



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/PPGCB

SANDRA CABRAL DA SILVA

EFEITOS DE DERIVADOS ACILHIDRAZÔNICOS NA INFLAMAÇÃO
PULMONAR EXPERIMENTAL POR SENSIBILIZAÇÃO QUÍMICA

Recife

2019

SANDRA CABRAL DA SILVA

EFEITOS DE DERIVADOS ACILHIDRAZÔNICOS NA INFLAMAÇÃO
PULMONAR EXPERIMENTAL POR SENSIBILIZAÇÃO QUÍMICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Química para a Saúde,

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Silva, Sandra Cabral da

Efeitos de derivados acilhidrazônicos na inflamação pulmonar experimental por sensibilização química / Sandra Cabral da Silva - 2019.

93 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva
Coorientador: Ricardo Olímpio de Moura

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2019.
Inclui referências

1. Atividade expectorante 2. Asma 3. Mastócitos I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Moura, Ricardo Olímpio de (coorient.) III. Título

615.72

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-205

SANDRA CABRAL DA SILVA

EFEITOS DE DERIVADOS ACILHIDRAZÔNICOS NA INFLAMAÇÃO E
REMODELAMENTO DAS VIAS AÉREAS EM CAMUNDONGOS POR
SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 20/05/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. René Duarte Martins
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Alice Valença Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura
Universidade Estadual da Paraíba

Ao meu filho Theo Cabral, presente divino...

A mais pura forma de amor!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo fim de mais essa etapa, por abençoar minhas escolhas permitindo assim que eu viva meus sonhos. Sinto-me honrada e feliz!

À minha mãe, Josefa Cabral, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Com um coração sempre generoso, me ensinou a ser forte, a agradecer à vida por tudo aquilo que ela coloca em meu caminho e seguir em frente sem deixar que nenhum obstáculo o bloqueie. Obrigada mãe, por tudo que você foi e é para mim. Eu te amo muito!

À minha orientadora, Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva. Deleitoso o modo como me apoiou na vida acadêmica: uma orientação criteriosa, estimulando e doando seu tempo para minha construção pessoal e profissional. Minha mãe científica que abriu os meus olhos para ver o mundo também com generosidade e humildade, e com o seu empenho, me ensinou a buscar a sabedoria.

Ao meu filho, Theo Cabral, que apesar de tão pequenino é minha maior inspiração. Que um dia os papéis de invertam e eu reviva esta felicidade em suas conquistas, meu amado filho!

Ao meu pai, irmão e familiares, por acreditarem sempre em meu potencial.

Aos amigos e compadres Natalia Lima Alevatto e Anderson Alevatto por fazerem parte da minha história. Pelo carinho e incentivo de sempre.

Ao Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura do Departamento de Farmácia, da Universidade Estadual da Paraíba, por fornecer as moléculas de estudo deste trabalho e sempre ser solícito.

A todos que fazem parte do Laboratório de Prospecção Farmatológica de Produtos Bioativos, por toda prestatividade, dividindo comigo momentos de aflição e descontração e contribuindo para consolidação deste trabalho.

A aluna de iniciação científica, Julyanne Correia. Sua atenção e dedicação ao trabalho foram essenciais à concretização do mesmo.

Aos meus *amigos* de turma de Doutorado: Jaciana Aguiar, Isla Bastos, Marllon Alex, Jessica Barbosa, Aline Stamford, Tatiane Bezerra e Fernanda Mota, por terem tornado o dia a dia na pós-graduação tão prazeroso! Foi extremamente enriquecedor conhecer e conviver com cada um de vocês. E, de maneira especial, à Fernanda pelo companheirismo, força, apoio e amizade desde o ingresso no laboratório até hoje.

A todos que fazem parte do Departamento de Antibióticos / UFPE, por ceder o espaço e materiais para minha pesquisa.

A todos os colaboradores que fazem parte do Departamento de Patologia / UFPE e Departamento de Química Biológica / URCA - em especial aos professores Mário Melo, Saulo Tintino e Irwin Menezes – pela contribuição experimental e intelectual.

