indireta da presença destas células no tecido pulmonar. Como mostra a Gráfico 8, verificamos um marcado aumento nos níveis de MPO no pulmão dos animais estimulados com LPS, indicativo claro da presença de neutrófilos no tecido. O tratamento com cilomilaste e LASSBio-448 reduziram os níveis de MPO. No entanto, vimos que os análogos LASSBio-1631 e -1632 foram eficientes em diminuir os níveis de MPO, enquanto que LASSBio-1628 inibiu somente na maior dose e LASSBio-1612 não apresentou atividade sobre este parâmetro.

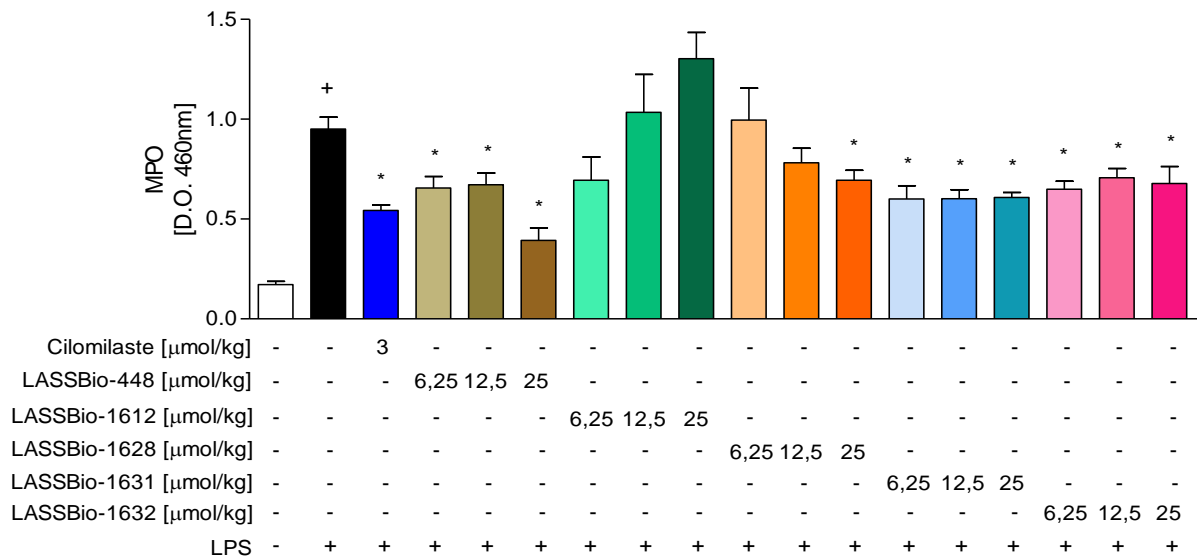


Gráfico 8: Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre os níveis (D.O.) da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL). O fármaco de referência cilomilaste foi utilizado para comparação. Os animais foram tratados 1h antes com os LASSBios por via oral e 18h após a instilação com LPS os animais foram anestesiados e coletado o pulmão para determinação da atividade de mieloperoxidase. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de um n experimental de 7 animais por grupo. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle (salina); * $P < 0.05$ em comparação ao grupo LPS.

4.3.4 Geração de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar

Buscando investigar o mecanismo de ação envolvido no efeito supressor dos compostos LASSBios e do cilomilaste, sobre a resposta inflamatória causada por LPS no pulmão, partimos para avaliar o efeito desses compostos sobre a geração de mediadores inflamatórios. Foram quantificadas as citocinas TNF- α (Gráfico 9A) e IL-6 (Gráfico 9B), assim como as quimiocinas MIP-1 (Gráfico 10A) e MIP-2 (Gráfico 10B). Os níveis de todas as citocinas e quimiocinas apresentaram-se elevados no pulmão de camundongos desafiados com LPS, em comparação com aqueles verificados nos controles (Gráficos 9 e 10). Conforme pode ser observado nos gráficos 9 e 10, o tratamento com cilomilaste aboliu a produção de todas as citocinas e quimiocinas estudadas, enquanto que o LASSBio-448 apresentou atividade inibitória sobre a produção dos vários mediadores avaliados, atuando nas maiores doses testadas (12,5 e 25 $\mu\text{mol/kg}$). Os LASSBios-1612, -1628 e -1631 apresentaram efeito somente na maior dose (25 $\mu\text{mol/kg}$), enquanto que LASSBio-1632 mostrou perfil de ação mais abrangente na inibição da produção de citocinas e quimiocinas (Gráficos 9 e 10).

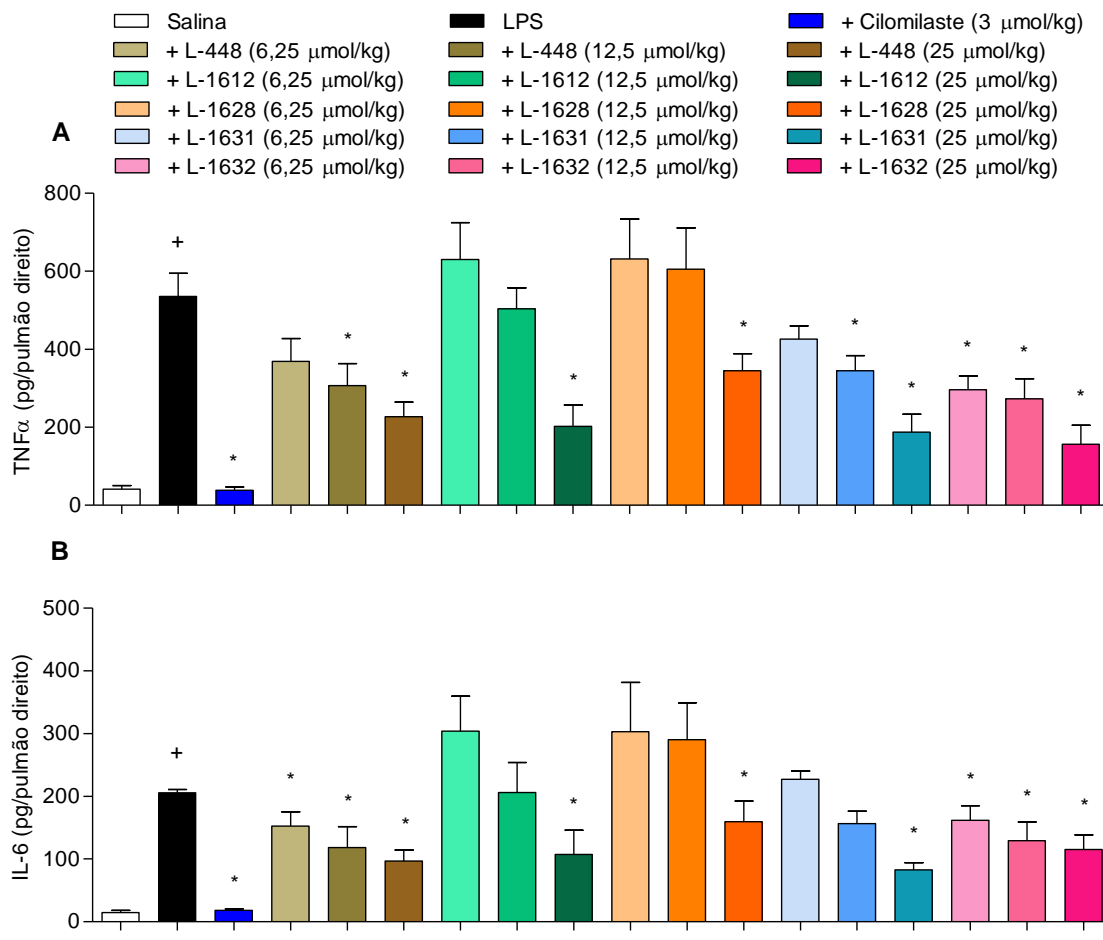


Gráfico 9: Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a geração de citocinas inflamatórias TNF- α (A) e IL-6 (B) no tecido pulmonar de camundongos desafiados com LPS (25 μ g/25 μ L). O fármaco de referência cilomilaste foi utilizado para comparação. Os animais foram tratados com os compostos, por via oral, 1 h antes da estimulação. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de um n experimental de 6-7 animais por grupo. + $P < 0,05$ comparado ao grupo controle; * $P < 0,05$ comparado ao grupo instilado com LPS.

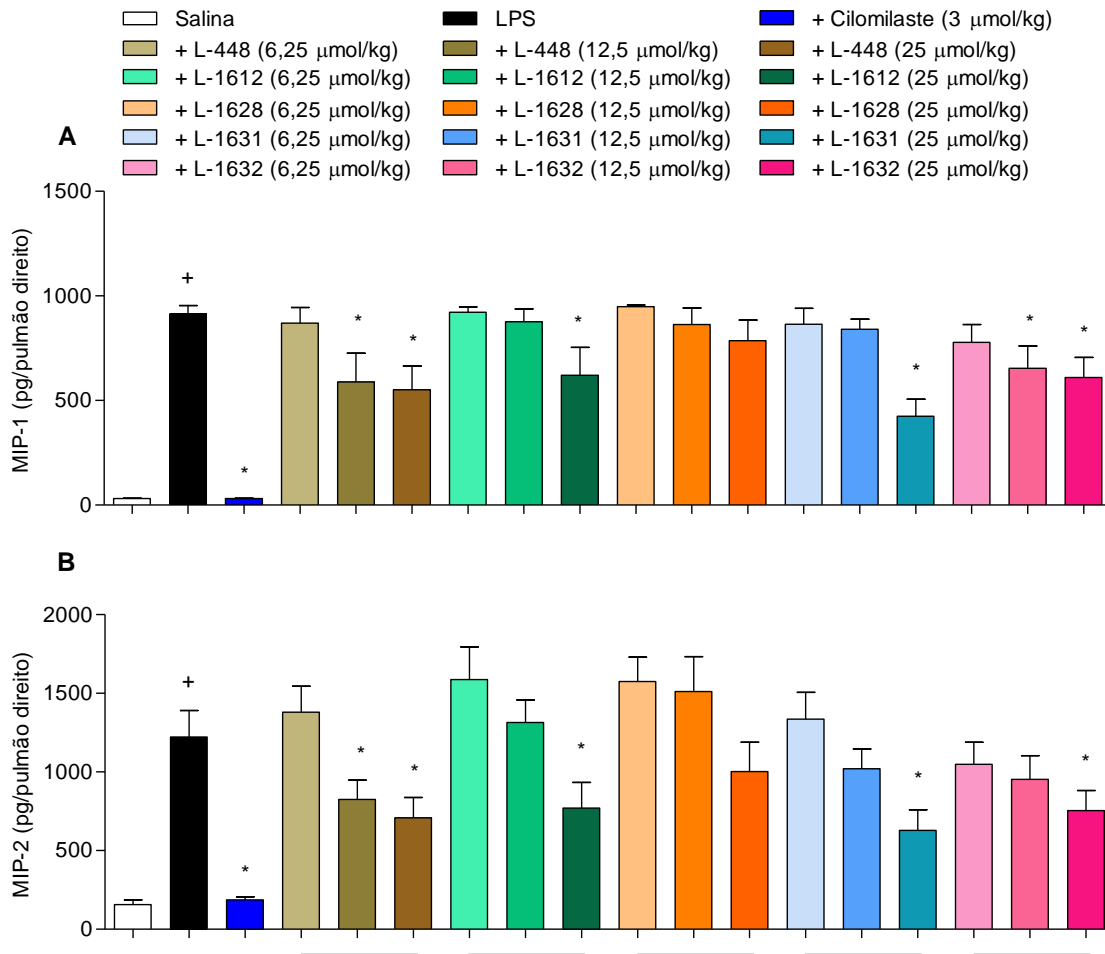


Gráfico 10: Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a geração de quimiocinas inflamatórias MIP-1 (A) e MIP-2 (B) no pulmão de camundongos desafiados com LPS (25 µg/25µL). O fármaco de referência cilomilaste foi utilizado para comparação. Os animais foram tratados com os compostos, por via oral, 1 h antes da estimulação. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de um n experimental de 6-7 animais por grupo. + $P < 0,05$ comparado ao grupo controle; * $P < 0,05$ comparado ao grupo instilado com LPS.

4.4 Modelo de inflamação pulmonar crônica

Dentre a ampla gama de doenças pulmonares crônicas conhecidas, a silicose foi escolhida em função de dados recentes da literatura que atestam a eficiência do inibidor de PDE4 roflumilaste (última geração), em casos brandos de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Esta é uma doença que compartilha com a silicose, um quadro de edema inflamatório e intenso infiltrado de macrófagos e neutrófilos no tecido pulmonar. Mais ainda, achados prévios do nosso laboratório permitiram evidenciar o efeito supressor do inibidor de PDE4 (primeira geração) rolipram, no modelo experimental de silicose murina. Considerando ser a silicose uma doença sem tratamento até agora, achamos que seria de interesse investigar o efeito anti-inflamatório e anti-fibrótico de LASSBio-448 e seus derivados, em comparação ao composto de referência, cilomilaste.

4.4.1 Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas

Verificamos que camundongos instilados com partículas de sílica, por via intranasal, apresentaram níveis basais de função pulmonar alterados, refletidos por aumento na resistência (Gráfico 11A) e na elastância (Gráfico 11B). Na condição de aerossolização com concentrações crescentes de metacolina (3 – 27 mg/mL), observamos uma exacerbação da resposta, tanto na resistência como na elastância pulmonar nos animais silicóticos, em comparação aos controles (Gráfico 11). Isto é indicativo de um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas associado à silicose. Conforme ilustrado no gráfico 11, o tratamento de animais silicóticos com cilomilaste inibiu marcadamente o aumento de resistência e elastância frente à estimulação com metacolina. No caso do composto LASSBio-448 e seus análogos, verificamos inibição de ambos os parâmetros, com maior efeito sendo verificado no caso da elastância pulmonar. Estes dados foram corroborados quando da análise da área sob a curva (Gráficos 12 e 13).

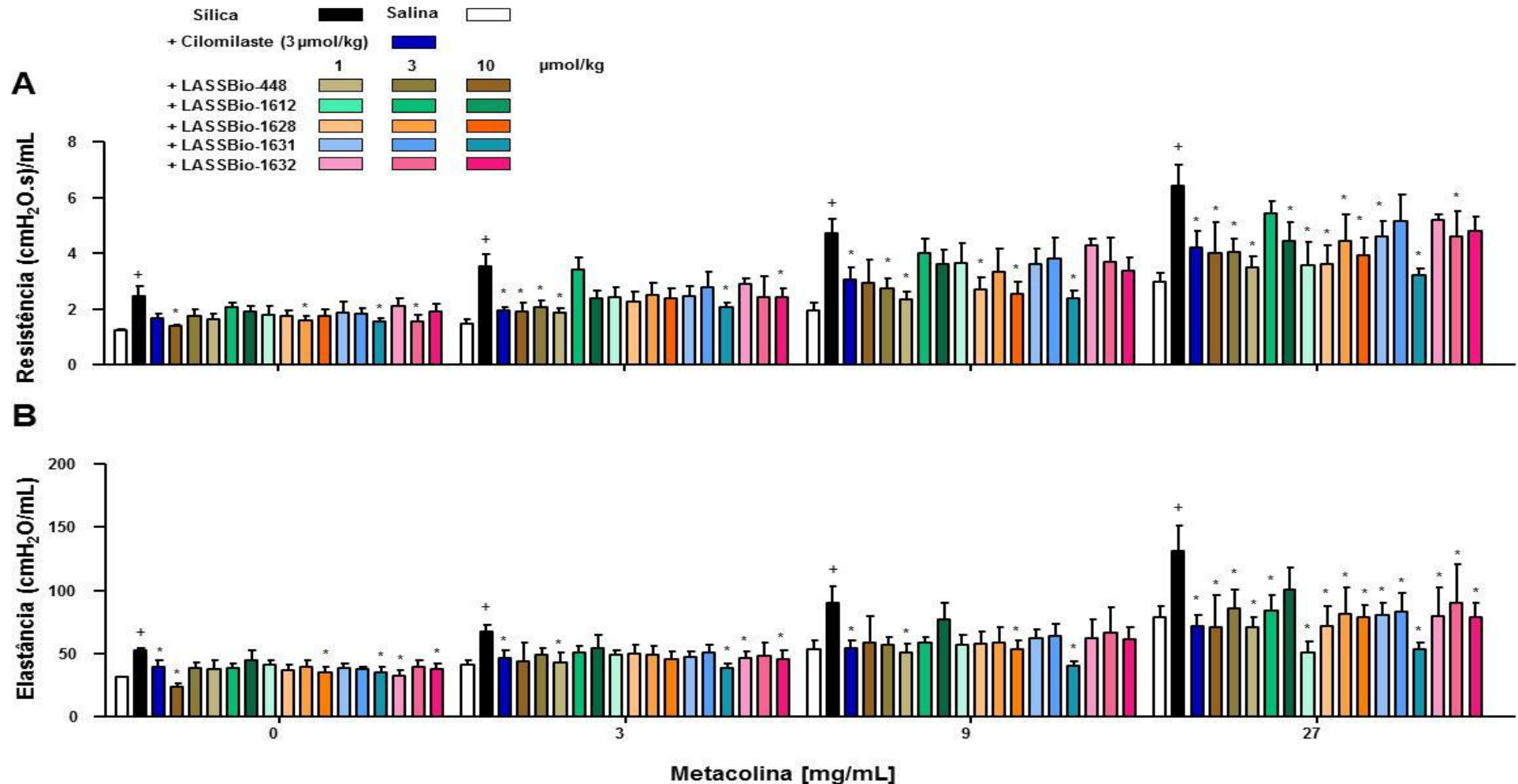
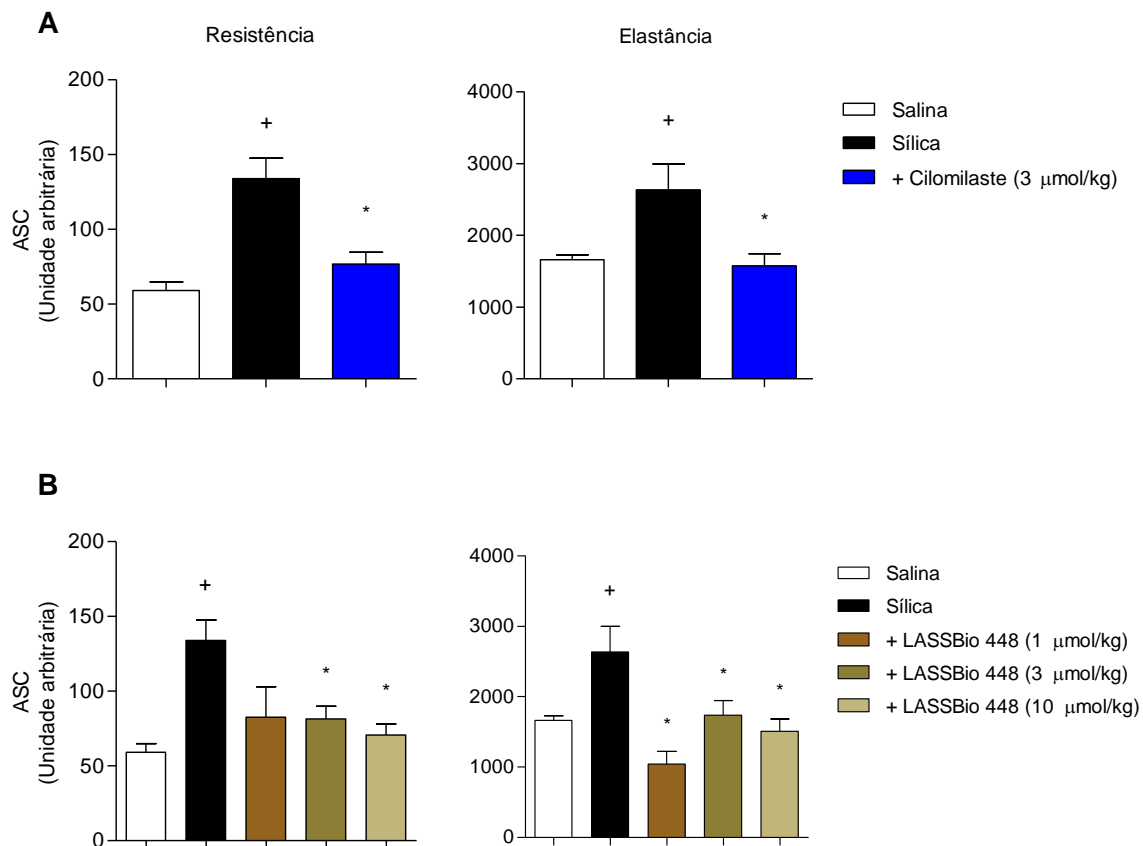


Gráfico 11: Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos instilados com sílica (10 mg/50µL). O fármaco de referência cilomilaste foi utilizado para comparação. Foram avaliados os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonares na condição de aerolização de PBS e metacolina (3 - 27 mg/mL). Os animais foram tratados a partir do dia 21 após a instilação de sílica, durante 7 dias consecutivos e a análise realizada 1 dia após a última administração dos compostos. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6-8). + $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle; * $P < 0,05$ em comparação ao grupo sílica.