Aos amigos do Instituto de Criminalística de Pernambuco, em especial aos que fazem parte da sede em Caruaru, pela ajuda, apoio e dificuldades compartilhadas, incentivando-me a prosseguir.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas pelo convívio e disponibilidade em atender minhas solicitações.

Aos meus colegas do PPGCB, pelo convívio agradável, por compartilhar conhecimentos e por fazerem parte da minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo e apoio financeiro.

Imensamente grata!

*"Essa parte da minha vida... essa... pequena parte...
Chama-se... Felicidade!"
Chris Gardner, 2006*

RESUMO

Doenças pulmonares crônicas são caracterizadas por inflamação das vias aéreas e remodelamento do parênquima pulmonar que desencadeiam considerável transtorno da função respiratória. Neste estudo foram avaliados dois compostos de uma nova série pertencentes à classe das *N*-acilidrazonas, com base em modelos experimentais de inflamação e remodelamento pulmonar, visando-se identificar potenciais novos agentes terapêuticos para doenças inflamatórias pulmonares. Os compostos foram analisados na toxicidade aguda, como também foram quantificados leucócitos infiltrados no tecido pulmonar, fibrose e a produção de muco nas vias aéreas de camundongos BALB/c. Esses derivados não se mostraram nocivos na avaliação de toxicidade aguda na dose de 2000 mg / kg. O tratamento com derivados AMH e AMZ-Bz (10 mg / kg, oral), inibiu acentuadamente o infiltrado leucocitário em relação ao grupo controle, de forma comparável ao observado para dexametasona no modelo experimental de inflamação alérgica. Observou-se que os derivados AMH e AMZ-Bz foram também ativos no bloqueio terapêutico da resposta asmática alérgica desencadeada por ovoalbumina (OVA). Neste modelo, os compostos foram capazes de reverter as alterações patológicas avaliadas, incluindo o infiltrado leucocitário, as alterações histopatológicas e a migração de mastócitos, semelhante ao tratamento com os fármacos de referência dexametasona e montelucaste. O perfil de ação dos compostos AMH e AMZ-Bz foi também confirmado na reversão das respostas de remodelamento das vias aéreas no modelo de fibrose induzida por bleomicina em comparação ao grupo controle, em condições onde os compostos de referência mostraram eficácia correlata. Além disso, constatou-se que os derivados *N*-acilhidrazônicos AMH e AMZ-Bz apresentaram atividade expectorante aumentando a secreção do muco. Em conjunto, os resultados apontam os derivados AMH e AMZ-Bz como promissores, pelo amplo perfil de ação sobre alterações patológicas cruciais associadas à inflamação das vias aéreas, bem como pelo menor impacto sobre efeitos tóxicos. Os compostos analisados são certamente protótipos moleculares de forte potencial terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias pulmonares crônicas.

Palavras-chave: Atividade expectorante. Asma. Mastócitos. Alterações histopatológicas.

ABSTRACT

Chronic lung diseases are characterized by inflammation of the airways and remodeling of the lung parenchyma that trigger considerable disorder of respiratory function. In this study, two new series compounds belonging to the class of *N*-acylhydrazones were evaluated, based on experimental models of inflammation and pulmonary remodeling, aiming to identify potential new therapeutic agents for pulmonary inflammatory diseases. The compounds were analyzed for acute toxicity, as were leukocytes infiltrated into lung tissue, fibrosis and airway mucus production of BALB/c mice. These derivatives were not harmful in the acute toxicity assessment at the dose of 2000 mg / kg. Treatment with AMH and AMZ-Bz derivatives (10 mg / kg, oral) markedly inhibited the leukocyte infiltrate in relation to the control group, comparable to that observed for dexamethasone in the experimental model of allergic inflammation. AMH and AMZ-Bz derivatives were also found to be active in the therapeutic blockade of ovalbumin-triggered allergic asthma response (OVA). In this model, the compounds were able to reverse the pathological changes evaluated, including leukocyte infiltrate, histopathological changes and mast cell migration, similar to treatment with the reference drugs dexamethasone and montelukast. The action profile of AMH and AMZ-Bz compounds was also confirmed in the reversal of airway remodeling responses in the bleomycin-induced fibrosis model compared to the control group under conditions where reference compounds showed correlative efficacy. Furthermore, it was found that the *N*-acylhydrazone derivatives AMH and AMZ-Bz showed expectorant activity by increasing mucus secretion. Together, the results point to AMH and AMZ-Bz derivatives as promising, by the broad action profile on crucial pathological alterations associated with airway inflammation, as well as by the lower impact on toxic effects. The compounds analyzed are certainly molecular prototypes of strong therapeutic potential in the treatment of chronic pulmonary inflammatory diseases.