Gráficos 12: Área sob a curva (ASC) do efeito do tratamento cilomilaste (A) e LASSBio-448 (B) sobre os parâmetros de resistência (gráficos à esquerda) e elastância (gráficos à direita) pulmonar de camundongos instilados com sílica (10 mg/50 μL). O fármaco de referência cilomilaste foi utilizado para comparação. Os animais foram tratados a partir do dia 21 após a instilação de sílica, durante 7 dias consecutivos e a análise realizada 1 dia após a última administração dos compostos.. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6-8). + $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle; * $P < 0,05$ em comparação ao grupo sílica.

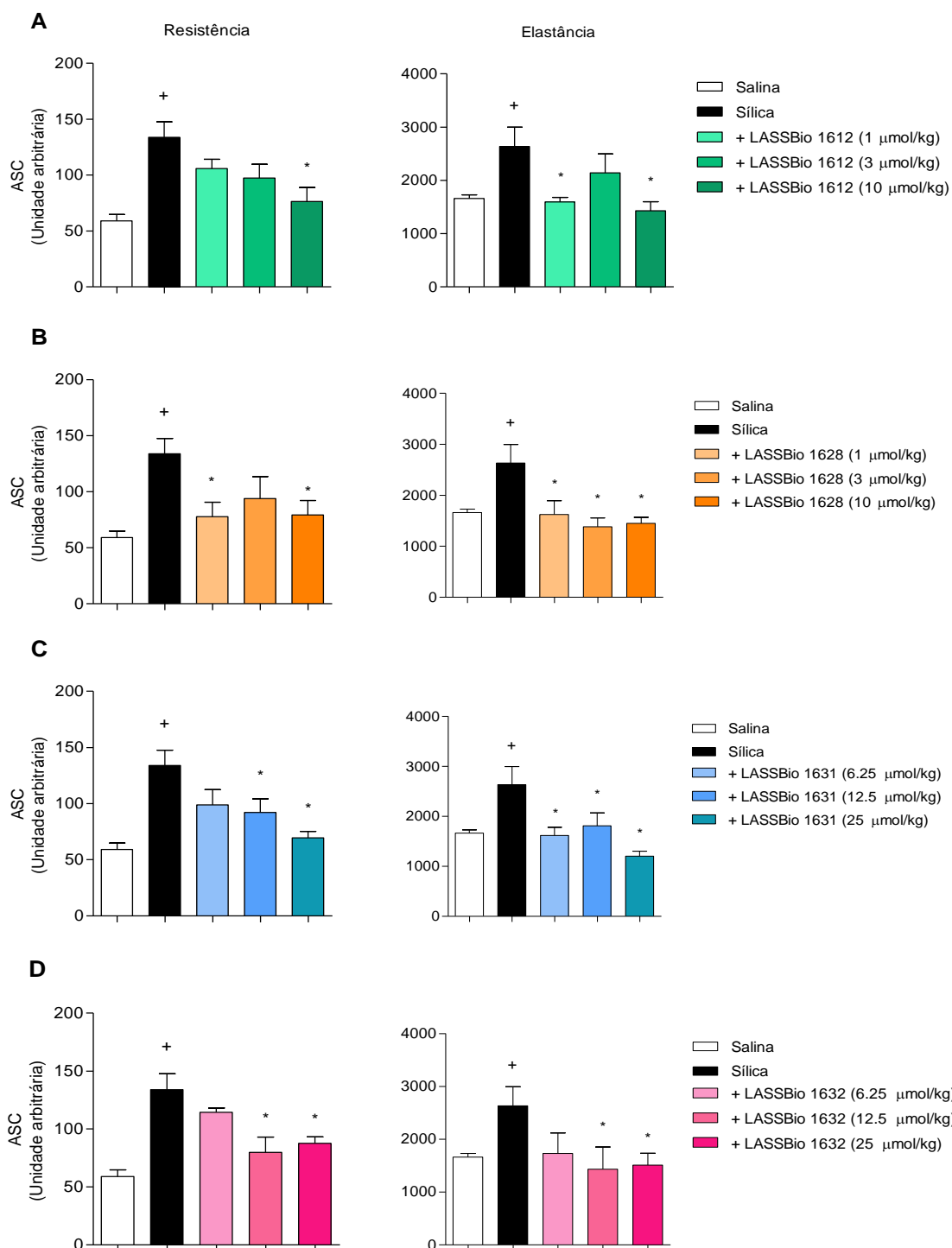


Gráfico 13: Área sob a curva (ASC) do efeito do tratamento com os análogos de LASSBio-448 sobre os parâmetros de resistência (gráficos à esquerda) e elastância (gráficos à direita) pulmonar de camundongos instilados com sílica (10 mg/50μL). Os animais foram tratados a partir do dia 21 após a instilação de sílica, durante 7 dias consecutivos e a análise realizada 1 dia após a última administração dos compostos. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6-8). + $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle; * $P < 0,05$ em comparação ao grupo sílica.

4.4.2 Análise histológica (morfologia e morfometria)

A silicose é uma doença de caráter restritivo, onde se verifica uma importante resposta inflamatória e fibrogênica, onde a avaliação morfológica e morfométrica se fazem relevantes. Com base na coloração por H&E, verificamos que os animais do grupo controle, instilados apenas com salina, apresentaram parênquima com arquitetura preservada e íntegra, septos alveolares bem definidos, sem espessamento ou qualquer indício da presença de processo inflamatório (Gráfico 14A), enquanto que aqueles do grupo estimulado com sílica detectamos a presença de um intenso infiltrado leucocitário acompanhado de marcada resposta fibrótica granulomatosa dispersa no parênquima pulmonar (Gráfico 14B). O tratamento terapêutico dos animais silicóticos com cilomilaste diminuiu o componente inflamatório e a formação de granulomas (Gráfico 14C). Quando da administração dos compostos LASSBio-448 e seus análogos LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 e LASSBio-1632 (Gráficos 14D, 14E, 14F, 14G e 14H, respectivamente) observamos em todas as doses uma importante redução do infiltrado inflamatório e da formação de granulomas pulmonares. Estas observações foram confirmadas através da avaliação morfométrica, que tem como base a quantificação da porcentagem da área de parênquima pulmonar ocupada por granulomas. Verificamos que os animais silicóticos apresentaram em torno de 38% da área do parênquima pulmonar ocupado por fibrose granulomatosa. O tratamento com cilomilaste, LASSBio-448 e seus análogos suprimiram de forma significativa a resposta fibrótica (Gráfico 14I).

Na sequência partimos para a avaliar a deposição de componentes de matriz extracelular, com ênfase sobre o colágeno. Para tanto, cortes dos pulmões foram submetidos à coloração com Picrus sirius, corante marcador específico de fibras colágenas. Verificamos que o grupo controle salina apresentou parênquima pulmonar com aspecto normal, evidenciando-se apenas a marcação basal associada à presença de colágeno constitutiva nos vasos sanguíneos e nas vias aéreas (Gráfico 15A). Por outro lado, uma intensa marcação de fibras de colágenas foi evidenciada nos pulmões silicóticos, sendo essa marcação predominante nas áreas de granuloma (Gráfico 15B). O

tratamento com os cilomilaste reduziu a intensidade de marcação no pulmão dos animais silicóticos (Gráfico 15C).

Os compostos LASSbios, nas maiores doses (3 e 10 $\mu\text{mol/kg}$), reduziram de forma significativa a intensidade de marcação com o corante (Gráfico 15D - H), indicando claro efeito redutor da resposta fibrótica. Estes achados foram confirmados quando da quantificação do conteúdo de colágeno total no pulmão dos animais pelo método colorimétrico de Sircol. Vimos um marcado aumento na quantidade de colágeno no pulmão dos animais silicóticos em comparação aos animais controles, conforme esperado (Gráfico 15B). O cilomilaste inibiu a deposição de colágeno, assim como os LASSBios nas maiores concentrações. Em conjunto estes resultados revelam de forma clara a propriedade do cilomilaste e LASSBios em modular negativamente o componente inflamatório e fibrótico da silicose experimental murina.

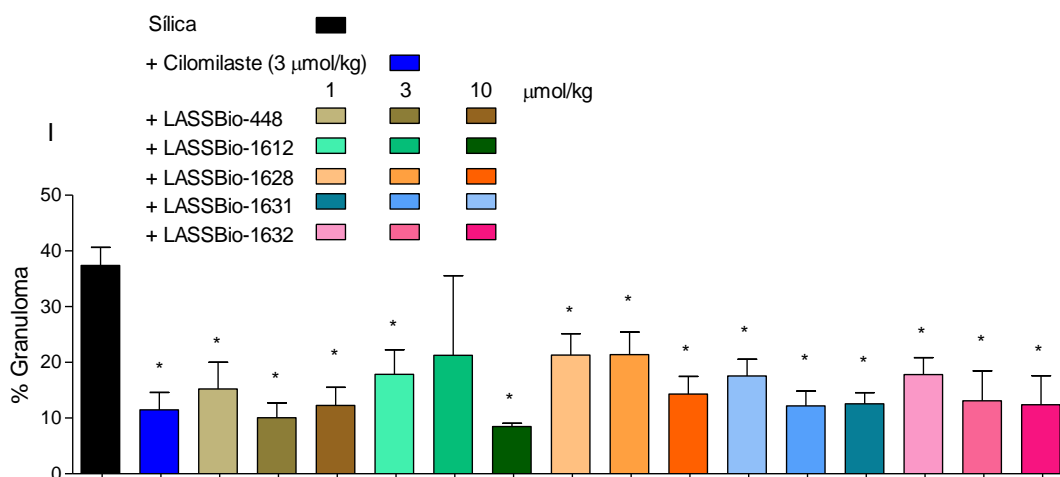
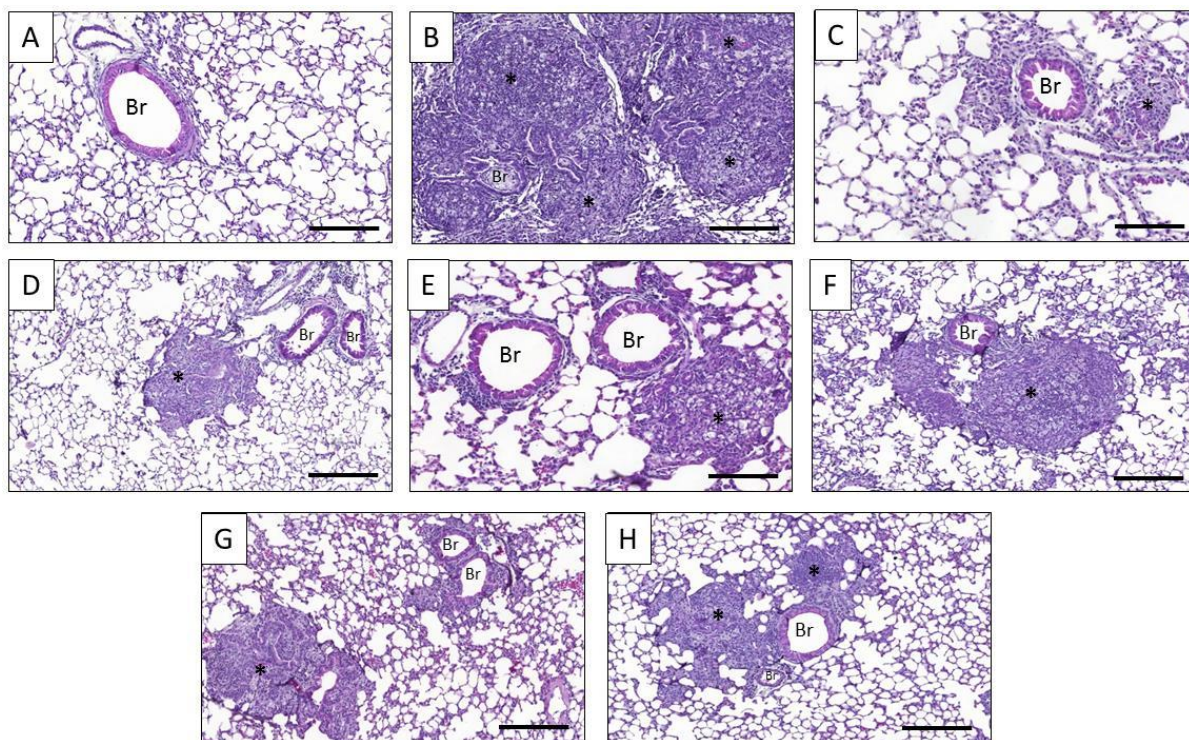


Gráfico 14: Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A); sílica (10 mg/50µL) (B); sílica e tratados com cilomilaste (3 µmol/kg) (C); sílica e tratados com LASSBio-448 (10 µmol/kg) (D); sílica e tratados com LASSBio-1612 (10 µmol/kg) (E); sílica e tratados com LASSBio-1628 (10 µmol/kg) (F); sílica e tratados com LASSBio-1631 (10 µmol/kg) (G) e sílica e tratados com LASSBio-1632 (10 µmol/kg) (H). Análise morfométrica do parênquima pulmonar (I). As imagens são representativas de 6 a 7 animais por grupo. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo sílica. Barra = 100 µm; Br = bronquíolos; * = granuloma.

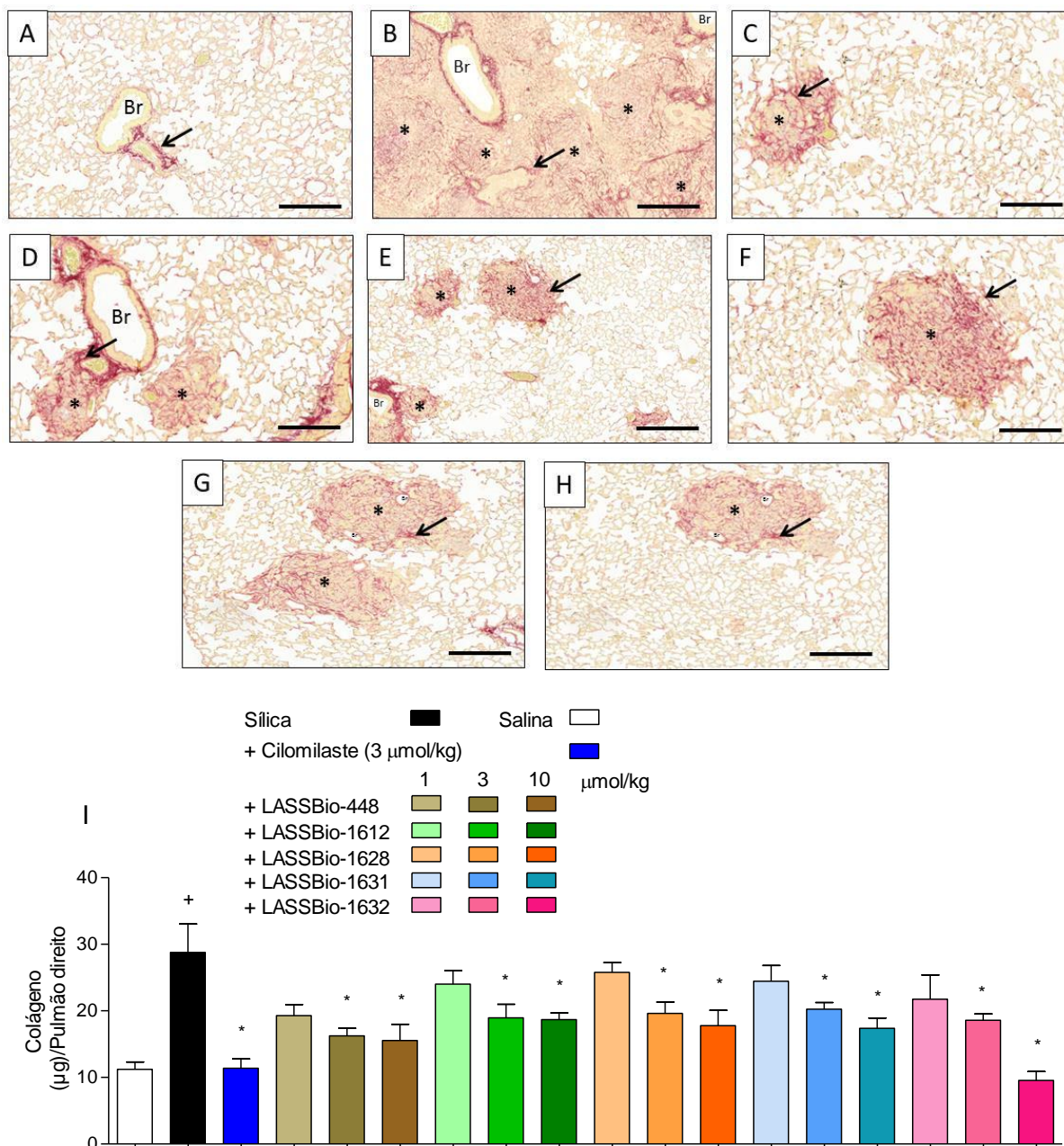


Gráfico 15: Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a deposição de colágeno no pulmão de camundongos silicóticos. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (**A**); sílica (10 mg/50µL) (**B**); sílica e tratados com cilomilaste (3 µmol/kg) (**C**); sílica e tratados com LASSBio-448 (10 µmol/kg) (**D**); sílica e tratados com LASSBio-1612 (10 µmol/kg) (**E**); sílica e tratados com LASSBio-1628 (10 µmol/kg) (**F**); sílica e tratados com LASSBio-1631 (10 µmol/kg) (**G**) e sílica e tratados com LASSBio-1612 (10 µmol/kg) (**H**). Análise quantitativa do conteúdo de colágeno tecidual (**I**). As imagens são representativas de 6 a 7 animais por grupo. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo sílica. Barra = 100 µm; **Br** = bronquíolos; * = granuloma; setas = fibras colágenas.

4.4.3 Infiltrado neutrofílico tecidual

Para avaliação do infiltrado neutrofílico foi utilizada metodologia similar de quantificação dos níveis de (MPO) no tecido pulmonar. Como ilustrado no Gráfico 16, os níveis de MPO mostraram-se aumentados no tecido pulmonar dos camundongos submetidos à estimulação com sílica, em comparação com os valores verificados nas amostras dos controles. O tratamento com cilomilaste, LASSBio-448 e seus análogos, foi eficiente em reduzir os níveis de MPO no tecido pulmonar dos animais silicóticos, reforçando a atividade anti-inflamatória dos referidos compostos.

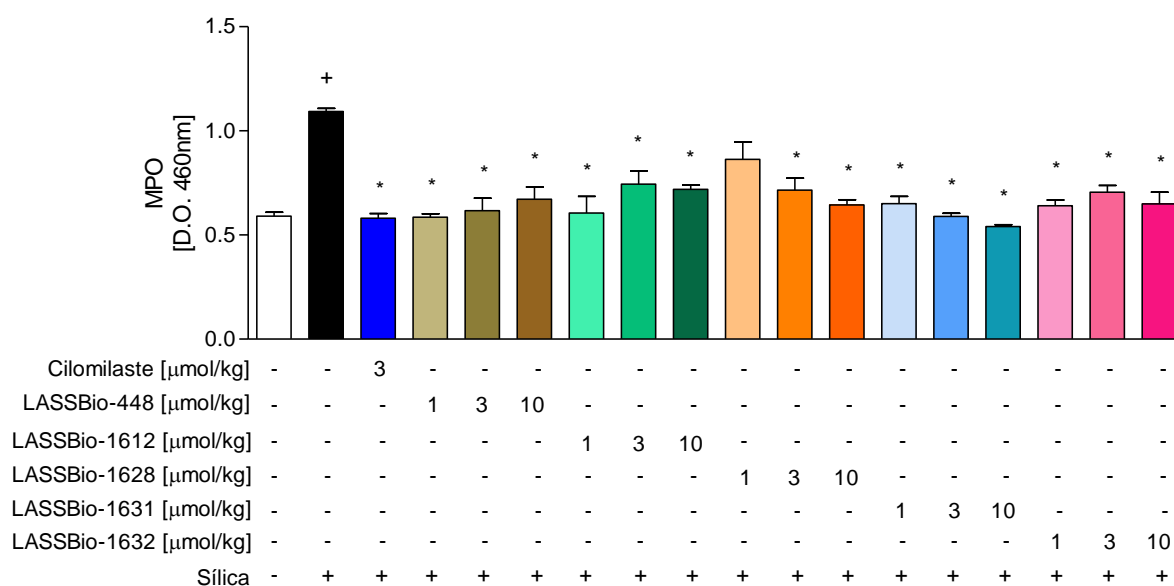


Gráfico 16: Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em tecido pulmonar de camundongos silicóticos. Os animais foram tratados diariamente com os LASSBios por via oral, durante 7 dias consecutivos, iniciando-se 21 dias após o desafio e 24h após o último dia de tratamento os animais foram anestesiados e coletado o pulmão para determinação da atividade de mieloperoxidase. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de um n experimental de 7 animais por grupo. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle; * $P < 0.05$ em comparação ao grupo sílica.

4.4.4 Geração de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar

A avaliação dos mediadores inflamatórios e fibróticos gerados no tecido pulmonar revelou a existência de níveis aumentados das citocinas TNF- α (Gráfico 17A) e IFN- γ (Gráfico 17B) e das quimiocinas KC (Gráfico 18A), MCP-1 (Gráfico 18B) e MIP-1 (Gráfico 18C), em comparação aqueles verificados nos controles. O tratamento dos animais silicóticos com cilomilaste aboliu a geração das citocinas e quimiocinas avaliadas (Gráficos 17 e 18), enquanto que o composto LASSBio-448 reduziu os níveis de TNF- α (Gráfico 17A), IFN- γ (Gráfico 17B), KC (Gráfico 18A) e MCP-1 (Gráfico 18B), porém falhou em interferir com MIP-1 (Gráfico 18C). Os compostos LAASBio-1628, LASSBio-1631 e LASSBio-1632 mostraram-se ativos em inibir a geração das citocinas TNF- α (Gráfico 17A), IFN- γ (Gráfico 17B) e das quimiocinas KC (Gráfico 18A), MCP-1 (Gráfico 18B) e MIP-1 (Gráfico 18C), com efeito sendo predominantemente verificado com as maiores doses. Entretanto, o tratamento com LASSbio-1612, muito embora tenha sido capaz de inibir a produção das citocinas TNF- α (Gráfico 17A), IFN- γ (Gráfico 17B) e das quimiocinas MCP-1 (Gráfico 18B) e MIP-1 (Gráfico 18C), não modificou os níveis de KC no pulmão dos animais silicóticos (Gráfico 18A).

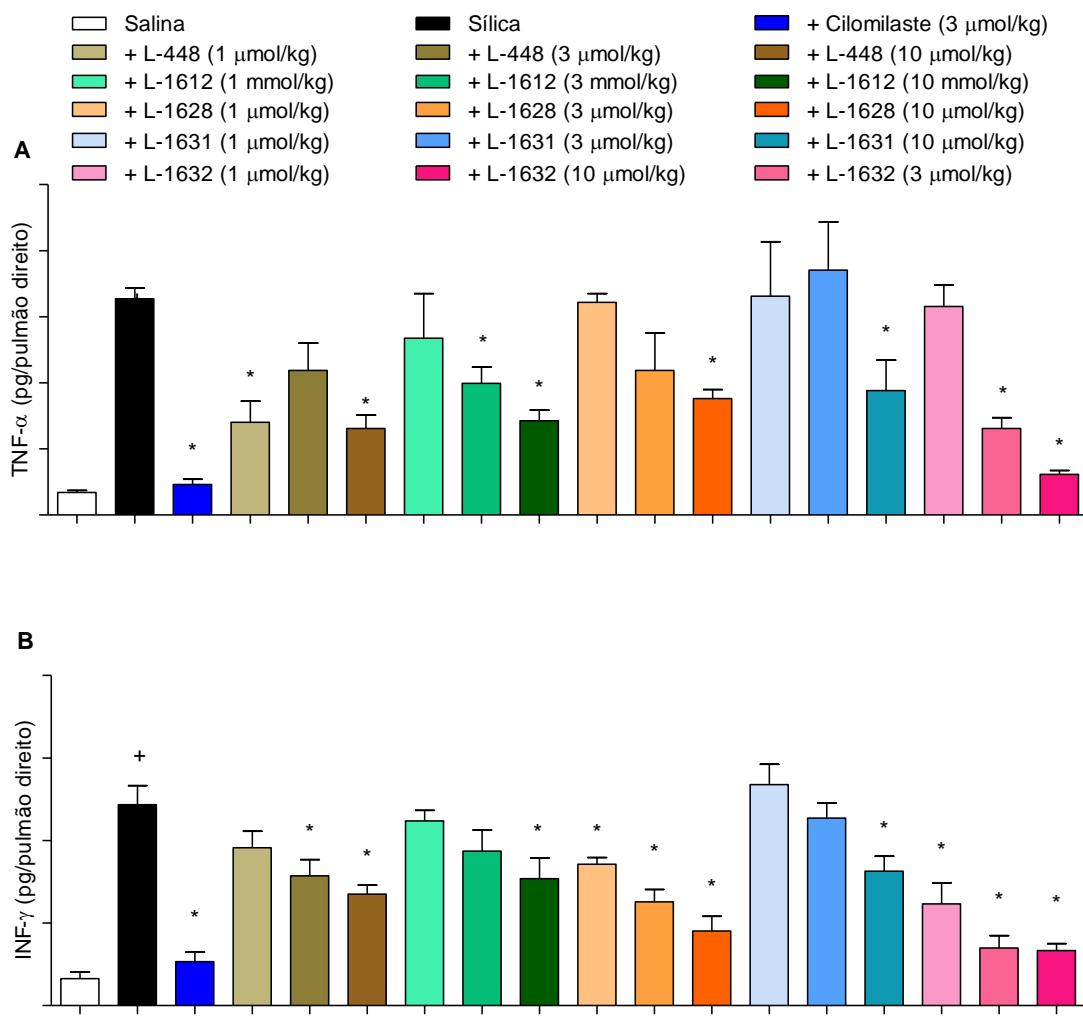


Gráfico 17: Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a geração de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar de camundongos silicóticos. **(A)** TNF- α e **(B)** IFN- γ . O fármaco de referência cilomilaste foi utilizado para comparação. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de um n experimental de 6-7 animais por grupo. + $P < 0,05$ comparado ao grupo controle; * $P < 0,05$ comparado ao grupo instilado com sílica.

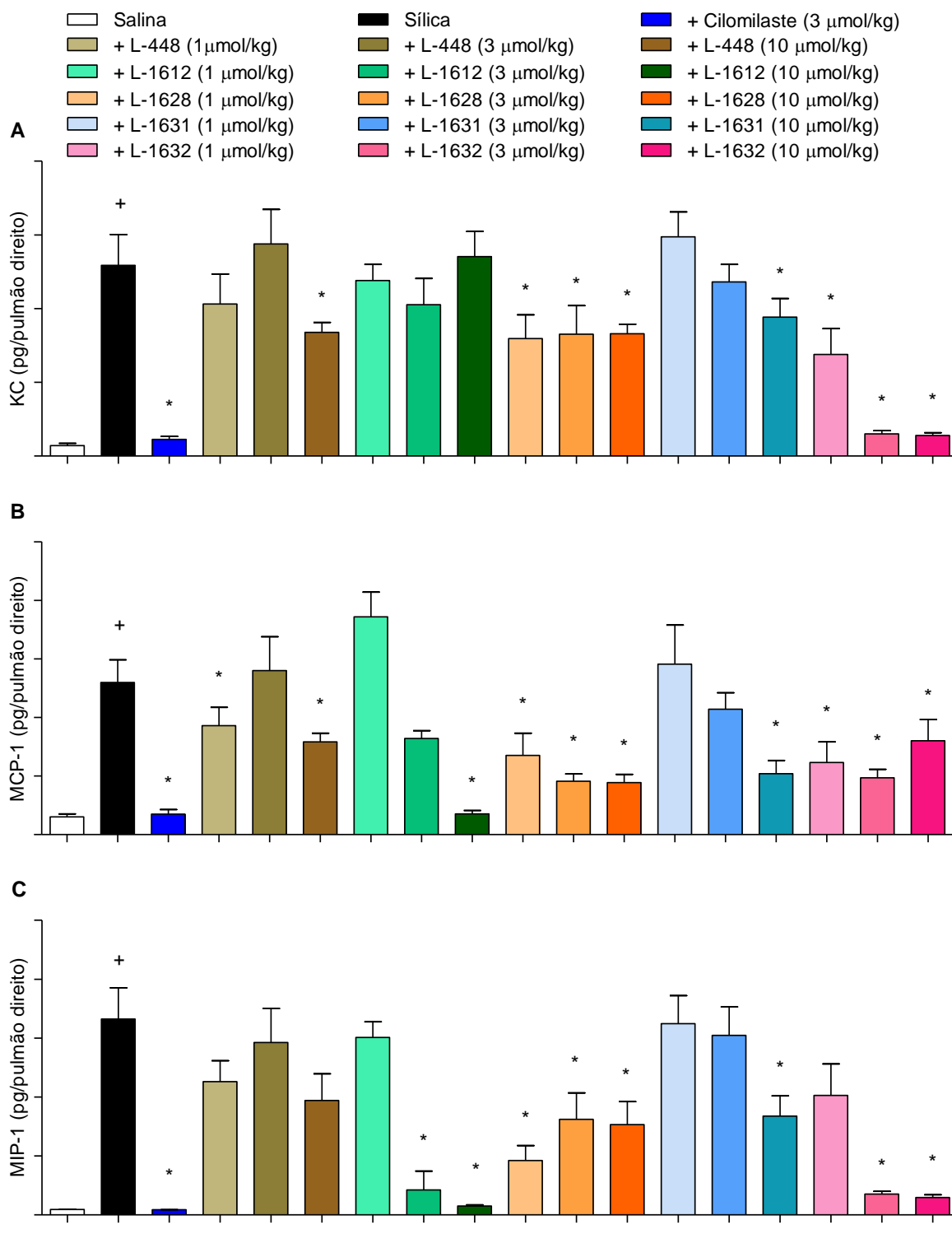


Gráfico 18: Efeito do tratamento com o LASSBio-448 e seus análogos sobre a geração de quimiocinas inflamatórias no tecido pulmonar de camundongos silicóticos. (A) KC e (B) MCP-1 e (C) MIP-1. O fármaco de referência cilomilaste foi utilizado para comparação. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de um n experimental de 6-7 animais por grupo. + $P < 0,05$ comparado ao grupo controle; * $P < 0,05$ comparado ao grupo instilado com sílica.

4.4.5 Células alvos *in vitro*

Fibroblastos são células cruciais no contexto da resposta fibrótica tecidual (Arcangeli e cols, 2001). Buscando aprofundar o mecanismo de ação dos compostos testados, nesta etapa avaliamos a resposta de proliferação celular de fibroblastos pulmonares de camundongos. Os fibroblastos, obtidos a partir do pulmão de camundongos normais, foram mantidos em cultura e submetidos à estimulação com a citocina pró-fibrótica IL-13. Confirmando dados anteriores do grupo (Ferreira e cols, 2013), verificamos que a IL-13 induziu marcado aumento da resposta proliferativa em comparação às células incubadas com meio. De maneira geral, a incubação dos fibroblastos com cilomilaste, LASBBio-448 e seus análogos apresentou discreto efeito inibitório sobre a proliferação de fibroblastos, na concentração de 10^{-4} M foi capaz de interferir com a resposta proliferativa induzida pela citocina IL-13 (Gráfico 19).

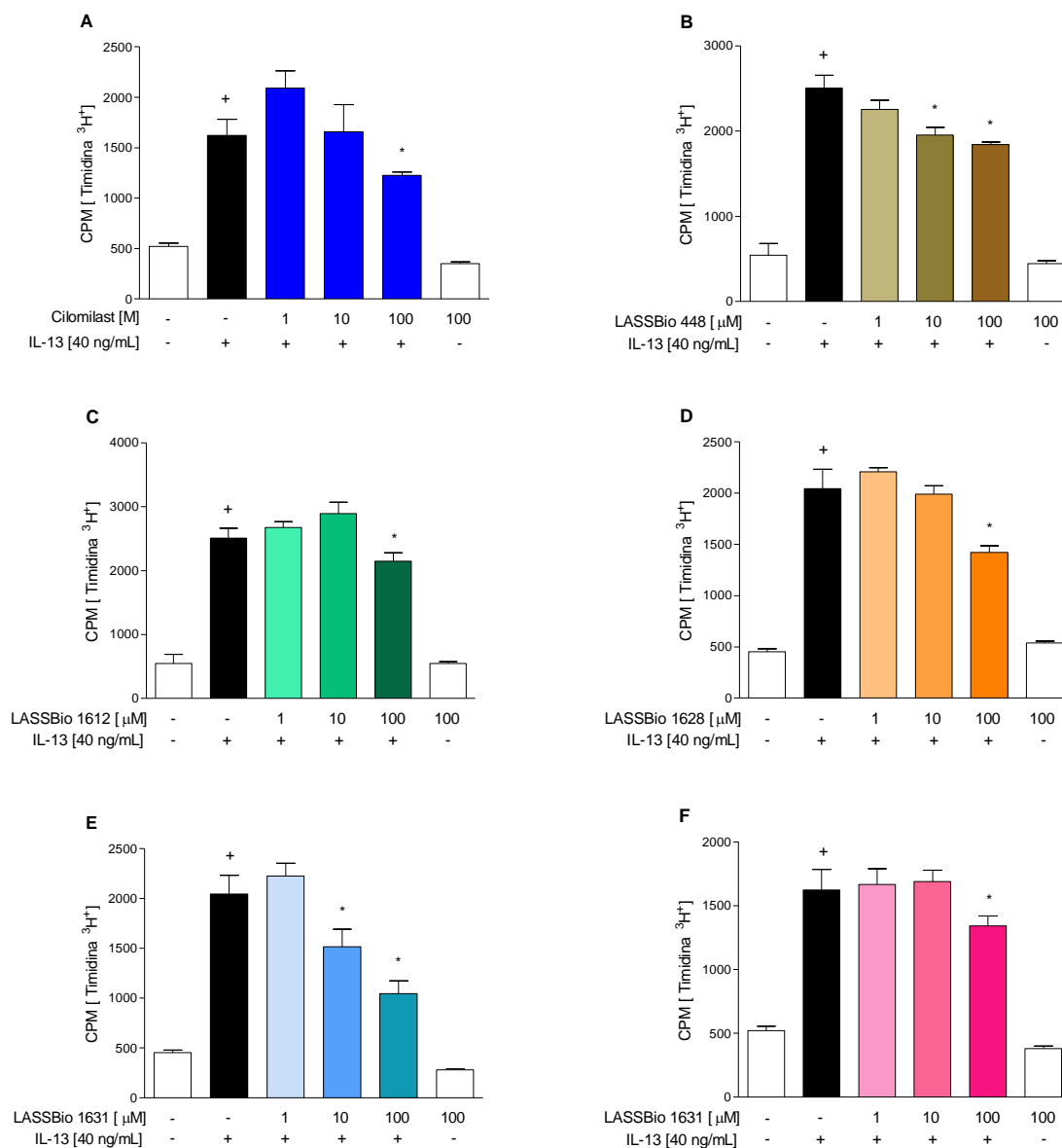


Gráfico 19: Efeito do tratamento com o cilomilaste (A), LASSBio-448 (B) e os análogos LASSBio-1612 (C), LASSBio-1628 (D), LASSBio-1631 (E), LASSBio-1632 (F) sobre a proliferação de fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos normais estimulados com IL-13 *in vitro*. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de no mínimo triplicata por grupo. Este gráfico é representativo de dois experimentos. + $P < 0,05$ comparado ao grupo não estimulado; * $P < 0,05$ comparado ao grupo estimulado com IL-13.