Keywords: Expectorant activity. Asthma. Mast cells. Histopathological changes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas químicas dos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos AMH e AMZ-BZ	21
Figura 2 - Delineamento experimental do modelo de pleurisia alérgica induzida por OVA e tratamento farmacológico com derivados acilhidrazônicos AMH e AMZ-Bz.	23
Figura 3 - Delineamento experimental do modelo de asma brônquica induzida por OVA e tratamento farmacológico de derivados AMH e AMZ- Bz.....	24
Figura 4 – Processo de sensibilização ao alérgeno específico.	32
Figura 5 – Resposta imune asmática à exposição ao antígeno, após processo de sensibilização.....	33
Figura 6 – Papel dos mastócitos durante a sensibilização e desafio com alérgenos	34
Figura 7 - Alvéolo normal (à esquerda) e alvéolo danificado (à direita).....	39
Figura 8 - Fragmento triatômico que caracteriza as hidrazonas	45
Figura 9 – Perfis de moléculas bioativas de derivados <i>N</i> -Acilhidrazônicos	46
Figura 10 – Compostos bioativos hidrazônicos.....	47
Figura 11 – Fotomicrografias do pulmão de camundongos tratados com derivados acilhidrazônicos AMH e AMZ-Bz sobre as mudanças histopatológicas do tecido pulmonar em modelo de asma experimental induzido por ovoalbumina.....	57
Figura 12 – Fotomicrografias de mastócitos metacromáticos do parenquima pulmonar de camundongos tratados com derivados acilhidrazônicos em modelo de asma experimental induzido por ovoalbumina	60
Figura 13 - Análise morfológica do tecido pulmonar de animais tratados com os derivados acilhidrazônicos.....	63
Figura 14 - Fotomicrografia do tecido pulmonar de animais tratados com os derivados acilhidrazônicos mostrando a disposição das fibras colágenas.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituintes da secreção brônquica, sua origem e significado.....	29
Tabela 2 - Consumos de água e ração pelos animais tratados na dose de 2000 mg/kg com AMH, AMZ-Bz e do grupo controle.....	48
Tabela 3 - Peso relativo dos órgãos (%) dos animais do grupo controle e tratados com AMH e AMZ-Bz na dose de 2000 mg/kg por via oral após 14 dias.....	49
Tabela 4 - Determinação dos parâmetros bioquímicos no soro de camundongos do grupo controle e tratados com AMH e AMZ-Bz na dose de 2000 mg/kg por via oral após 14 dias.....	50
Tabela 5 - Total de leucócitos polimorfonucleares e percentual de inibição da inflamação em lavado pleural dos animais no teste de pleurisia induzida por ovoalbumina	52
Tabela 6 - Atividade mucolítica dos grupos controle e tratados com os derivados N-acilhidrazonas AMH e AMZ-Bz.....	53
Tabela 7 - Total de leucócitos polimorfonucleares e percentual de inibição da inflamação em lavado broncoalveolar no teste de asma alérgica induzida por ovalbumina	55
Tabela 8 – Média dos valores absolutos do número total de mastócitos do tecido pulmonar de camundongos Balb/c no modelo de asma experimental induzido por ovoalbumina.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Al (OH) ₃	Hidróxido de alumínio
APC	Célula apresentador de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
AMH	2-ciano- <i>N'</i> -(3-etoxi-4-hidroxibenzilideno)-acetohidrazida
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMZ-Bz	<i>N'</i> -benzylidene-2-cyano-3-phenylacrylohydrazide
cav	Cavidade
CC	Quimiocina
CCL5	Ligante 5 de quimiocina
CCL11	Ligante 11 de quimiocina
CCL17	Ligante 17 de quimiocina
CCL22	Ligante 22 de quimiocina
CCR4	Receptor de quimiocina 4
CD4	Cluster de diferenciação 4
CXCL1	Ligante 1 de quimiocina
CXCL8	Ligante 8 de quimiocina
CD25	Cadeia alfa do receptor de interleucina 2
CysLT1	Receptor leucotrieno cisteínico 1
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos
COX	Ciclooxigenase
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica

DPM	Desvio padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ENaC	Canal epithelial de potássio
EPM	Erro padrão médio
FcεRI	Receptor de Imunoglobulina E de alta afinidade
FcεRII	Receptor de Imunoglobulina E de baixa afinidade
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGE	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
FPI	Fibrose pulmonar idiopática
GITR	Receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoides
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
h	Hora (s)
HAT	Histona acetiltransferase
HE	Hematoxilina / eosina
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IFN γ	Interferon- γ
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intrapleural
i.t.	Intratorácica

K ⁺	Potássio
Kg	Quilograma
LAB	Lavado broncoalveolar
LOX	Lipoxigenase
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófago 1 α
MKP-1	Proteína-quinase fosfatase 1
min	Minuto (s)
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kapa B
NOS	Óxido nítrico-sintase
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OVA	Ovoalbumina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução tampão fosfato
PDE	Fosfodiesterase
PDGF	Fator de crescimento derivados de plaquetas
PGI ₂	Prostaciclina
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RNA	Ácido ribonucleico

s.c.	Subcutaneo
SCF	Fator de Células-Tronco
Th	T <i>helper</i>
Treg	T regulatória
TGF	Fator de transformação
TNF	Fator de necrose tumoral
TSLP	Linfopietina Estromal Tímica
µg	Micrograma
µm	Micrometro
µM	Micromolar
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO	19
1.2 OBJETIVOS	20
1.2.1 Objetivo Geral	20
1.2.2 Objetivos Específicos	20
1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	21
1.3.1 Drogas de estudo	21
1.3.2 Animais	21
1.3.3 Reagentes	22
1.3.4 Toxicidade oral aguda	22
1.3.5 Pleurisia alérgica induzida por ovoalbumina	23
1.3.6 Atividade mucolítica	23
1.3.7 Modelo de asma experimental induzido por ovoalbumina	24
1.3.7.1 Análise histológica das amostras de tecido pulmonar de animais no modelo de asma experimental induzido por OVA	25
1.3.8 Modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina	25
1.3.9 Análise estatística	26
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 VIAS RESPIRATÓRIAS	27
2.1.1 Distúrbios pulmonares	28
2.2 ASMA	30
2.2.1 Resposta imunológica na asma	31
2.2.2 Fisiopatologia da asma	35
2.2.3 Remodelamento das vias aéreas	36
2.3 FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA	38
2.4 TRATAMENTOS DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS PULMONARES	40
2.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS ACILHIDRAZONAS	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 TOXICIDADE AGUDA ORAL	46
3.2 PLEURISIA ALÉRGICA INDUZIDA POR OVOALBUMINA	51
3.3 ATIVIDADE MUCOLÍTICA	53

3.4 MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA	55
3.4.1 Análise histológica das amostras do tecido pulmonar dos animais submetidos ao modelo de asma experimental induzida por ovoalbumina .	56
3.5 MODELO DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDO POR BLEOMICINA	62
4 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O pulmão é o órgão mais vulnerável às infecções e lesões do ambiente externo, devido à constante exposição a partículas, produtos químicos e organismos infecciosos no ar ambiente (PERLROTH; BRANCO, 2017). Muitos dos fatores de risco para doenças respiratórias crônicas já foram identificados: poluição ambiental, obesidade, alérgenos, infecções respiratórias virais e agentes ocupacionais são alguns podem ser citados. Além disso, pneumonia, bronquiolite e fibrose, por causarem cicatrizes nas vias aéreas, também podem ser consideradas fatores de risco com impacto significativo sobre essas doenças (ALHASSAN *et al.*, 2016; TANIGUCHI; KONDOH, 2016; KOLB *et al.*, 2018).