4.5 Avaliação indireta do efeito central em modelo de anestesia por cetamina/xilazina do composto LASSBio-448 e seus análogos

Dados de literatura indicam que os inibidores de PDE4 possuem como efeito adverso a indução de náusea e vômito, estando estes associados a uma ação ao centro emético ao nível do sistema nervoso central (Robichaud e cols, 2002a,b). Neste trabalho, utilizamos um modelo experimental de avaliação de êmese desenvolvido em roedores (ratos e camundongos). Neste modelo, o tempo de sono está associado à diminuição dos níveis de AMPc em neurônios do SNC, o que leva à redução da atividade da via noradrenérgica. Assim, a elevação nos níveis de AMPc nessa região, efeito associado aos inibidores de PDE4 disponíveis, reflete na redução do tempo de sono dos animais (Robichaud, Savoie et al. 2001; Robichaud, Savoie et al. 2002; Robichaud, Stamatiou et al. 2002). Conforme ilustrado no Gráfico 20, o tratamento com rolipram reduziu o tempo de sono induzido por cetamina/xilazina, conforme já esperado. No entanto, o tratamento com LASSBio-448 e seus análogos (6,25 - 100 $\mu\text{mol/kg}$) induziu efeito similar de redução do tempo de sono, indicando uma ação indutora de êmese por parte desta série de compostos.

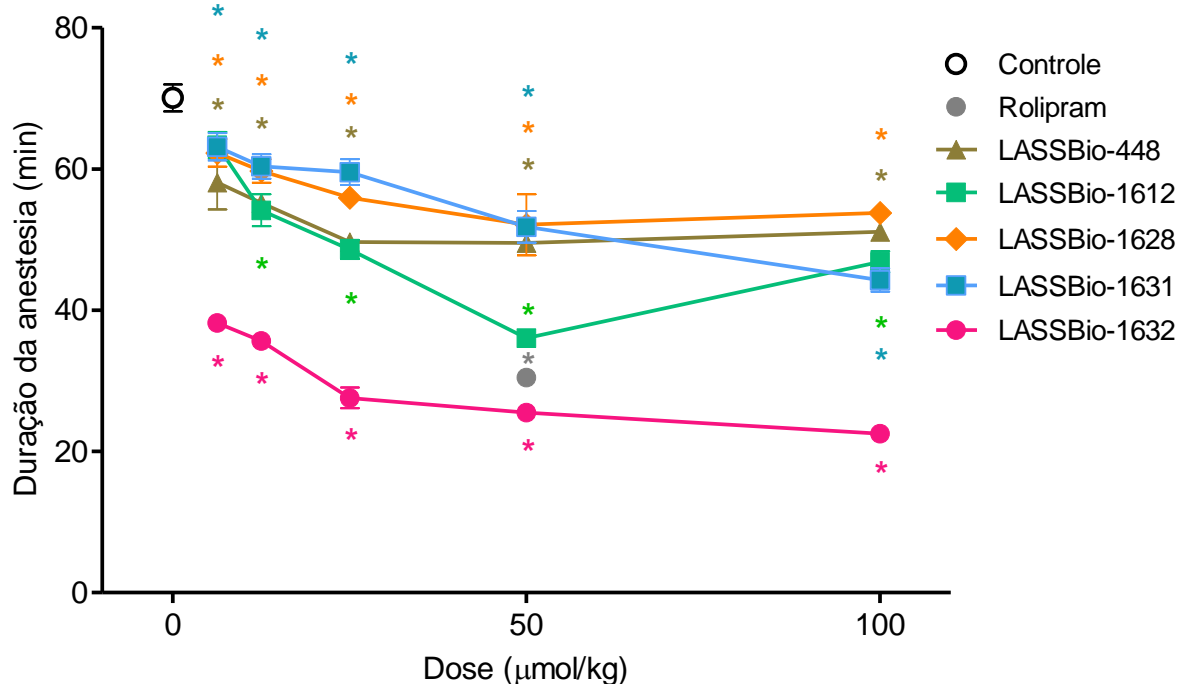


Gráfico 20: Efeito dos análogos do LASSBio-448 na duração da anestesia induzida pela combinação de ketamina e xilazina em camundongos. Os camundongos foram anestesiados com uma combinação de ketamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal em injeção única. Após 15 minutos os compostos ou veículo foram administrados por via subcutânea e os animais subsequentemente colocados em decúbito dorsal. A duração da anestesia foi definida como o intervalo entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento (saída da posição de decúbito dorsal para ventral). Os resultados representam média \pm E.P.M. (n= 7). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5. Discussão

A inflamação pulmonar decorrente de poluentes ambientais, incluindo lipopolissacarídeo (LPS) ou sílica, desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão de doenças pulmonares agudas e crônicas, incluindo lesão pulmonar aguda e silicose. Estas representam um desafio constante para ciência, estando entre as doenças mais frequentes e debilitantes com taxas significativas de morbidade e mortalidade, e sem tratamento adequado e/ou eficaz.

Diante deste cenário, torna-se imprescindível a busca por terapias capazes de controlar as diversas doenças pulmonares de forma eficaz e com uma segurança terapêutica adequada. A terapia para as doenças pulmonares agudas e crônicas deve focar de forma especial a redução da inflamação e o remodelamento tecidual, protegendo os pacientes contra a perda progressiva da função pulmonar e melhorando a qualidade de vida.

Nesse contexto, no presente trabalho buscamos identificar novos compostos sulfonamídicos e sulfonilidrazônicos, planejados como inibidores de PDE-4, avaliando a potencial atividade inibitória sobre a isoenzima PDE-4 e, posteriormente avaliação da atividade farmacológica no controle da inflamação pulmonar induzida por LPS e partículas de sílica em sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*.

A enzima PDE-4 é considerada importante alvo terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares agudas e crônicas (Giembycz e Smith 2006). Ela catalisa a hidrólise do AMP cíclico, que tem papel crucial na sinalização intracelular de células inflamatórias, tais como mastócitos, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, além de células estruturais como fibroblastos, célula epiteliais, dentre outras. Existem de fato inúmeros exemplos onde o aumento nos níveis intracelulares de AMP cíclico, associado à inibição de PDE-4, causa redução expressiva da função pró-inflamatória de leucócitos e células estruturais presentes nos pulmões (Caramori e Adcock 2003; Barnes, 2006; Giembycz e Smith 2006), relaxamento do músculo liso das vias aéreas e diminuição do edema pulmonar (Mehats e cols, 2003).

A avaliação da atividade inibitória sobre a isoenzima PDE-4 pelos compostos sulfonamídicos e sulfonilidrazônicos foi demonstrada por interação entre a enzima e o substrato marcado por fluorescência. Em nosso estudo foi verificada diferença significativa na atividade inibitória apresentada pelos compostos metilados e não

metilados. De modo geral, os compostos não metilados, não apresentaram atividade inibitória significativa frente às isoformas de PDE-4. Por outro lado, a *N*-metilação juntamente com a presença de grupos com propriedades elétron doadoras (Ar = *p*-metoxibenzeno) ou mais hidrofóbicos (Ar = bifenila ou naftila) levou a um aumento da atividade inibitória acima de 40% para os LASSBios-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 e LASSBio-1632, indicando uma influência positiva da presença da metila como substituinte e favorecendo o reconhecimento enzimático.

Com base nestes achados, estudos complementares foram realizados visando a identificação da atividade farmacológica do composto LASSBio-448 e seus análogos LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 e LASSBio-1632 utilizando sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Considerando-se que os macrófagos alveolares estão fortemente envolvidos no contexto das doenças pulmonares agudas e crônicas, são células fundamentais para o desenvolvimento da resposta inflamatória e possuem uma importante função de defesa, por secretarem uma ampla gama de mediadores inflamatórios, demos continuidade aos estudos avaliando o potencial efeito dos compostos selecionados sobre a linhagem de macrófagos alveolares murinos (AMJ2C11) estimulados com LPS *in vitro*. Os dados demonstraram que os macrófagos foram ativados, como evidenciado através da elevação dos níveis de TNF- α liberado e, quando do tratamento com rolipram e os compostos candidatos houve uma redução significativa na produção de TNF- α por essas células. Suportando nossos achados, foi demonstrado por alguns autores que macrófagos liberam TNF- α em resposta ao LPS e que inibidores de PDE-4, em virtude da sua capacidade em bloquear a atividade desta enzima, em monócitos e macrófagos, elevam os níveis de AMPc, atenuando a produção de TNF- α (Gantner e cols, 1997; West e cols, 1997; Medzhitov e Janeway 2000). É interessante notar que o *ranking* de potência dos compostos testados no ensaio de atividade inibitória sobre a isoenzima PDE-4 (Tabela 2) difere daquele observado no teste de viabilidade celular, quando o composto LASSBio-1632 na concentração de 10^{-4} M mostrou-se citotóxico para a linhagem de macrófagos alveolares murinos (AMJ2C11), esse fato, pode ser atribuído a diferenças nas propriedades físico-químicas entre os compostos, incluindo permeabilidade celular ou solubilidade.

Ao atingir o espaço alveolar, o LPS interage com os macrófagos residentes, ativando-os, e estes por sua vez secretam citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-

α , IL-1 β e IL-6, estimulando assim os neutrófilos, e favorecendo a liberação de espécies reativas de nitrogênio tais como óxido nítrico, proteases, leucotrienos, fator de ativação plaquetária (PAF), resultando no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda ou sua forma mais grave, SARA (Moncao-Ribeiro e cols, 2011).

Ao longo dos anos, esforços consideráveis têm sido realizados no intuito de desenvolver modelos experimentais que reproduzam as alterações fisiopatológicas evidenciadas nas doenças respiratórias agudas e crônicas, como SARA e silicose, buscando mimetizar a fisiopatologia em humanos. Modelos animais são ferramentas essenciais para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessas doenças, e são fundamentais para o desenvolvimento pré-clínico de novos agentes terapêuticos (Drazen e cols, 1999; Bates e cols, 2009; Lacher e cols, 2010; Proudfoot e cols, 2011; Corazza e Kaufmann, 2012). As alterações inflamatórias encontradas nesses modelos variam de acordo com o agente etiológico (LPS, sílica), a via do desafio (intranasal, intratraqueal) e a cepa do animal (Lacher e cols, 2010; Hakansson e cols, 2012). No entanto, apesar das limitações, nenhum modelo animal é capaz de reproduzir de forma fidedigna todas as particularidades das doenças humanas, devido às diversas características anatômicas e fisiológicas de cada espécie animal. De qualquer forma, foi a partir dos modelos animais que houve, nas últimas décadas, um aumento significativo na compreensão de eventos-chaves e identificação de potenciais alvos terapêuticos associados ao desenvolvimento de doenças inflamatórias pulmonares agudas e crônicas (Bates e cols, 2009; Lacher e cols, 2010).

Os modelos experimentais utilizando LPS têm sido amplamente aplicados para estudar lesão inflamatória pulmonar aguda, podendo mimetizar as alterações morfológicas e funcionais observadas em situações clínicas secundárias à presença de lipopolissacarídeo circulante. Este agente flogístico está presente no meio ambiente e é, muitas vezes, encontrado em concentrações elevadas em poeiras orgânicas e em poluentes do ar (Faffe e cols, 2000). A exposição a baixas doses de LPS produz inflamação devido à ativação de macrófagos e neutrófilos, enquanto que doses mais elevadas causam lesão tecidual (Rojas e cols, 2005).

Achados da literatura mostram que a inflamação pulmonar induzida por LPS resulta em um quadro de alterações fisiopatológicas marcado por neutrofilia (Kabir e cols, 2002), ativação de macrófagos e também um aumento da resposta à metacolina, caracterizando a presença de um quadro de hiper-reatividade das vias

aéreas (Spond e cols, 2004). Em linha com esses achados, observamos que o tratamento com cilomilaste, conhecido inibidor da PDE-4, o protótipo LASSBio-448, assim como os compostos LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631, LASSBio-1632 foram capazes de prevenir o declínio da função pulmonar e o aparecimento da hiper-reatividade induzida por LPS, sugerindo que estes compostos podem apresentar propriedades anti-inflamatórias similares aos compostos de referência.

Na avaliação histológica realizada em nosso estudo, observamos que os animais desafiados com LPS apresentaram alterações morfológicas características e com descaracterização da arquitetura pulmonar. Verificamos, também, a presença intensa de neutrófilos nas regiões alveolares e peribronquial. Esses achados são comuns aos processos inflamatórios apresentados em pacientes com SARA, asma e DPOC, promovendo alterações na morfologia do órgão, envolvendo as vias aéreas periféricas. Desse modo, nessas condições inflamatórias do pulmão, os leucócitos polimorfonucleares (PMN) migram para as vias aéreas sendo possível observar alterações brônquicas do tecido pulmonar, como aumento da metaplasia epitelial e aumento do número de neutrófilos (mas não no número de eosinófilos) na mucosa brônquica (Barnes, 2000; Bousquet e cols, 2000; Jeffery, 2001). Foi possível comprovar que os animais tratados com os LASSBios e cilomilaste, apresentaram um redução no infiltrado inflamatório em comparação aos animais desafiados com o LPS.

É comum na exposição ao LPS, o desenvolvimento de uma intensa inflamação pulmonar, com infiltração celular, dano endotelial e aumento da permeabilidade alveolar, alveolite, bronquiolite, podendo em estágios crônicos induzir à necrose (Vernooy e cols, 2002; Knapp e cols, 2006; Rydell-Tormanen e cols, 2006). Estudos *in vitro* com dois inibidores seletivos de PDE-4, rolipram e cilomilaste, indicaram que ambos podem ser capazes de suprimir a atividade de macrófagos e fibroblastos, permitindo o bloqueio do remodelamento brônquico (Gantner e cols, 1997; Kohyama e cols, 2002).

No processo inflamatório agudo induzido por LPS predominam neutrófilos, razão pela qual resolvemos avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), uma enzima predominantemente de neutrófilos (Klebanoff, 2005). Sua liberação a partir dos grânulos intracelulares para o exterior da célula é nociva aos tecidos, por produzir grandes quantidades de produtos oxidantes e altamente reativos (Haegens

e cols, 2008). A dosagem da enzima MPO em pulmão é utilizada como um marcador bioquímico indireto do recrutamento de neutrófilos para o órgão. Os níveis da enzima em animais desafiados com LPS apresentaram aumento significativo em relação aos animais controle, indicando resposta inflamatória neutrofílica e lesão tecidual no pulmão em consequência à inflamação por LPS (Moraes e cols, 2006). Em nossos resultados demonstramos que quando comparados ao grupo LPS, os nossos compostos foram capazes de reduzir a atividade da MPO no pulmão dos animais de maneira semelhante ao cilomilaste. Confirmando nossos dados, alguns autores demonstraram que animais desafiados com LPS apresentam níveis de MPO elevados e quando tratados com o rolipram, inibidor de PDE-4, atenuava os níveis dessa enzima (Miotla e cols, 1998).

O LPS é o bioativador mais potente do sistema imunológico, em especial da imunidade inata, e a exposição aguda a essa endotoxina inicia uma série de eventos do processo inflamatório como o recrutamento de células, em especial neutrófilos, aumento da secreção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6, INF- γ , MIP-1, KC, enzimas lisossomais, tais como elastase e MPO, eicosanoides, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de aumento de permeabilidade vascular, culminando em um quadro de edema pulmonar (Spond e cols, 2001; Spond e cols, 2004; Rojas e cols, 2005; Yamada e cols, 2008; Albaiceta e cols, 2010; Bryant e cols, 2010; Moncao-Ribeiro e cols, 2011; Hakansson e cols, 2012; Janssen e Henson, 2012; Yeh e cols, 2014).

Níveis elevados de TNF e IL-6 são frequentemente observados no lavado broncoalveolar de pacientes com SARA, asma e DPOC, e estão relacionados com a gravidade da doença (Matthay e cols, 2012; Liu e cols, 2013; Friebe e cols, 2014). O aumento dos níveis intracelulares de AMPc leva à inibição da produção de citocinas, quimiocinas, citotoxicidade e agregação de células (Torphy e Undem, 1991; Deng e cols, 2006; Yang e cols, 2012). Como esperado, o tratamento com o rolipram (Kummerle e cols, 2012), cilomilaste e roflumilaste (Buenestado e cols, 2013), conhecidos inibidores de PDE-4, inibiram a produção das citocinas TNF- α e IL-6, assim como das quimiocinas MIP-1 e MIP-2 (Sanz e cols, 2007; Tang e cols, 2010). Observamos também, que de maneira geral, o tratamento com o LASSBio-448, LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 e LASSBio-1632 foi eficaz em inibir a produção destas citocinas e de algumas quimiocinas no tecido pulmonar de animais desafiados com LPS, indicando que a supressão desses mediadores pelo

tratamento com os compostos pode ter contribuído para atenuação da lesão pulmonar induzida por LPS. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados em animais (Goncalves de Moraes e cols, 1996; Miotla e cols, 1998) e seres humanos (Michel e cols, 1997).

Seguindo a proposta do trabalho, buscamos delinear a atividade dos compostos LASSBios e cilomilaste em modelo experimental de silicose murino, visto que são alvos importantes no contexto das doenças inflamatórias pulmonares crônicas, e não existirem trabalhos acerca dos inibidores de PDE4 nesses modelos. Ao longo dos anos, vários modelos de silicose experimental foram desenvolvidos com o intuito de melhor caracterizar o quadro da doença, buscando ao máximo reproduzir as alterações morfológicas semelhantes às encontradas em humanos (Arras e cols, 2001; Borges e cols, 2001; Ortiz e cols, 2001; Desaki, Sugawara e cols, 2002). Achados anteriores do nosso grupo demonstraram que 28 dias após o desafio intranasal único com partículas de sílica, 10 mg/animal, camundongos Swiss-Webster foram capazes de reproduzir fenômenos coincidentes à silicose humana, incluindo a presença de nódulos nos pulmões e expressiva resposta fibrótica com presença de granulomas extensos e densos (Ferreira e cols, 2013).

Já é bem reportado que a resposta inflamatória pulmonar de caráter, tanto agudo quanto crônico, reflete-se diretamente em um comprometimento da mecânica respiratória (Macedo-Neto e cols, 1998; Parker e cols, 1999; Petak e cols, 2002). Em paciente silicóticos, o teste espirométrico é considerado uma das formas para o diagnóstico da silicose, permitindo, ainda, o acompanhamento do desenvolvimento da doença (Gamble e cols, 2004). Em estágios avançados, pacientes silicóticos, apresentam um declínio da função pulmonar decorrente da restrição à expansividade dos pulmões devido às modificações estruturais das vias aéreas e do parênquima pulmonar (Terra Filho e Santos Ude, 2006; Jindal, 2013). Nossos dados foram consistentes com observações anteriores que demonstraram o aumento nos níveis basais de resistência e elastância pulmonar, 28 dias após o contato inicial com sílica, comparados aos animais controles, e que a aerossolização de concentrações crescentes do agente colinérgico metacolina, levou a um quadro de exacerbação da resposta de resistência e elastância, caracterizando um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas (Ferreira e cols, 2013). Essa resposta de hiper-reatividade apresenta-se de forma coerente com o verificado em pacientes silicóticos (Forastiere e cols, 2002; Montes e cols, 2004). Analisando o efeito dos compostos

LASSBios e cilomilaste, observamos uma marcada supressão da resposta de hiperreatividade das vias aéreas à metacolina nos parâmetros de resistência e elastância pulmonar.

Dados da literatura têm demonstrado que camundongos, assim como humanos, quando expostos a partículas de sílica cristalina, desenvolvem lesões inflamatórias granulomatosa e intensa reação fibrótica no parênquima pulmonar (Perez-Ramos e cols, 1999). Em nossos ensaios, observamos que camundongos silicóticos apresentaram um intenso processo inflamatório e ocupação de grande área do parênquima pulmonar por nódulos silicóticos, além de um acúmulo excessivo de colágeno no tecido pulmonar. Quando do tratamento com os LASSBios e cilomilaste houve uma redução de maneira eficaz na infiltração de células inflamatórias, bem como na formação de granulomas, além de marcada diminuição da deposição de colágeno no parênquima pulmonar. A melhora da condição do parênquima, devido à redução da infiltração celular e da formação de granulomas, promovida pelos compostos pode ter contribuído para o restabelecimento da função pulmonar dos animais silicóticos tratados.

Inúmeros mediadores inflamatórios estão envolvidos na progressão da silicose (Vanhee e cols, 1995). Em nosso estudo demonstramos que o tratamento com os LASSBios e cilomilaste, de uma forma geral, reduziu a produção das quimiocinas KC, MCP-1 e MIP-1 e das citocinas TNF- α e INF γ no pulmão dos animais silicóticos. Esta resposta pode estar contribuindo para diminuição da resposta inflamatória verificada na condição do tratamento com os compostos, uma vez que as quimiocinas KC e MCP-1 são importantes no recrutamento de neutrófilos e monócitos, respectivamente. Além disso, verificamos que os compostos mostraram-se eficazes em inibir a deposição de colágeno no pulmão de animais silicóticos, fato este que se relaciona com a inibição da geração da citocina pró-fibrótica TNF α , observada no trabalho.

Os fibroblastos pulmonares são células diretamente relacionadas à fibrogênese no contexto da silicose e partículas de sílica são capazes de estimular diretamente essas células (Arcangeli e cols, 2001; Baroni e cols, 2001) que atuam como importante fonte de colágeno e quimiocinas como MCP-1 (Galindo e cols, 2001; Hao e cols, 2003). Tendo em vista a grande relevância dos fibroblastos no desencadeamento da fibrose induzida por partículas de sílica, avaliamos a ação direta dos compostos LASSBios e cilomilaste sobre a proliferação de fibroblastos

pulmonares. Verificamos que o tratamento com os compostos e cilomilaste reduziram a taxa de proliferação de fibroblastos provenientes de pulmão de camundongos normais estimulados com IL-13. Estes resultados entram em acordo com os dados obtidos de ensaios *in vivo*, onde verificamos redução de ambos, colágeno e MCP-1, no tecido pulmonar.

Apesar do sucesso terapêutico de vários inibidores de PDE4, e agora desses novos compostos sulfonamídicos e sulfonilidrazônicos, em modelos *in vitro* e *in vivo*, uma ampla gama de efeitos colaterais, caracterizados pela presença de desconforto do TGI, levando a náuseas e vômitos, tem sido associada à ação farmacológica desta classe de fármacos. Dessa forma, foi essencial a investigação da capacidade desses compostos em promover os efeitos adversos mencionados.

Uma vez que roedores não possuem um reflexo emético, não é possível investigar diretamente o papel desses compostos nos diferentes subtipos de PDE4 na êmese, então, foi selecionado o modelo de avaliação indireta do tempo de sono induzido por quetamina e xilazina, uma resposta biológica similar que mede a reversão da anestesia induzida por agonistas α_2 -adrenérgicos (Robichaud e cols, 2001; Robichaud e cols, 2002a/b). Dessa forma, foi possível avaliar se o protótipo LASSBio-448 e seus análogos poderiam induzir estes efeitos adversos, comparando-os ao padrão rolipram.

Na avaliação indireta do efeito central dos compostos LASSBios, desenhados como inibidores de PDE-4, no modelo de anestesia por cetamina e xilazina, observamos que da mesma forma que os compostos de referência, os LASSBios se mostraram capazes de alterar o tempo de anestesia induzido por cetamina e xilazina, demonstrando que possivelmente eles apresentariam efeitos eméticos. De fato era de se esperar esse resultado em virtude que os todos compostos apresentaram uma maior seletividade para isoenzima PDE4A1A e PDE4D, e nenhuma atividade inibitória sobre a PDE4B e PDE4C.

Robichaud e colaboradores demonstraram que a êmese, resultante da administração de inibidores de PDE4 é devido à inibição seletiva de PDE4D, uma das quatro famílias de genes de PDE4 presentes no tronco cerebral. Esta descoberta não foi aprazível, visto que os inibidores de PDE4 clinicamente mais avançadas são seletivos para PDE4D. No entanto, os dados demonstraram uma fraca tolerância destes compostos em ensaios clínicos. A ação hipnótica de fármacos, tais como xilazina, agonista α_2 -adrenérgico, é exercida no *locus*

coeruleus, núcleo dentro do tronco cerebral formado por um aglomerado de neurônios capazes de sintetizar e produzir quantidades significativas de catecolaminas, em especial a noradrenalina, em que fibras ascendentes e descendentes noradrenérgicas originam na inervação do SNC. A ativação destes $\alpha 2$ -adrenoceptores em locais pré-sinápticos inibe a adenilil-ciclase e reduz os níveis intracelulares de AMPc, levando a um estado de anestesia, sendo essa ação revertida em roedores tratados com inibidores de PDE4. Esta descoberta foi feita através do ensaio de anestesia mediada por $\alpha 2$ -adrenérgico em furões, mostrando que os inibidores de PDE4 ativam o reflexo de vômito em furões através de uma via simpática, imitando as ações farmacológicas de ioimbina, um antagonista $\alpha 2$ -adrenérgico. Além disso, a êmese foi impedida em animais que receberam o agonista seletivo $\alpha 2$ -adrenérgico, clonidina (Robichaud e cols, 2001) e sugeriram que o aumento de AMPc dentro das terminações noradrenérgicas centrais por inibidores de PDE4 promove êmese, e isto pode ser atenuado através de $\alpha 2$ -adrenérgicos mediada pela inibição da adenilil-ciclase. Assim, a capacidade de inibidores de PDE4 em reverter à anestesia induzida por xilazina representa um índice comportamental do seu potencial emético que pode ser utilizado em espécies de animais que não vomitam.

Robichaud (2002a/b) explorou esse fenômeno utilizando camundongos deficientes tanto para o gene PDE4B como PDE4D e constatou que a êmese está ligada fortemente com a inibição da PDE4D. Foi visto que a duração da anestesia induzida por xilazina em camundongos deficientes para PDE4D foi significativamente menor em comparação aos selvagens, enquanto que a anestesia para camundongos deficientes da PDE4B em relação a selvagem foi similar. Da mesma forma, perceberam que um inibidor de PDE4 reduzia significativamente a duração da anestesia em camundongos selvagens, mas não em camundongos deficientes para PDE4D. Além disso, observou que a atividade da PDE4 no tronco cerebral de camundongos deficientes para PDE4D foi significativamente inferior em comparação com os selvagens e os deficientes para PDE4B, indicando que PDE4D é o principal regulador do metabolismo de AMPc nesta estrutura cerebral. Diante disso, perceberam que a êmese está relacionada com a capacidade dos inibidores de PDE4 em penetrar o SNC ao invés de sua afinidade com a PDE4 (Robichaud e cols, 2002a; Robichaud e cols, 2002b).

O inibidor de PDE-4, roflumilaste, único representante da classe empregado na clínica, apresenta eficácia reconhecida no tratamento da asma, DPOC e SARA, mas a sua utilização é limitada devido aos efeitos adversos como náuseas e vômitos (Baeumer e cols, 2005; Chung, 2006; Maurice e cols, 2014; Yan e cols, 2014; Yu e cols, 2014). O principal desafio no desenvolvimento de uma nova geração de inibidores de PDE-4 é, sem dúvida, melhorar o índice terapêutico desses compostos (Lipworth, 2005). Várias abordagens visando à otimização dessa classe de fármacos vêm sendo empregada, dentre elas o desenho de inibidores seletivos para os subtipos de PDE-4 (Kodimuthali e cols, 2008).

Em conjunto, este trabalho mostra o importante papel regulatório exercido pelos compostos LASSBios e cilomilaste, na resposta inflamatória induzida por LPS e partículas de sílica no pulmão de camundongos. Os dados obtidos demonstraram uma redução da produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias e fibróticas, o que acarreta na inibição da migração de leucócitos e na deposição de colágeno no parênquima pulmonar. Desta forma, há melhora no quadro inflamatório e fibrótico que conseqüentemente resulta no restabelecimento da função pulmonar desses animais, o que indica uma correlação farmacológica que possibilita o desenvolvimento de um agente terapêutico para SARA e a silicose.

De qualquer forma, estudos adicionais visando melhorar a potência desses compostos se fazem necessários, a fim de compreender o perfil cinético de modo a minimizar ou mesmo excluir os efeitos adversos típicos dos inibidores de PDE4, ênese, comprometendo sua eventual aplicação como candidatos a fármacos inibidores de PDE4 promissores, sugerindo a necessidade de otimização estrutural.

6. Conclusões

- Verificamos que a partir de uma série de 13 derivados sulfonamídicos e sulfonilidrazônicos do LASSBio-448, foram identificados 4 deles com atividade inibitória para as isoformas PDE4A1A e PDE4D3, porém não para a PDE4B1 e PDE4C. Os compostos de referência apresentaram atividade inibitória sobre todas as isoenzimas testadas;
- Os derivados LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 e LASSBio-1632 apresentaram atividade inibitória sobre a produção de TNF- α a partir de macrófagos alveolares murinos (linhagem AMJ2C11) ativados por LPS *in vitro*;
- Os quatro derivados selecionados mostraram atividade anti-inflamatória e anti-fibrótica nos modelos de doença pulmonar aguda (LPA) e crônica (silicose) avaliados em camundongos;
- Todos os derivados apresentaram atividade central pró-emética, um efeito adverso associado aos inibidores de PDE4;

Em conjunto nossos resultados mostram que os derivados selecionados LASSBio-1612, LASSBio-1628, LASSBio-1631 e LASSBio-1632 se mostram promissores porém, apesar de apresentarem propriedades terapêuticas importantes nos modelos de inflamação pulmonar testados, os referidos compostos precisam ser otimizados para minimização dos efeitos indesejáveis.

7. Referências

ABBOTT-BANNER, K.H.; PAGE, C.P. Dual PDE3/4 and PDE4 inhibitors: novel treatments for COPD and other inflammatory airway diseases. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**. 114: 365-376.2014.

ADDIS, B.J. Pathology of pulmonary disease. **The Journal of Pathology**. 173: 297-297. 1994.

AKAR, F.; MUTLO, O.; CELIKYURT, I.K.; ULAK, G.; ERDEN, F.; BEKTAS, E.; TANYERI, P. Effects of Rolipram and Zaprinast on Learning and Memory in the Morris Water Maze and Radial Arm Maze Tests in Naive Mice. **Drug research (Stuttg)**. 2014.

ALBAICETA, G.M.; GUTIERREZ-FERNANDEZ, A.; GARCIA-PRIETO, E.; PUENTE, X.S.; PARRA, D.; ASTUDILLO, A.; CAMPESTRE, C.; CABRERA, S.; GONZALEZ-LOPEZ, A.; FUEYO, A.; TABOADA, F.; LOPEZ-OTIN, C. Absence or inhibition of matrix metalloproteinase-8 decreases ventilator-induced lung injury. **American journal of respiratory cell and molecular biology**. 43: 555-563. 2010.

ANTONIU, S.A. New therapeutic options in the management of COPD - focus on roflumilast. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**. 6: 147-155. 2011.

ARBEX, M.A.; SANTOS UDE, P.; MARTINS, L.C.; SALDIVA, P.H.; PEREIRA, L. A.; BRAGA, A.L. Air pollution and the respiratory system. **Jornal brasileiro de pneumologia**. 38: 643-655. 2012.

ARCANGELI, G.; CUPELLI, V.; GIULIANO, G. Effects of silica on human lung fibroblast in culture. **The Science of the total environment**. 270:135-139. 2001.

ARRAS, M.; HUAUX, F.; VINK, A.; DELOS, M.; COUTELIER, J.P.; MANY, M.C.; BARBARIN, V.; RENAULD, J.C.; LISON, D. Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particles in a murine model. **American journal of respiratory cell and molecular biology**. 24: 368-375. 2001

BAEUMER W.; SZELENYI, I.; KIETZMANN, M. Cilomilast, an orally active phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of COPD. **Expert review of clinical immunology**. 1:27-36. 2005.

BAILLIE, G.S.; MACKENZIE, S.J.; McPHEE, I.; HOUSLAY, M.D. Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. **British journal of pharmacology**. 131: 811-819. 2000.

BAKAN, N.D.; OZKAN, G.; CAMSARI, G.; GUR, A.; BAYRAM, M.; ACIKMESE, B.; CETINKAYA, E. Silicosis in denim sandblasters. **Chest**. 140: 1300-1304. 2011.

BARAD, M.; BOURTCHOULADZE, R.; WINDER, D.G.; GOLAN, H.; KANDEL, E. Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment

of long-lasting long-term potentiation and improves memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95:15020-15025. 1998.

BARBOZA, C.E.; WINTER, D.H.; SEISCENTO, M.; SANTOS UDE, P. TERRA FILHO, M. Tuberculosis and silicosis: epidemiology, diagnosis and chemoprophylaxis. **Jornal brasileiro de pneumologia**. 34:959-966. 2008.

BARNES, P.J. Chronic obstructive pulmonary disease. **The New England journal of medicine**. 343:269-280. 2000.

BARNES, P.J. New therapies for asthma. **Trends in molecular medicine**. 12: 515-520. 2006.

BARNETTE, M.S.; CHRISTENSEN, S.B.; ESSAYAN, D.M.; GROUS, M.; PRABHAKAR, U.; RUSH, J.A.; KAGEY-SOBOTKA, A.; TORPHY, T.J. SB 207499 (Ariflo), a potent and selective second-generation phosphodiesterase 4 inhibitor: in vitro anti-inflammatory actions. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. 284: 420-426. 1998.

BARONI, T.; BODO, M.; D'ALESSANDRO, A.; CONTE, C.; CALVITTI, M.; MUZI, G.; LUMARE, A.; BELLOCCHIO, S.; ABBRITTI, G. Silica and its antagonistic effects on transforming growth factor-beta in lung fibroblast extracellular matrix production. **Journal of investigative medicine**. 49: 146-156. 2001.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. 2008

BATES, J.H.; RINCON, M.; IRVIN, C.G. Animal models of asthma. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**. 297:L401-410. 2009.

BEAMER, C.A.; HOLIAN, A. Scavenger receptor class A type I/II (CD204) null mice fail to develop fibrosis following silica exposure. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**. 289:L186-195. 2005.

BEARD, M.B.; OLSEN, A.E.; JONES, R.E.; ERDOGAN, S.; HOUSLAY, M.D.; BOLGER, G.B. UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. **The Journal of biological chemistry**. 275:10349-10358. 2000.

BEASLEY, S.C.; COOPER, N.; GOWERS, L.; GREGORY, J.P.; HAUGHAN, A.F.; HELLEWELL, P.G.; MACARI, D.; MIOTLA, J.; MONTANA, J.G.; MORGAN, T.; NAYLOR, R.; RUNCIE, K.A.; TULADHAR, B.; WARNECK, J.B. Synthesis and evaluation of a novel series of phosphodiesterase IV inhibitors. A potential treatment for asthma. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. 8:2629-2634. 2008.

BEGHE, B.; RABE, K.F.; FABBRI, L.M. Phosphodiesterase-4 inhibitor therapy for lung diseases. **American journal of respiratory and critical care medicine**. 188:271-278. 2013.

BEGIN, R.; BERGERON, D.; SAMSON, L.; BOCTOR, M.; CANTIN, A. CT assessment of silicosis in exposed workers. **American journal of roentgenology**. 148:509-514. 1987.

BENDER, A.T.; BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological reviews**. 58: 488-520. 2006.

BENDER, A.T.; OSTENSON, C.L.; GIORDANO, D.; BEAVO, J.A. Differentiation of human monocytes in vitro with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in cGMP phosphodiesterase expression. **Cellular signalling**. 16:365-374. 2004.

BEUTLER, B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. **Current topics in microbiology and immunology**. 270: 109-120. 2002.

BIELEKOVA, B.; RICHERT, N.; HOWARD, T.; PACKER, A.N.; BLEVINS, G.; OHAYON, J.; McFARLAND, H.F.; STURZEBECHER, C.S.; MARTIN, R. Treatment with the phosphodiesterase type-4 inhibitor rolipram fails to inhibit blood--brain barrier disruption in multiple sclerosis. **Journal Multiple Sclerosis** 15: 1206-1214. 2009.