As doenças respiratórias impõem uma imensa carga para a saúde, e segundo estimativas do estudo Carga Global de Doença (GBD, 2016), publicado em 2016, cinco doenças respiratórias estão entre as causas mais comuns de morte em todo o mundo: doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) moderada a grave; infecções agudas do trato respiratório inferior; asma; tuberculose e câncer de pulmão.

Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que, em indivíduos suscetíveis se caracteriza por sintomas persistentes como dispneia, sensação de aperto torácico, pieira, produção de secreção e tosse, associada com limitação variável do fluxo aéreo e hiperresponsividade à estímulos endógenos e exógenos, onde a inflamação das vias aéreas é primeiramente a principal peculiaridade (REDDEL *et al.*, 2015).

A presença de inflamação crônica persistente em vias aéreas asmáticas já é bem definida e envolve diferentes tipos de células que modulam o processo inflamatório, como mastócitos, linfócitos, eosinófilos, macrófagos e, em menor relevância, neutrófilos, além de elementos mesenquimais como fibroblastos, células endoteliais e musculares (CAÑAS *et al.*, 2018). O remodelamento brônquico é a consequência anatômica da ação da inflamação crônica nas vias respiratórias e refletiria, além das alterações decorrentes do próprio processo inflamatório, a falta de reparo adequado à injúria crônica (BANNO *et al.*, 2018).

A antecipada introdução do tratamento antiinflamatório resulta em melhor controle de sintomas, podendo preservar a função pulmonar à longo prazo e, eventualmente, prevenir ou atenuar o remodelamento das vias respiratórias (GINA, 2016).

O controle da asma persistente requer o uso de medicamentos inalatórios β 2-agonistas de curta ação para alívio rápido dos sintomas e uso diário de corticosteróides inalados. Outras medicações de controle, como broncodilatadores de ação prolongada e agentes biológicos dirigidos contra proteínas envolvidas na patogênese da asma podem ser necessários na asma moderada e grave, mas a manutenção com corticosteróides inalados diários é o padrão de tratamento para asma persistente (McCRACKEN *et al.*, 2017).

Os corticosteroides inalatórios são os agentes antiinflamatórios mais potentes disponíveis atuando nas fases aguda e crônica do processo inflamatório. Com isso,

obtêm-se alívio dos sintomas, melhora no fluxo aéreo, diminuição da hiperresponsividade das vias aéreas e prevenção das recorrências. Em pacientes com asma grave, os corticosteroides inalatórios reduzem a necessidade e a dose dos corticoides orais (DURHAM *et al.*, 2016).

Encontrar substâncias com maior eficácia e com baixa toxicidade tem levado os pesquisadores à uma busca frequente por novos fármacos. Os processos de modificação molecular são promissores pela possibilidade de desenvolver novos tratamentos mais seletivos, transformando substâncias existentes através de reações químicas (CERNAK *et al.*, 2016). Diversas são as vantagens durante o planejamento e desenvolvimento de fármacos pré-existentes. Elas decorrem, entre outros fatores, do prévio conhecimento de suas ações terapêuticas e reações adversas, e respectivos mecanismos de ação, bem como mecanismos farmacocinéticos (DRISCOLL *et al.*, 2017).

Neste contexto, os derivados acilhidrazônicos se mostraram como uma importante classe de compostos químicos sintéticos, que vem sendo estudada devido as suas diversas propriedades farmacológicas. Na literatura encontram-se relatos de propriedades analgésicas e antitrombóticas (BARREIRO *et al.*, 2002). Alguns trabalhos também demonstraram atividades antitumoral e antiviral (ROSTOM; SHALABY; EL-DEMELLAWY, 2003). Destaca-se também a atividade antiinflamatória (BISPO JÚNIOR *et al.*, 2011; CHELUCCI *et al.*, 2014; EL-DIN; BARSEEM, 2016).