BLOCK, F.; SCHMIDT, W.; NOLDEN-KOCH, M.; SCHWARZ, M. Rolipram reduces excitotoxic neuronal damage. **Neuroreport**.12:1507-1511. 2001.

BON, A.M.T.Exposição ocupacional a sílica entre trabalhadores de marmoaria no município de São Paulo. Tese de Doutorado em Saúde Ambiental, Universidade de São Paulo. 2007.

BORGES, V.M.; FALCAO, H.; LEITE-JUNIOR, J.H.; ALVIM, L.; TEIXEIRA, G.P.; RUSSO, M.; NOBREGA, A.F.; LOPES, M.F.; ROCCO, P.M.; DAVIDSON, W.F.; LINDEN, R.; YAGITA, H.; ZIN, W.A.; DOS REIS, G.A. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. **The Journal of experimental medicine**. 194: 155-164. 2001.

BOSMANN, M.; RUSSKAMP, N.F.; WARD, P.A. Fingerprinting of the TLR4-induced acute inflammatory response. **Experimental and molecular pathology**. 93:319-323. 2012.

BOUSQUET, J.; JEFFERY, P.K.; BUSSE, W.W.; JOHNSON, M.; VIGNOLA A.M. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **American journal of respiratory and critical care medicine**. 161:1720-1745. 2000.

BROWN, J.M., ARCHER, A.J.; PFAU, J.C.; HOLIAN, A. Silica accelerated systemic autoimmune disease in lupus-prone New Zealand mixed mice. **Clinical and experimental immunology**. 131: 415-421. 2003.

BROWN, L.M.; CALFEE, C.S.; MATTHAY, M.A.; BROWER, R.G.; THOMPSON, B.T.; CHECKLEY, W. A simple classification model for hospital mortality in patients with acute lung injury managed with lung protective ventilation. **Critical care medicine**. 39: 2645-2651. 2011.

BROWN, W.M. Treating COPD with PDE 4 inhibitors. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**. 2: 517-533. 2007.

BRYANT, C.E.; SPRING, D.R.; GANGLOFF, M.; GAY, N.J. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. **Nature reviews. Microbiology**. 8:8-14. 2010.

BUENESTADO, A.; CHAUMAIS, M.C.; GRASSIN-DELYLE, S.; RISSE, P.A.; NALINE, E.; LONGCHAMPT, E.; TENOR, H.; DEVILLIER, P. Roflumilast inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and chemokine production by human lung parenchyma. **PLoS One**. 8: e74640. 2013.

BUTCHER, R.W.; SUTHERLAND, E.W. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. **The Journal of biological chemistry**. 237: 1244-1250. 1962.

CARAMORI, G.; ADCOCK, I. Pharmacology of airway inflammation in asthma and COPD. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**. 16: 247-277. 2003.

CARD, G.L.; ENGLAND, B.P.; SUZUKI, Y.; FONG, D.; POWELL, B.; LEE, B.; LUU, C.; TaABRIZAD, M.; GILLETTE, S.; IBRAHIM, P.N.; ARTIS, D.R.; BOLLAG, G.; MILBURN, M.V.; KIM, S.H.; SCHLESSINGER, J.; ZHANG, K.Y. Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases. **Structure**. 12: 2233-2247. 2004.

CARDOZO, S.V.S. Triagem e avaliação das propriedades antiasmáticas de novos derivados sulfonamídicos análogos do rolipram. Dissertação de Mestrado. 2010.

CARNEIRO, A.P.S.; CAMPOS, L.O.; GOMES, M.F. Perfil de 300 trabalhadores expostos à sílica atendidos ambulatorialmente em Belo Horizonte, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. 2002.

CARNEIRO, A.P.S.; ALGRANTTI, E. Formas de Apresentação da silicose. Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho - FUNDACENTRO. [Acesso em 15 set 2014]. Disponível em: <http://www.fundacentro.gov.br/silica-e-silicose/links>. 2014.

CARNEIRO, A.P.S.; BARRETO, S.M.; SIQUEIRA, A.L.; LA ROCCA, P.F. Índice de exposição à sílica na atividade de mineração de ouro. **Revista de Saude Publica**. 40:83-91. 2006.

CASSEL, S.L.; EISENBARTH, S.C.; IYER, S.S.; SADLER, J.J.; COLEGIO, O.R.; TEPHLY, L.A.; CARTER, A.B.; ROTHMAN, P.B.; FLAVELL, R.A.; SUTTERWALA, F.S. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 105: 9035-9040. 2008.

CASTRANOVA, V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. **Free radical biology & medicine**. 37: 916-925. 2004.

CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. **Environmental health perspectives**. 108: 675-684. 2000.

CASTRANOVA, V.; WALKER, W.E.; VALLYATHAN, V. *Silica and Silica-Induced Lung Diseases*: **Taylor & Francis**. 1995.

CASTRO, H.A.; SILVA, C.G.; VICENTIN G. Estudo das internações hospitalares por pneumoconioses no Brasil, 1984-2003. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. 8: 150-160. 2005.

CHONG, J.; LEUNG, B.; POOLE, P. Phosphodiesterase 4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease. **The Cochrane database of systematic reviews**. 11: CD002309. 2013.

CHUNG, K. F. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. **European journal of pharmacology**. 533: 110-117. 2006.

CIAMBARELLA, B.T. Efeito de terapias anti-TNF-alfa sobre a resposta inflamatória pulmonar crônica induzida por sílica em camundongos. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz. 2013.

COLBECK, I. Screening and Surveillance of Workers Exposed to Mineral Dusts. G.R. Wagner, World Health Organization. **Water, Air, & Soil Pollution**. 103: 445-445. 1998.

CONTI, M.; BEAVO, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. **Annual review of biochemistry**. 76: 481-511. 2007.

CONTI, M.; RICHTER, W.; MEHATS, C.; LIVERA, G.; PARK, J.Y.; JIN, C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. **The Journal of biological chemistry**. 278:5493-5496. 2003.

CORAZZA, N.; KAUFMANN, T. Novel insights into mechanisms of food allergy and allergic airway inflammation using experimental mouse models. **Allergy**. 67: 1483-1490. 2012.

CORBEL, M.; BELLEGUIC, C.; BOICHOT, E.; LAGENTE, V. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. **Cell biology and toxicology**. 18:51-61. 2002.

CORBEL, M.; CAULET-MAUGENDRE, S.; GERMAIN, N.; LAGENTE, V.; BOICHOT, E. Enhancement of gelatinase activity during development of subepithelial fibrosis in a murine model of asthma. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**. 33:696-704. 2003.

CORTELING, R.; WYSS, D.; TRIFILIEFF, A. In vivo models of lung neutrophil activation. Comparison of mice and hamsters. **BMC pharmacology**. 2:1. 2002.

COSTANTINI, L.M.; GILBERTI, R.M.; KNECHT, D.A. The phagocytosis and toxicity of amorphous silica. **PloS one**. 6:e14647. 2011.

CRUZ-MACHADO, S.S. Lipopolysaccharide (LPS): Potent activator and regulator of gene transcription through NF κ B signaling. **Revista da Biologia**. Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, USP. 2010.

CRUZ-ORIVE, L.M.; WEIBEL, E.R. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. **The American journal of physiology**. 258: L148-156. 1990.

DANG, G.T.; BARROS, N.; HIGGINS, S.A.; LANGLEY, R.L.; LIPTON, D. Descriptive review of asbestosis and silicosis hospitalization trends in North Carolina, 2002-2011. **North Carolina medical journal**. 74:368-375. 2013.

DASTIDAR, S.G.; RAJAGOPAL, D.; RAY, A. Therapeutic benefit of PDE4 inhibitors in inflammatory diseases. **Current Opinion in Investigational Drugs**. 8:364-372. 2007.

DAVIS, G.S.; HOLMES, C.E.; PFEIFFER, L.M.; HEMENWAY, D.R. Lymphocytes, lymphokines, and silicosis. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**. 1:53-65. 2001.

DE CAPITANI, E.M. Silicosis (still) among us. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 32: xxxiii-xxxv. 2006.

DE CAPITANI, E.M.; ALGRANTI, E. Other pneumoconioses. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 32: S54-59. 2006.

DENG, Y.M.; XIE, Q.M.; TANG, H.F.; SUN, J.G.; DENG, J.F.; CHEN, J.Q.; YANG, S.Y. Effects of ciclamilast, a new PDE 4 PDE4 inhibitor, on airway hyperresponsiveness, PDE4D expression and airway inflammation in a murine model of asthma. **European journal of pharmacology**. 547:125-135. 2006.

DESAKI, M.; SUGAWARA, I.; IWAKURA, Y.; YAMAMOTO, K.; TAKIZAWA, H. Role of interferon-gamma in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues induced by silica in vivo. **Toxicology and applied pharmacology**. 185:1-7. 2002.

DIAMANT, Z.; SPINA, D. PDE4-inhibitors: a novel, targeted therapy for obstructive airways disease. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**. 24: 353-360. 2011.

DING, M.; CHEN, F.; SHI, X.; YUCESAY, B.; MOSSMAN, B.; VALLYATHAN, V. Diseases caused by silica: mechanisms of injury and disease development. **International immunopharmacology**. 2:173-182. 2002.

DINTER, H. Phosphodiesterase type 4 inhibitors: potential in the treatment of multiple sclerosis? **BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy**. 13: 87-94. 2000.

- DRAZEN, J.M.; FINN, P.W.; DE SANCTIS, G.T. Mouse models of airway responsiveness: physiological basis of observed outcomes and analysis of selected examples using these outcome indicators. **Annual review of physiology**. 61:593-625. 1991.
- ERICKSON, S.E.; MARTIN, G.S.; DAVIS, J.L.; MATTHAY, M.A.; EISNER, M.D. Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005. **Critical care medicine**. 37:1574-1579. 2009.
- ESSAYAN, D.M. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation. **Biochemical pharmacology**. 57: 965-973. 1999.
- ESSAYAN, D.M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. **The Journal of allergy and clinical immunology**. 108: 671-680. 2001.
- FAFFE, D.S.; SEIDL, V.R.; CHAGAS, P.S.; GONCALVES DE MORAES, V.L.; CAPELOZZI, V.L.; ROCCO, P.R.; ZIN, W.A. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. **The European respiratory journal**. 15:85-91. 2000.
- FERREIRA, A.S.; MOREIRA, V.B.; RICARDO, H.M.; COUTINHO, R.; GABETTO, J.M.; MARCHIORI, E. Progressive massive fibrosis in silica-exposed workers. High-resolution computed tomography findings. **Jornal brasileiro de pneumologia**. 32:523-528. 2006.
- FERREIRA, T.P.; DE ARANTES, A.C.; DO NASCIMENTO, C.V.; OLSEN, P.C.; TRENTIN, P.G.; ROCCO, P.R.; HOGABOAM, C.M.; PURI, R.K.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.M. IL-13 immunotoxin accelerates resolution of lung pathological changes triggered by silica particles in mice. **Journal of Immunology**. 191:5220-5229. 2013.
- FICHTNER-FEIGL, S.; STROBER, W.; KAWAKAMI, K.; PURI, R.K.; KITANI, A. IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis. **Nature medicine**. 12:99-106. 2006.
- FIELD, S.K. Roflumilast: an oral, once-daily selective PDE-4 inhibitor for the management of COPD and asthma. **Expert opinion on investigational drugs**. 17: 811-818. 2008.
- FORASTIERE, F.; GOLDSMITH, D.F.; SPERATI, A.; RAPITI, E.; MICELI, M.; CAVARIANI, F.; PERUCCI, C.A. Silicosis and lung function decrements among female ceramic workers in Italy. **American journal of epidemiology**. 156:851-856. 2002.
- FRANCIS, S.H.; BLOUNT, M.A.; CORBIN, J.D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. **Physiological reviews**. 91:651-690. 2011.
- FRIEBE, D.; YANG, T.; SCHMIDT, T.; BORG, N.; STECKEL, B.; DING, Z.; SCHRADER, J. Purinergic signaling on leukocytes infiltrating the LPS-injured lung. **PloS one**. 9:e95382. 2014.

FUBINI, B.; HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. **Free radical biology & medicine**. 34: 1507-1516. 2003.

FUJIMURA, N. Pathology and pathophysiology of pneumoconiosis. **Current opinion in pulmonary medicine**. 6: 140-144. 2000.

GALINDO, M.; SANTIAGO, B.; ALCAMI, J.; RIVERO, M.; MARTIN-SERRANO, J.; PABLOS, J.L. Hypoxia induces expression of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL-8 in human dermal fibroblasts. **Clinical and experimental immunology**. 123:36-41. 2001.

GAMBLE, J.F.; HESSEL, P.A.; NICOLICH, M. Relationship between silicosis and lung function. **Scandinavian journal of work, environment & health**. 30:5-20. 2004.

GANTNER, F.; KUPFERSCHMIDT, R.; SCHUDT, C.; WENDEL, A.; HATZELMANN, A. In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor-alpha release by PDE inhibitors. **British journal of pharmacology**. 121:221-231. 1997.

GHAVAMI, A.; HIRST, W.D.; NOVAK, T.J.. Selective phosphodiesterase (PDE)-4 inhibitors: a novel approach to treating memory deficit? **Drugs in R&D**. 7:63-71. 2006.

GIEMBYCZ, M.A. 4D or not 4D - the emetogenic basis of PDE4 inhibitors uncovered? **Trends in pharmacological sciences**. 23: 548. 2002.

GIEMBYCZ, M.A.; MAURICE, D.H. Cyclic nucleotide-based therapeutics for chronic obstructive pulmonary disease. **Current opinion in pharmacology**. 16: 89-107. 2014.

GIEMBYCZ, M.A.; SMITH, S.J. Phosphodiesterase 7A: a new therapeutic target for alleviating chronic inflammation? **Current pharmaceutical design**. 12: 3207-3220. 2006.

GILLISSEN, A.; GESSNER, C.; HAMMERSCHMIDT, S.; HOHEISEL, G.; WIRTZ, H. Health significance of inhaled particles. **Deutsche medizinische Wochenschrift**. 131:639-644. 2006.

GONCALVES DE MORAES, V.L.; BORIS VARGAFTIG, B.; LEFORT, J.; MEAGER, A.; CHIGNARD, M. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. **British journal of pharmacology**. 117:1792-1796. 1996.

GOODMAN, R.B.; PUGIN, J.; LEE, J.; MATTHAY, M.A. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine & growth factor reviews**. 14:523-535. 2003.

GOSSART, S.; CAMBON, C.; ORFILA, C.; SEGUELAS, M.H.; LEPERT, J.C.; RAMI, J.; CARRE, P.; PIPY, B. Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF-alpha production in rat lung inflammation induced by silica. **The Journal of Immunology**. 156:1540-1548. 1996.

GREENBERG, M.I.; WAKSMAN, J.; CURTIS, J. Silicosis: a review. **Disease-a-month:DM**. 53:394-416. 2007.

GRISWOLD, D.E.; WEBB, E.F.; BADGER, A.M.; GORYCKI, P.D.; LEVANDOSKI, P.A.; BARNETTE, M.A.; GROUS, M.; CHRISTENSEN, S.; TORPHY, T.J. SB 207499 (Ariflo), a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor, reduces tumor necrosis factor alpha and interleukin-4 production in vivo. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. 287:705-711. 1998.

GULUMIAN, M.; BORM, P.J.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V.; DONALDSON, K.; NELSON, G.; MURRAY, J. Mechanistically identified suitable biomarkers of exposure, effect, and susceptibility for silicosis and coal-worker's pneumoconiosis: a comprehensive review. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews**. 9:357-395. 2006.

HAEGENS, A.; VERNOOY, J.H.; HEERINGA, P.; MOSSMAN, B.T.; WOUTERS, E.F. Myeloperoxidase modulates lung epithelial responses to pro-inflammatory agents. **The European respiratory journal**. 31:252-260. 2008.

HAGEN, T.J.; MO, X.; BURGIN, A.B.; FOX, D. 3RD.; ZHANG, Z.; GURNEY, M.E. Discovery of triazines as selective PDE4B versus PDE4D inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. 24:4031-4034. 2014.

HAKANSSON, H.F.; SMILAGIC, A.; BRUNMARK, C.; MILLER-LARSSON, A.; LAL, H. Altered lung function relates to inflammation in an acute LPS mouse model. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**. 25:399-406. 2012.

HAMILTON, R.F.; JR., THAKUR, S.A.; HOLIAN, A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. **Free radical biology & medicine**. 44:1246-1258. 2008.

HAMILTON, R.F.; JR., THAKUR, S.A.; MAYFAIR, J.K.; HOLIAN, A. MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. **The Journal of biological chemistry**. 281:34218-34226. 2006.

HAO, L.; OKADA, H.; KANNO, Y.; INOUE, T.; KOBAYASHI, T.; WATANABE, Y.; STRUTZ, F.; MULLER, G.A.; SUZUKI, H. Direct contact between human peripheral blood mononuclear cells and renal fibroblasts facilitates the expression of monocyte chemoattractant protein-1. **American journal of nephrology**. 23:208-213. 2003.

HATZELMANN, A.; MORCILLO, E.J.; LUNGARELLA, G.; ADNOT, S.; SANJAR, S.; BEUME, R.; SCHUDT, C.; TENOR, H. The preclinical pharmacology of roflumilast--a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**. 23:235-256. 2010.

HNIZDO, E.; MURRAY, J. Risk of pulmonary tuberculosis relative to silicosis and exposure to silica dust in South African gold miners. ***Occupational and environmental medicine***. 55: 496-502. 1998.

HORNUNG, V.; BAUERNFEIND, F.; HALLE, A.; SAMSTAD, E.O.; KONO, H.; ROCK, K.L.; FITZGERALD, K.A.; LATZ, E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. ***Nature immunology***. 9:847-856. 2008.

HOUSLAY, M.D. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. ***Trends in biochemical sciences***. 35: 91-100. 2010.

HOUSLAY, M.D.; BAILLIE, G.S.; MAURICE, D.H. cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. ***Circulation research***. 100:950-966. 2007.

HOUSLAY, M.D.; SCHAFER, P.; ZHANG, K.Y. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. ***Drug discovery today***. 10:1503-1519. 2005.

HOYMANN, H.G. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. ***Journal of pharmacological and toxicological methods***. 55(1):16-26. 2007.

HUAUX, F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. ***Current opinion in allergy and clinical immunology***. 7: 168-173. 2007.

JAGIRDAR, J.; BEGIN, R.; DUFRESNE, A.; GOSWAMI, S.; LEE, T.C.; ROM, W.N. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. ***American journal of respiratory and critical care medicine***. 154:1076-1081. 1996.

JANSSEN, W.J.; HENSON, P.M. Cellular regulation of the inflammatory response. ***Toxicologic pathology***. 40: 166-173. 2012.