Os mecanismos de ação de compostos acilhidrazônicos podem envolver a inibição de enzimas pró-inflamatórias como as cicloxigenases (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX) (SHEN *et al.*, 2017; MOHSIN; AHMAD, 2018). Diante dos referidos achados podemos ressaltar a importância da síntese de compostos tendo como base o núcleo acilhidrazônico como candidato a protótipo para desenvolvimento de fármacos para o tratamento dos sintomas desta patologia.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Em conjunto mais de um bilhão de pessoas sofrem de condições respiratórias agudas ou crônicas. No Brasil, a conjuntura não é discrepante. Doenças respiratórias estão entre as principais causas em números de mortes (SOUZA *et al.*, 2018). Estima-se que um total mundial de mais de 300 milhões de pessoas tenha asma. É considerada uma doença crônica comum em pessoas que vivem em países de baixa renda (BACKMAN *et al.*, 2017). Nessas situações, diagnósticos e tratamentos equivocados são comuns, e medicamentos eficazes podem não estar disponíveis ou acessíveis (MACHADO, 2016).

Ainda que a asma afete todas as faixas etárias, no Brasil estima-se que 20% das crianças em idade escolar têm asma, muitas delas com doença não controlada e altas taxas de inatividade física, absenteísmo escolar e hospitalizações (CARDOSO *et al.*, 2017). As principais evidências indicam que as crianças com asma podem ter um crescimento pulmonar anormal e estão em risco de desenvolver comprometimento respiratório ao longo da vida e DPOC (LOZANO *et al.*, 2012).

O tratamento da asma é dirigido para controlar os sintomas e prevenir exacerbações (GINA, 2016). Os medicamentos inalatórios β 2-agonistas de ação curta proporcionam alívio rápido dos sintomas agudos, contudo, estes fármacos não têm ação antiinflamatória. Seu uso não é recomendado como tratamento isolado de manutenção. O uso freqüente (mais de duas vezes por semana) indica necessidade de tratamento antiinflamatório (SBPT, 2002).

Os corticosteroides, sobretudo os inalatórios, são os fármacos que oferecem melhor relação custo/benefício para o controle da asma persistente. Sua utilização tem sido associada à redução da mortalidade e das hospitalizações por asma (SUISSA; ERNST, 2001). Entretanto, seu uso frequente causa diversos efeitos colaterais locais (candidíase oral, rouquidão, tosse e irritação na garganta, algumas vezes acompanhadas de broncoconstrição devido aos propelentes ou detergentes associados) e sistêmicos (osteoporose, catarata, glaucoma, miopia aguda, adelgaçamento da pele, equimoses, diabetes e supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal causando uma diminuição dos níveis séricos de cortisol) (SBPT, 2002).

O uso de terapêutica combinada, incluindo corticosteróides inalados e β 2-agonistas de longa duração, é eficaz em pacientes para os quais apenas os corticosteróides inalados são insuficientes, porém, o uso de β 2-agonistas de ação prolongada isolados não é apropriado por um longo período pelo risco aumentado de resultados adversos e morte (PETERS *et al.*, 2016). Outras abordagens para controlar a patologia incluem antagonistas muscarínicos de ação prolongada e agentes biológicos que por possuírem preços elevados, risco de anafilaxia e/ou seu uso ser limitado a casos específicos da doença têm levado à baixa adesão ao tratamento da asma com estes medicamentos (McCRACKEN *et al.*, 2017).

Devido à natureza heterogênea da asma e da disponibilidade limitada de biomarcadores preditivos para o sucesso do tratamento, há a necessidade do aperfeiçoamento desses medicamentos e procura de fármacos que sejam de baixo custo, fácil administração e que possuam o mínimo de efeitos colaterais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório de dois derivados acilhidrazônicos (AMH e AMZ-Bz).

1.2.2 Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda dos derivados *N*-acilhidrazônicos AMH e AMZ-Bz;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório de derivados *N*-acilhidrazônicos sobre o recrutamento de leucócitos em lavado pleural;
- Avaliar atividade mucolítica de AMH e AMZ-Bz;
- Avaliar a atividade dos derivados acilhidrazônicos sobre o recrutamento de leucócitos no lavado broncoalveolar;

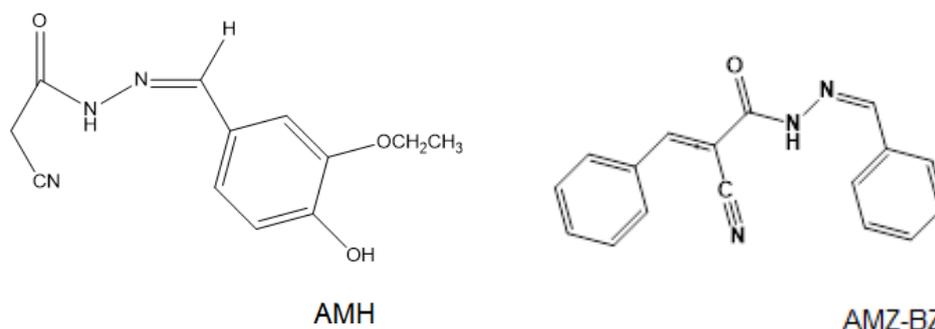
- ❑ Avaliar a ação dos derivados acilhidrazônicos sobre o remodelamento pulmonar em modelo experimental induzido por bleomicina;
- ❑ Avaliar histologicamente segmentos pulmonares de camundongos tratados com AMH e AMZ-Bz.

1.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

1.3.1 Drogas de estudo

Os derivados *N*-acilhidrazônicos 2-ciano-*N'*-(3-etoxi-4-hidroxibenzilideno)-acetohidrazida (**AMH**) e *N'*-benzylidene-2-cyano-3-phenylacrylohydrazide (**AMZ-Bz**) (Figura 1) os derivados acilhidrazônicos foram fornecidos pelo Prof. Ricardo Olimpio de Moura, do Departamento em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Brasil. As doses utilizadas nesse estudo foram escolhidas de acordo com resultados de um *screening* realizado em estudos anteriores por nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2015). As substâncias AMH e AMZ-Bz, foram solubilizadas em salina contendo 5% de dimetilsufóxido (DMSO).

Figura 1- Estruturas químicas dos derivados *N*-acilhidrazônicos AMH e AMZ-Bz



Fonte: Silva (2015).

1.3.2 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas e machos (com cerca de 60 dias de nascidos) Balb/C e swiss (*Mus musculus*) provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em condições ambientais adequadas e controladas, com água e alimentação *ad libitum*. O projeto foi submetido à aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE e aprovado sob o protocolo 23076.045623/2015-18.

1.3.3 Reagentes

Ovalbumina, carragenina, histamina, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), terfenadina, montelucaste e dexametasona foram comprados na Sigma Chemical Co. Hidróxido de alumínio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), Cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina foram comprados na Ceva Saúde Animal Ltda (São Paulo, Brasil), foi comprado na Medley Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brasil) hematoxilinaeosina (HE), Azul de Toluidina e Picrosirius Red. Vermelho de fenol (Sigma Aldrich - St. Louis, MO, USA). Todas as drogas foram dissolvidas em salina 0,9%, contendo 5% de DMSO. Todos os medicamentos foram diluídos imediatamente antes do seu uso.

1.3.4 Toxicidade aguda oral

O teste de toxicidade aguda oral foi realizado segundo metodologia descrita no Guia 423 das diretrizes da OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*). Foram utilizados grupos de 3 camundongos swiss fêmeas e cada dose foi repetida uma vez. Os animais do grupo controle receberam solução salina a 0,9% + 5% de DMSO por via oral, enquanto os animais dos grupos tratados com AMH e AMZ-Bz receberam uma dose de 2000 mg/kg dos respectivos produtos dissolvidos em solução salina + 5% de DMSO por via oral. Foram realizadas observações comportamentais sistemáticas nos tempos de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 8 h após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia, por meio do *screening* hipocrático (CUNHA *et al.*, 2009).

Os parâmetros analisados foram atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto da cauda, contorção, posição do trem posterior, reflexo endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, *straub*, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, piloereção, respiração, cianose, hiperemia e morte. Sinais de toxicidade, tempo do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram anotadas, tabulando-as numa escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso), para posterior análise (MALONE; ROBICHAUD, 1962; MALONE, 1977).

Parâmetros como massa corporal, consumo de água e ração foram observados a cada 24 h durante 14 dias. Ao final do experimento, os animais foram pesados e anestesiados para coleta de sangue por punção cardíaca para análise bioquímica e em seguida submetidos à eutanásia, sendo os órgãos (fígado, baço, rins e estômago) retirados, pesados e avaliados macroscopicamente. O peso relativo dos órgãos foi calculado dividindo-se o peso do órgão pelo peso do animal e multiplicando-se por 100.