JEFFERY, P.K. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. ***American journal of respiratory and critical care medicine***. 164: S28-38. 2001.

JI, W.J.; ZHOU, X.; ZENG, S.; WANG, S.X. Attenuation of silica-induced pulmonary fibroblasts proliferation by taurine and niacin in vitro. ***Experimental lung research***. 35:198-209. 2009.

JIANG, D.; LIANG, J.; FAN, J.; YU, S.; CHEN, S.; LUO, Y.; PRESTWICH, G. D.; MASCARENHAS, M. M.; GARG, H. G.; QUINN, D. A.; HOMER, R. J.; GOLDSTEIN, D. R.; BUCALA, R.; LEE, P. J.; MEDZHITOV, R.; NOBLE, P. W. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. ***Nature medicine***. 11:1173-1179. 2005.

JIN SL, DING SL, LIN SC. Phosphodiesterase 4 and its inhibitors in inflammatory diseases. ***Chang Gung medical journal***. 35:197-210. 2012.

JIN, S.L.; RICHARD, F.J.; KUO, W.P.; D'ERCOLE, A.J.; CONTI, M. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96:11998-12003. 1999.

JINDAL, S.K. Silicosis in India: past and present. **Current opinion in pulmonary medicine.** 19: 163-168. 2013.

JUSKEWITCH, J.E.; PLATT, J.L.; KNUDSEN, B.E.; KNUTSON, K.L.; BRUNN, G.J.; GRANDE, J.P. Disparate roles of marrow- and parenchymal cell-derived TLR4 signaling in murine LPS-induced systemic inflammation. **Scientific reports.** 2:918. 2012.

KABIR, K.; GELINAS, J.P.; CHEN, M.; CHEN, D.; ZHANG, D.; LUO, X.; YANG, J.H.; CARTER, D.; RABINOVICI, R. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. **Shock.** 17:300-303. 2002.

KANES, S.J.; TOKARCZYK, J.; SIEGEL, S.J.; BILKER, W.; ABEL, T.; KELLY, M.P. Rolipram: a specific phosphodiesterase 4 inhibitor with potential antipsychotic activity. **Neuroscience.** 144:239-246. 2007.

KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. **British journal of pharmacology.** 165: 1288-1305. 2012.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of leukocyte biology.** 77: 598-625. 2005.

KLINE, J.N.; COWDEN, J.D.; HUNNINGHAKE, G.W.; SCHUTTE, B.C.; WATT, J.L.; WOHLFORD-LENANE, C.L.; POWERS, L.S.; JONES, M.P.; SCHWARTZ, D.A. Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. **American journal of respiratory and critical care medicine.** 160:297-303. 1999.

KNAPP, S.; FLORQUIN, S.; GOLENBOCK, D.T.; VAN DER POLL, T. Pulmonary lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits the LPS-induced lung inflammation in vivo. **Journal of Immunology.** 176:3189-3195. 2006.

KOBZIK, L. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. **Journal Immunology.** 155: 367-376. 1995.

KODIMUTHALI A, JABARIS SS, PAL M. Recent advances on phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of medicinal chemistry.** 51:5471-5489. 2008.

KOHYAMA, T.; LIU, X.; WEN, F.Q.; ZHU, Y.K.; WANG, H.; KIM, H.J.; TAKIZAWA, H.; CIESLINSKI, L.B.; BARNETTE, M.S.; RENNARD, S.I. PDE4 inhibitors attenuate fibroblast chemotaxis and contraction of native collagen gels. **American journal of respiratory cell and molecular biology.** 26:694-701. 2002.

KUMAR, N.; GOLDMINZ, A.M.; KIM, N.; GOTTLIEB, A.B. Phosphodiesterase 4-targeted treatments for autoimmune diseases. **BMC medicine.** 11:96. 2013.

KUMMERLE, A.E.; SCHMITT, M.; CARDOZO, S.V.; LUGNIER, C.; VILLA, P.; LOPES, A.B.; ROMEIRO, N.C.; JUSTINIANO, H.; MARTINS, M.A.; FRAGA, C.A.; BOURGUIGNON, J.J.; BARREIRO, E.J. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of N-acylhydrazones and novel conformationally constrained compounds as selective and potent orally active phosphodiesterase-4 inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**. 55:7525-7545. 2012.

LACHER, S.E.; JOHNSON, C.; JESSOP, F.; HOLIAN, A.; MIGLIACCIO, C.T. Murine pulmonary inflammation model: a comparative study of anesthesia and instillation methods. **Inhalation toxicology**. 22:77-83. 2010.

LAOHABURANAKIT, P.; CHAN, A. Obstructive sarcoidosis. **Clinical reviews in allergy & immunology**. 25: 115-129. 2003.

LASSANCE, R.M.; PROTA, L.F.; MARON-GUTIERREZ, T.; GARCIA, C.S.; ABREU, S.C.; PASSARO, C.P.; XISTO, D.G.; CASTIGLIONE, R.C.; CARREIRA, H., JR.; ORNELLAS, D.S.; SANTANA, M.C.; SOUZA, S.A.; GUTFILEN, B.; FONSECA, L.M.; ROCCO, P.R.; MORALES, M.M. Intratracheal instillation of bone marrow-derived cell in an experimental model of silicosis. **Respiratory physiology & neurobiology**. 169:227-233. 2009.

LELKES, Z.; ALFOLDI, P.; ERDOS, A.; BENEDEK, G. Rolipram, an antidepressant that increases the availability of cAMP, transiently enhances wakefulness in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**. 60:835-839. 1998.

LEUNG, C.C.; YU, I.T.; CHEN W. Silicosis. **Lancet**. 379:2008-2018. 2012.

LI, N.; HAO, M.; PHALEN, R.F.; HINDS, W.C.; NEL, A.E. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. **Clinical Immunology**. 109:250-265. 2003.

LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current medicinal chemistry**. 12:23-49. 2005.

LIMA, P.C.; LIMA, L.M.; DA SILVA, K.C., LEDA, P.H.; DE MIRANDA, A.L.; FRAGA, C.A.; BARREIRO, E.J. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. **European journal of medicinal chemistry**. 35:187-203. 2000.

LIN, Q.H.; LIU, Y.M.; GUO, J.Y. Epidemiological study of occupational diseases in Guangzhou City, China in 2001 - 2010. **Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases**. 30:759-762. 2012.

LIPWORTH, B.J. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**. 365: 167-175. 2005.

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**. 304:158-166. 2013.

LOPES-PACHECO, M.; XISTO, D.G.; ORNELLAS, F.M.; ANTUNES, M.A.; ABREU, S.C.; ROCCO, P.R.; TAKIYA, C.M.; MORALES, M.M. Repeated administration of bone marrow-derived cells prevents disease progression in experimental silicosis. ***Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology***. 32:1681-1694. 2013.

LOPES, A.J.; COSTA, W.; THOMAZ MAFORT, T.; DE SA FERREIRA, A.; SILVEIRA DE MENEZES, S.L.; SILVA GUIMARAES, F. Silicosis in sandblasters of shipyard versus silicosis in stone carvers in Brazil: a comparison of imaging findings, lung function variables and cardiopulmonary exercise testing parameters. ***Revista portuguesa de pneumologia***. 18:260-266. 2012.

LOPES, A.J.; MOGAMI, R.; CAPONE, D.; TESSAROLLO, B.; DE MELO, P.L.; JANSEN, J.M. High-resolution computed tomography in silicosis: correlation with chest radiography and pulmonary function tests. ***Jornal brasileiro de pneumologia***. 34:264-272. 2008.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. ***Pharmacology & therapeutics***. 109: 366-398. 2006.

MACEDO-NETO, A.V.; SANTOS, L.V.; MENEZES, S.L.; PAIVA, D.S.; ROCCO, P.R.; ZIN, W.A. Respiratory mechanics after prosthetic reconstruction of the chest wall in normal rats. ***Chest***. 113:1667-1672. 1998.

MANOURY, B.; NENAN, S.; GUENON, I.; LAGENTE, V.; BOICHOT, E. Influence of early neutrophil depletion on MMPs/TIMP-1 balance in bleomycin-induced lung fibrosis. ***International immunopharmacology***. 7:900-911. 2007.

MARCHIORI, E.; FERREIRA, A.; SAEZ, F. GABETTO, J.M.; SOUZA, A.S., JR.; ESCUISSATO, D.L.; GASPARETTO, E.L. Conglomerated masses of silicosis in sandblasters: high-resolution CT findings. ***European journal of radiology***. 59:56-59. 2006.

MARIANI, T.J.; ROBY, J.D.; MECHAM, R.P.; PARKS, W.C.; CROUCH, E.; PIERCE, R.A. Localization of type I procollagen gene expression in silica-induced granulomatous lung disease and implication of transforming growth factor-beta as a mediator of fibrosis. ***The American journal of pathology***. 148:151-164. 1996.

MARON-GUTIERREZ, T.; CASTIGLIONE, R.C.; XISTO, D.G.; OLIVEIRA, M.G.; CRUZ, F.F.; PECANHA, R.; CARREIRA-JUNIOR, H.; ORNELLAS, D.S.; MORAES, M.O.; TAKIYA, C.M.; ROCCO, P.R.; MORALES, M.M. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy attenuates silica-induced lung fibrosis. ***The European respiratory journal***. 37:1217-1225. 2011.

MATTHAY, M.A.; WARE, L.B.; ZIMMERMAN, G.A. The acute respiratory distress syndrome. ***The Journal of clinical investigation***. 122:2731-2740. 2012.

MATTHAY, M.A.; ZIMMERMAN, G.A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational

management. **American journal of respiratory cell and molecular biology**. 33: 319-327. 2005.

MAURICE, D.H.; KE, H.; AHMAD, F.; WANG, Y.; CHUNG, J.; MANGANIELLO, V.C. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nature reviews. Drug discovery**. 13:290-314. 2014.

MAXWELL, C.R.; KANES, S.J.; ABEL, T.; SIEGEL, S.J. Phosphodiesterase inhibitors: a novel mechanism for receptor-independent antipsychotic medications. **Neuroscience**. 129:101-107. 2004.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY C., Jr. Innate immunity. **The New England journal of medicine**. 343: 338-344. 2000.

MEHATS, C.; JIN, S.L.; WAHLSTROM, J.; LAW, E.; UMETSU, D.T.; CONTI, M. PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. 17:1831-1841. 2003.

MENDES, R. Epidemiologic study of pulmonary silicosis in the southeast region of Brazil, based on a survey of patients hospitalized in tuberculosis hospitals. **Revista de saude publica**. 13:7-19. 1979.

MESQUITA JÚNIOR, J.A.; LOPES, A.J.; JANSEN, J.M.; MELO, P.L. Avaliação das características resistivas do sistema respiratório de indivíduos portadores de silicose pela técnica de oscilações forçadas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 32: 213-220. 2006.

MICHALSKI, J.M.; GOLDEN, G.; IKARI, J.; RENNARD, S. PDE4: a novel target in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. **Clinical pharmacology and therapeutics**. 91:134-142. 2012.

MICHEL, O.; NAGY, A.M.; SCHROEVEN, M.; DUCHATEAU, J.; NEVE, J.; FONDU, P.; SERGYSELS, R. Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects. **American journal of respiratory and critical care medicine**. 156:1157-1164. 1997.

MIOTLA, J.M.; TEIXEIRA, M.M.; HELLEWELL, P.G. Suppression of acute lung injury in mice by an inhibitor of phosphodiesterase type 4. **American journal of respiratory cell and molecular biology**. 18:411-420. 1998.

MIYATA, R.; VAN EEDEN, S.F. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. **Toxicology and applied pharmacology**. 257: 209-226. 2011.

MOLDOVEANU, B.; OTMISHI, P.; JANI, P.; WALKER, J.; SARMIENTO, X.; GUARDIOLA, J.; SAAD, M.; YU, J. Inflammatory mechanisms in the lung. **Journal of inflammation research**. 2:1-11. 2009.

MONCAO-RIBEIRO, L.C.; CAGIDO, V.R.; LIMA-MURAD, G.; SANTANA, P.T.; RIVA, D.R.; BOROJEVIC, R.; ZIN, W.A.; CAVALCANTE, M.C.; RICA, I.; BRANDO-LIMA, A.C.; TAKIYA, C.M.; FAFTE, D.S.; COUTINHO-SILVA, R. Lipopolysaccharide-induced lung injury: role of P2X7 receptor. **Respiratory physiology & neurobiology**. 179:314-325. 2011.

MONTANA, J.G.; BUCKLEY, G.M.; COOPER, N.; DYKE, H.J.; GOWERS, L.; GREGORY, J.P.; HELLEWELL, P.G.; KENDALL, H.J.; LOWE, C.; MAXEY, R.; MIOTLA, J.; NAYLOR, R.J.; RUNCIE, K.A.; TULADHAR, B.; WARNECK, J.B. Aryl sulfonamides as selective PDE4 inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. 8:2635-2640. 1998.

MONTES, II.; REGO, G.; CAMBLOR, C.; QUERO, A.; GONZALEZ, A.; RODRIGUEZ, C. Respiratory disease in aggregate quarry workers related to risk factors and Pi phenotype. **Journal of occupational and environmental medicine/American College of Occupational and Environmental Medicine**. 46:1150-1157. 2004.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. The use of picosirius'polarizaion method for study of the biopathology of collagen. Memorial Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 86:1-11. 1991.

MORAES, T.J.; ZURAWSKA, J.H.; DOWNEY, G.P. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. **Current opinion in hematology**. 13:21-27. 2006.

MOSIEWICZ, J.; MYSLINSKI, W.; ZLOMANIEC, G.; CZABAK-GARBACZ, R.; KRUPSKI, W.; DZIDA, G. Diagnostic value of high resolution computed tomography in the assessment of nodular changes in pneumoconiosis in foundry workers in Lublin. **Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM**. 11:279-284. 2004.

MOSS, M.; BURNHAM, E.L. Chronic alcohol abuse, acute respiratory distress syndrome, and multiple organ dysfunction. **Critical care medicine**. 31: S207-212. 2003.

MOVSESIAN, M.; WEVER-PINZON, O.; VANDEPUT, F. PDE3 inhibition in dilated cardiomyopathy. **Current opinion in pharmacology**. 11:707-713. 2011.

NASH, T.; ALLISON, A.C.; HARINGTON, J.S. Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity. **Nature**. 210:259-261. 1966.

NAVIKAS, V.; MATUSEVICIUS, D.; SODERSTROM, M.; PIRSKANEN, R.; FREDRIKSON, S.; LINK, H. The phosphodiesterase i.v. inhibitor rolipram in vitro reduces the numbers of MBP-reactive IFN-gamma and TNF-alpha mRNA expressing blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. **Clinical neuropharmacology**. 21:236-244. 1998.

NGKELO, A.; ADCOCK, I.M. New treatments for COPD. **Current opinion in pharmacology**. 13: 362-369. 2013.

NOULIN, N.; QUESNIAUX, V.F.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; SCHNYDER, B.; MAILLET, I.; ROBERT, T.; VARGAFTIG, B.B.; RYFFEL, B.; COUILLIN, I. Both hemopoietic and resident cells are required for MyD88-dependent pulmonary inflammatory response to inhaled endotoxin. **Journal of Immunology**. 175:6861-6869. 2005.

NUNES, I.K.C. Novos Inibidores de Fosfodiesterase 4 análogos de LASSBio-448 - Desenho, síntese e análise comparativa de suas propriedades físico-químicas e cinéticas. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2013.

ORTIZ, L.A.; LASKY, J.; GOZAL, E.; RUIZ, V.; LUNGARELLA, G.; CAVARRA, E.; BRODY, A.R.; FRIEDMAN, M.; PARDO, A.; SELMAN, M. Tumor necrosis factor receptor deficiency alters matrix metalloproteinase 13/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in murine silicosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**. 163:244-252. 2001.

PACE, E.; FERRARO, M.; UASUF, C.G.; GIARRATANO, A.; LA GRUTTA, S.; LIOTTA, G.; JOHNSON, M.; GJOMARKAJ, M. Cilomilast counteracts the effects of cigarette smoke in airway epithelial cells. **Cellular immunology**. 268:47-53. 2011.

PAGE, C.P.; SPINA, D. Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. **Handbook of experimental pharmacology**. 204: 391-414. 2011.

PAGE, C.P.; SPINA, D. Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. **Current opinion in pharmacology**. 12: 275-286. 2012.

PAINTLIA, A.S.; PAINTLIA, M.K.; SINGH, I.; SKOFF, R.B.; SINGH, A.K.. Combination therapy of lovastatin and rolipram provides neuroprotection and promotes neurorepair in inflammatory demyelination model of multiple sclerosis. **Glia**. 57:182-193. 2009.

PANDEY, J.K.; AGARWAL, D. Biomarkers: A potential prognostic tool for silicosis. **Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine**.16: 101-107. 2012.

PARKER, J.C.; GILLESPIE, M.N.; TAYLOR, A.E.; MARTIN, S.L. Capillary filtration coefficient, vascular resistance, and compliance in isolated mouse lungs. **Journal of Applied Physiology (1985)**. 87:1421-1427. 1999.

PERETZ, A.; CHECKOWAY, H.; KAUFMAN, J.D.; TRAJBER, I.; LERMAN, Y. Silica, silicosis, and lung cancer. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**. 8:114-118. 2006.

PEREZ-RAMOS, J.; DE LOURDES SEGURA-VALDEZ, M.; VANDA, B.; SELMAN, M.; PARDO, A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**. 160:1274-1282. 1999.

PERI, F.; PIAZZA, M.; CALABRESE, V.; DAMORE, G.; CIGHETTI, R. Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. **Biochemical Society transactions**. 38:1390-1395. 2010.

PETAK, F.; HABRE, W.; HANTOS, Z.; SLY, P.D.; MOREL, D.R. Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs. **Journal of Applied Physiology (1985)**. 92:169-178. 2002.

PETRILLI, V.; DOSTERT, C.; MURUVE, D.A.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. **Current opinion in immunology**. 19:615-622. 2007.

PHAN, S.H. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. **Proceedings of the American Thoracic Society**. 5: 334-337. 2008.

PIGUET, P.F.; COLLART, M.A.; GRAU, G.E.; SAPPINO, A.P.; VASSALLI, P. Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. **Nature**. 344:245-247. 1990.

PRICE, D.; CHISHOLM, A.; RYAN, D.; CROCKETT, A.; JONES, R. The use of roflumilast in COPD: a primary care perspective. **Primary care respiratory journal : journal of the General Practice Airways Group**. 19:342-351. 2010.

PROUDFOOT, A.G.; MCAULEY, D.F.; GRIFFITHS, M.J.; HIND, M. Human models of acute lung injury. **Disease models & mechanisms**. 4:145-153. 2011.

RABE, K.F. Update on roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. **British journal of pharmacology**. 163: 53-67. 2011.

RENNARD, S.; KNOBIL, K.; RABE, K.F.; MORRIS, A.; SCHACHTER, N.; LOCANTORE, N.; CANONICA, W.G.; ZHU, Y.; BARNHART, F. The efficacy and safety of cilomilast in COPD. **Drugs**. 2:3-57. 2008.

RICHTER, W.; CONTI, M. Dimerization of the type 4 cAMP-specific phosphodiesterases is mediated by the upstream conserved regions (UCRs). **The Journal of biological chemistry**. 277: 40212-40221. 2002.

RICHTER, W.; CONTI, M. The oligomerization state determines regulatory properties and inhibitor sensitivity of type 4 cAMP-specific phosphodiesterases." **The Journal of biological chemistry**. 279: 30338-30348. 2004.

RICHTER, W.; UNCIULEAC, L.; HERMSDORF, T.; KRONBACH, T.; DETTMER, D. Identification of inhibitor binding sites of the cAMP-specific phosphodiesterase 4. **Cellular signalling**. 13:287-297. 2001.

RIMAL, B.; GREENBERG, A.K.; ROM, W.N. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. **Current opinion in pulmonary medicine**. 11:169-173. 2005.

ROBBINS, S. *Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro (RJ), Elsevier Editora. 2005.

ROBICHAUD, A.; SAVOIE, C.; STAMATIOU, P.B.; LACHANCE, N.; JOLICOEUR, P.; RASORI, R.; CHAN, C.C. Assessing the emetic potential of PDE4 inhibitors in rats. **British journal of pharmacology**. 135:113-118. 2002a.

ROBICHAUD, A.; SAVOIE, C.; STAMATIOU, P.B.; TATTERSALL, F.D.; CHAN, C.C. PDE4 inhibitors induce emesis in ferrets via a noradrenergic pathway. **Neuropharmacology**. 40:262-269. 2001.

ROBICHAUD, A.; STAMATIOU, P.B.; JIN, S.L.; LACHANCE, N.; MACDONALD, D.; LALIBERTE, F.; LIU, S.; HUANG, Z.; CONTI, M.; CHAN, C.C. Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens alpha(2)-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioral correlate of emesis. **The Journal of clinical investigation**. 110:1045-1052. 2002b.

ROJAS, M.; WOODS, C.R.; MORA, A.L.; XU, J.; BRIGHAM, K.L. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**. 288:L333-341. 2005.

ROSE, G.M.; HOPPER, A.; DE VIVO, M.; TEHIM, A. Phosphodiesterase inhibitors for cognitive enhancement. **Current pharmaceutical design**. 11:3329-3334. 2005.

RUBENFELD, G.D. Epidemiology of acute lung injury. **Critical care medicine**. 31: S276-284. 2003.

RUSHTON, L. Chronic obstructive pulmonary disease and occupational exposure to silica. **Reviews on environmental health**. 22: 255-272. 2007.

RYDELL-TORMANEN, K.; ULLER, L.; ERJEFALT, J.S. Neutrophil cannibalism--a back up when the macrophage clearance system is insufficient. **Respiratory research**. 7:143. 2006.

SAKAE, R.S.; LEME, A.S.; DOLHNIKOFF, M.; PEREIRA, P.M.; DO PATROCINIO, M.; WARTH, T.N.; ZIN, W.A.; SALDIVA, P.H.; MARTINS, M.A. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. **The American journal of physiology**. 266:L23-29. 1994.

SANTOS, C.; NORTE, A.; FRADINHO, F.; CATARINO, A.; FERREIRA, A.J.; LOUREIRO, M.; BAGANHA, M.F. Silicosis - brief review and experience of a pulmonology ward. **Revista portuguesa de pneumologia**. 16:99-115. 2010.

SANZ, M.J.; CORTIJO, J.; TAHA, M.A.; CERDA-NICOLAS, M.; SCHATTON, E.; BURGBACHER, B.; KLAR, J.; TENOR, H.; SCHUDT, C.; ISSEKUTZ, A.C.; HATZELMANN, A.; MORCILLO, E.J. Roflumilast inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, expression of adhesion molecules and microvascular permeability. **British journal of pharmacology**. 152:481-492. 2007.

SCABILLONI, J.F.; WANG, L.; ANTONINI, J.M.; ROBERTS, J.R.; CASTRANOVA, V.; MERCER, R.R. Matrix metalloproteinase induction in fibrosis and fibrotic nodule formation due to silica inhalation. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**. 288:L709-717. 2005.

SCHAAL, S.M.; GARG, M.S.; GHOSH, M.; LOVERA, L.; LOPEZ, M.; PATEL, M.; LOURO, J.; PATEL, S.; TUESTA, L.; CHAN, W.M.; PEARSE, D.D. The therapeutic profile of rolipram, PDE target and mechanism of action as a neuroprotectant following spinal cord injury. **PLoS one**. 7:e43634. 2012.

SCHUDT, C.; HATZELMANN, A.; BEUME, R.; TENOR, H. Phosphodiesterase inhibitors: history of pharmacology. **Handbook of experimental pharmacology**. 204:1-46. 2011.

SEATON, A. Occupational lung disease: an international perspective. **Occupational and environmental medicine**. 57: 844B. 2000.

SINGER, J.P.; CHEN, H.; PHELAN, T.; KUKREJA, J.; GOLDEN, J.A.; BLANC P.D. Survival following lung transplantation for silicosis and other occupational lung diseases. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**. 62:134-137. 2012.

SIUCIAK, J.A. The role of phosphodiesterases in schizophrenia : therapeutic implications. **CNS Drugs**. 22: 983-993. 2008.

SOMMER, N.; LOSCHMANN, P.A.; NORTHOFF, G.H.; WELLER, M.; STEINBRECHER, A.; STEINBACH, J.P.; LICHTENFELS, R.; MEYERMANN, R.; RIETHMULLER, A.; FONTANA, A. The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis. **Nature medicine**. 1:244-248. 1995.

SONG, L.; WENG, D.; DAI, W.; TANG, W.; CHEN, S.; LI, C.; CHEN, Y.; LIU, F.; CHEN, J. Th17 can regulate silica-induced lung inflammation through an IL-1beta-dependent mechanism. **Journal of cellular and molecular medicine**. 2014.

SONG, L.; WENG, D.; LIU, F.; CHEN, Y.; LI, C.; DONG, L.; TANG, W.; CHEN, J. Tregs promote the differentiation of Th17 cells in silica-induced lung fibrosis in mice. **PLoS one**. 7:e37286. 2012.

SONG, S.D.; TANG, H.F. Progress in PDE4 targeted therapy for inflammatory diseases. **Journal of Zhejiang University. Medical sciences**. 43: 353-358. 2014.

SOUNESS, J.E.; RAO, S. Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic AMP phosphodiesterases. **Cellular signalling**. 9: 227-236. 1997.

SPINA, D. PDE4 inhibitors: current status. **British journal of pharmacology**. 155: 308-315. 2008.

SPOND, J.; BILLAH, M.M.; CHAPMAN, R.W.; EGAN, R.W.; HEY, J.A.; HOUSE, A.; KREUTNER, W. MINNICOZZI, M. The role of neutrophils in LPS-induced changes in

pulmonary function in conscious rats. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**. 17:133-140. 2004.

SPOND, J.; CHAPMAN, R.; FINE, J.; JONES, H.; KREUTNER, W.; KUNG, T.T.; MINNICOZZI, M. Comparison of PDE 4 inhibitors, rolipram and SB 207499 (ariflo), in a rat model of pulmonary neutrophilia. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**. 14:157-164. 2001.

STEENLAND, K.; WARD, E. Silica: a lung carcinogen. **CA: a cancer journal for clinicians**. 64: 63-69. 2014.

STRUPP, M. Epstein-Barr virus, 9.4 T MRI and phosphodiesterase inhibitors in multiple sclerosis. **Journal of neurology**. 257: 860-862. 2010.

SUN, J.; WENG, D.; JIN, C.; YAN, B.; XU, G.; JIN, B.; XIA, S.; CHEN, J. The value of high resolution computed tomography in the diagnostics of small opacities and complications of silicosis in mine machinery manufacturing workers, compared to radiography. **Journal of occupational health**. 50:400-405. 2008.

SUN, Y.; YANG, F.; YAN, J.; LI, Q.; WEI, Z.; FENG, H.; WANG, R.; ZHANG, L.; ZHANG, X. New anti-fibrotic mechanisms of n-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in silicon dioxide-induced silicosis. **Life sciences**. 87:232-239. 2010.

SUTHERLAND, E.W.; RALL, T.W.; MENON, T. Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation, and properties. **The Journal of biological chemistry**. 237:1220-1227. 1962.

TAKATO, H.; YASUI, M.; ICHIKAWA, Y.; WASEDA, Y.; INUZUKA, K.; NISHIZAWA, Y.; TAGAMI, A.; FUJIMURA, M.; NAKAO, S. The specific chymase inhibitor TY-51469 suppresses the accumulation of neutrophils in the lung and reduces silica-induced pulmonary fibrosis in mice. **Experimental lung research**. 37:101-108. 2011.

TANG, H.F.; LU, J.J.; TANG, J.F.; ZHENG, X.; LIANG, Y.Q.; WANG, X.F.; WANG, Y.J.; MAO, L.G. CHEN, J. Q. Action of a Novel PDE4 inhibitor ZL-n-91 on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **International immunopharmacology**. 10:406-411. 2010.

TATLICIOGLU, T. Selective phosphodiesterase-4 (PDE-4) inhibitors in COPD. **Tuberkuloz ve toraks**. 56: 472-484. 2008.

TENOR, H.; HATZELMANN, A.; BEUME, R.; LAHU, G.; ZECH, K.; BETHKE, T.D. Pharmacology, clinical efficacy, and tolerability of phosphodiesterase-4 inhibitors: impact of human pharmacokinetics. **Handbook of experimental pharmacology**. 204:85-119. 2011.

TERRA FILHO, M.; SANTOS UDE, P. Silicosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 32: S41-47.

TEWATERNAUDE, J.M.; EHRlich, R.I.; CHURCHYARD, G.J.; PEMBA, L.; DEKKER, K.; VERMEIS, M.; WHITE, N.W.; THOMPSON, M.L.; MYERS, J.E.

Tuberculosis and silica exposure in South African gold miners. **Occupational and environmental medicine**. 63:187-192. 2006.

TILLEY, D.G.; MAURICE, D.H. Vascular smooth muscle cell phenotype-dependent phosphodiesterase 4D short form expression: role of differential histone acetylation on cAMP-regulated function. **Molecular pharmacology**. 68: 596-605. 2005.

TOGBE, D.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; SCHNYDER, B.; COUILLIN, I.; MAILLET, I.; BIHL, F.; MALO, D.; RYFFEL, B.; QUESNIAUX, V.F. TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation. **Journal of leukocyte biology**. 80:451-457. 2006.

TOGBE, D.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; SCHNYDER, B.; DOZ, E.; NOULIN, N.; JANOT, L.; SECHER, T.; GASSE, P.; LIMA, C.; COELHO, F.R.; VASSEUR, V.; ERARD, F.; RYFFEL, B.; COUILLIN, I. MOSER, R. Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. **International journal of experimental pathology**. 88:387-391. 2007.

TORPHY, T.J. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. **American journal of respiratory and critical care medicine**. 157: 351-370. 1998.

TORPHY, T.J.; UNDEM, B.J. Phosphodiesterase inhibitors: new opportunities for the treatment of asthma. **Thorax**. 46: 512-523. 1991.

TSUSHIMA, K.; KING, L.S.; AGGARWAL, N.R.; DE GORORDO, A.; D'ALESSIO, F.R.; KUBO, K. Acute lung injury review. **Annals of Internal Medicine**. 48:621-630. 2009.

TUIN, A.; HUIZINGA-VAN, DER VLAG A.; VAN LOENEN-WEEMAES, A.M.; MEIJER, D.K.; POELSTRA, K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**. 290:G377-385. 2006.

TURNER, C.R.; ESSER, K.M.; WHEELDON, E.B.; Therapeutic intervention in a rat model of ARDS: IV. Phosphodiesterase IV inhibition. **Circulatory shock**. 39:237-245. 1993.

UDDIN, M.; LEVY, B.D. Resolvins: natural agonists for resolution of pulmonary inflammation. **Progress in lipid research**. 50: 75-88. 2011.

VALENCA, S.S.; SILVA BEZERRA, F.; LOPES, A.A.; ROMANA-SOUZA, B.; MARINHO CAVALCANTE, M.C.; LIMA, A.B.; GONCALVES KOATZ, V.L.; PORTO, L.C. Oxidative stress in mouse plasma and lungs induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide. **Environmental research**. 108:199-204. 2008.

VANHEE, D.; GOSSET, P.; BOITELLE, A.; WALLAERT, B.; TONNEL, A.B. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. **The European respiratory journal**. 8:834-842. 1995.

VARGAFTIG, B.B. Biology of airway inflammation: from immunology to altered responsiveness. **Research in immunology**. 148: 7-8. 1997a.

VARGAFTIG, B.B. Modifications of experimental bronchopulmonary hyperresponsiveness. **American journal of respiratory and critical care medicine**. 156: S97-102. 1997b.

VERNOOY, J.H.; DENTENER, M.A.; VAN SUYLEN, R.J.; BUURMAN, W.A.; WOUTERS, E.F. Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology. **American journal of respiratory cell and molecular biology**. 26:152-159. 2002.

VIJAYAN, V.K. Chronic obstructive pulmonary disease. **The Indian journal of medical research**. 137: 251-269. 2013.

WACHTEL, H. Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors." **Neuropharmacology**. 22: 267-272. 1983.

WANG, D.; ZHANG, M. Statistics on notification of pneumoconiosis in China in 2010. **Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases**. 30: 801-810. 2012.

WANG, H.; PENG, M.S.; CHEN, Y.; GENG, J.; ROBINSON, H.; HOUSLAY, M.D.; CAI, J.; KE, H. Structures of the four subfamilies of phosphodiesterase-4 provide insight into the selectivity of their inhibitors. **The Biochemical journal**. 408:193-201. 2007.

WANG, X.; CHEN, Y.; LV, L.; CHEN, J. Silencing CD36 gene expression results in the inhibition of latent-TGF-beta1 activation and suppression of silica-induced lung fibrosis in the rat. **Respiratory research**. 10:36. 2009.

WANG, X.; LV, L.; CHEN, Y.; CHEN, J. A CD36 synthetic peptide inhibits silica-induced lung fibrosis in the mice. **Toxicology and industrial health**. 26:47-53. 2010.

WARE, L.B.; MATTHAY, M.A.. The acute respiratory distress syndrome. **The New England journal of medicine**. 342: 1334-1349. 2000.

WEST, M.A.; BENNET, T.; SEATTER, S.C.; CLAIR, L.; BELLINGHAM, J. LPS pretreatment reprograms macrophage LPS-stimulated TNF and IL-1 release without protein tyrosine kinase activation. **Journal of leukocyte biology**. 61:88-95. 1997.

WHITAKER, C.M.; BEAUMONT, E.; WELLS, M.J.; MAGNUSON, D.S.; HETMAN M.; ONIFER, S.M. Rolipram attenuates acute oligodendrocyte death in the adult rat ventrolateral funiculus following contusive cervical spinal cord injury. **Neuroscience letters**. 438:200-204. 2008.

WHITAKER, C.M.; COOPER, N.G. The novel distribution of phosphodiesterase-4 subtypes within the rat retina. **Neuroscience**. 163:1277-1291. 2009.

WIESSNER, J.H.; HENDERSON, J.D. Jr.; SOHNLE, P.G, MANDEL, N.S.; MANDEL, G.S. The effect of crystal structure on mouse lung inflammation and fibrosis. **The American review of respiratory disease**. 138: 445-450. 1988.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**. 80:617-653. 2000.

XU, R.X.; HASSELL, A.M.; VANDERWALL, D.; LAMBERT, M.H.; HOLMES, W.D.; LUTHER, M.A.; ROCQUE, W.J.; MILBURN, M.V.; ZHAO, Y.; KE, H.; NOLTE, R.T. Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism and specificity. **Science**. 288:1822-1825. 2000.

Yamada, W.; Tasaka, S.; Koh, H.; Shimizu, M.; Ogawa, Y.; Hasegawa, N.; Miyasho, T.; Yamaguchi, K.; Ishizaka, A. Role of toll-like receptor 4 in acute neutrophilic lung inflammation induced by intratracheal bacterial products in mice. **Journal of inflammation research**. 1:1-10. 2008.

YAN, J.H.; GU, W.J.; PAN, L. Efficacy and safety of roflumilast in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**. 27:83-89. 2014.

YANG, M.; KUMAR, R.K.; HANSBRO, P.M.; FOSTER, P.S. Emerging roles of pulmonary macrophages in driving the development of severe asthma. **Journal of leukocyte biology**. 91: 557-569. 2012.

YEH, C.H.; YANG, J.J.; YANG, M.L.; LI, Y.C.; KUAN, Y.H. Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK-NF-kappaB pathway. **Free radical biology & medicine**. 69:249-257. 2014.

YU, T.; FAIN, K.; BOYD, C.M.; SINGH, S.; WEISS, C.O.; Li, T.; VARADHAN, R.; PUHAN, M.A. Benefits and harms of roflumilast in moderate to severe COPD. **Thorax**. 69: 616-622. 2014.

ZAIDI, S.H.; KING, E.J.; HARRISON, C.V.; NAGELSCHMIDT, G. Fibrogenic activity of different forms of free silica; the action of fused silica, quartz, cristobalite, and tridymite on the livers of mice. **A.M.A. archives of industrial health**. 13:112-121. 1956.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. 3th edition. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey.1996.

ZHANG, H.T. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase-4 as a target for the development of antidepressant drugs. **Current pharmaceutical design**. 15:1688-1698. 2009.

ZHANG, T.; ZHOU, X. Clinical application of expectorant therapy in chronic inflammatory airway diseases (Review). **Experimental and therapeutic medicine**. 7:763-767. 2014,

ZHANG, X.; SONG, K.; XIONG, H.; LI, H.; CHU, X.; DENG, X. Protective effect of florfenicol on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. **International immunopharmacology**. 9:1525-1529. 2009.

ZUSSMAN, B.D.; BENINCOSA, L.J.; WEBBER, D.M.; CLARK, D.J.; COWLEY, H.; KELLY, J.; MURDOCH, R.D.; UPWARD, J.; WYLD, P.; PORT, A.; FUDER, H. An overview of the pharmacokinetics of cilomilast (Ariflo), a new, orally active phosphodiesterase 4 inhibitor, in healthy young and elderly volunteers. **Journal of clinical pharmacology**. 41: 950-958. 2001.