1.3.5 Pleurisia alérgica induzida por ovoalbumina

Para induzir migração de células para cavidade pleural, camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados com 0,2 mL de uma suspensão contendo 50 µg de ovoalbumina (OVA) (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 5 mg de hidróxido de alumínio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), dissolvidos em solução salina estéril e administrado por via subcutânea (s.c.) no primeiro e sétimo dia do protocolo experimental. No 14º dia do protocolo experimental, os animais foram pré-tratados por via oral com os derivados AMH e AMZ-Bz (10 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou veículo (salina + DMSO 5%) usado para o grupo controle (desafiado com OVA) e sadio. Após uma hora, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma solução de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg). Foi feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais e os animais foram desafiados com uma injeção intratorácica (i.t.) de 0,1 mL de OVA grade V (12 µg/cavidade) dissolvida em salina estéril (BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006). Após 24 h do desafio com OVA, foi feita a eutanásia dos animais, utilizando-se uma dose letal (0,4 mL) de uma solução anestésica composta de xilazina 0,2 % e cetamina 1,5 %, por via intramuscular, para coleta do lavado pleural coletado para posterior determinação de leucócitos. A contagem total de leucócitos foi feita em contador hematológico Cell-Dyn RUBY.

Figura 2 - Delineamento experimental do modelo de pleurisia alérgica induzida por OVA e tratamento farmacológico com derivados acilhidrazônicos AMH e AMZ-Bz.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).
D = dia

1.3.6 Atividade mucolítica

A atividade mucolítica foi determinada por medição de vermelho de fenol. Foram utilizados grupos de 5 animais machos swiss (*Mus musculus*). Os animais foram pré-tratados, por via oral, com os derivados AMH e AMZ-Bz (10 mg/kg), ambroxol (5 mg/kg) ou veículo (salina + DMSO 5%). Uma hora após o tratamento, os

1.3.7.1 Análise histológica das amostras de tecido pulmonar de animais no modelo de asma experimental induzido por OVA

Os pulmões dos animais submetidos ao teste de asma experimental foram perfundidos com PBS estéril, removidos após a coleta do LBA, fixados em solução de formaldeído a 10 % e emblocados em parafina. Os blocos foram cortados na espessura de 5 μm e os cortes teciduais do tecido pulmonar foram corados para análise morfológica e de migração celular com hematoxilina e eosina (HE) em microscópio óptico. Para as quantificações das áreas inflamadas, foram atribuídos graus de 0 a 3 [0 – ausente (até 4 células por campo); 1 – discreto (de 5 a 15 células por campo); 2 – moderado (de 6 a 25 células por campo) e 3 – abundante (acima de 26 células por campo)], de acordo com as escalas propostas por Motohiro *et al.* (1986) e Lossos *et al.* (2000).

A migração de mastócitos foi analisada com auxílio da coloração com azul de toluidina. Para contagem dos mastócitos, foi utilizado um microscópio óptico LX 400[®], Labomed, com magnitude 400X, acoplado ao computador com programa Motic Images Plus 2.0. A leitura foi realizada em 8 campos por lâmina, usando um retículo quadrado (20x20), onde cada lado do campo tinha 12 μm , somando uma área de 144 μm^2 por campo; e a soma total dos oitos campos igual a 1052 μm^2 . A média de mastócitos foi obtida pela leitura dos 8 campos e expressa em células/ μm^2 (ARNAUD *et al.*, 2014).

1.3.8 Modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina

Camundongos BALB/c machos (n=5) foram anestesiados com halotano. Em seguida, foi administrado por inalação 30 μL de uma solução de cloridrato de bleomicina na concentração de 5 mg/kg dissolvida em 2 mL/kg de salina estéril para indução da fibrose. Os animais do grupo sadio receberam o mesmo volume de salina estéril. Os compostos AMH e AMZ-Bz (10 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou veículo (salina + DMSO 5%) foram administrados no oitavo dia após a indução até o 22^o dia. O peso corporal dos animais foi monitorado durante o tratamento. No 24^o dia, os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de anestésico (Adaptado de MURAKAMI *et al.*, 2014) e fragmentos do tecido pulmonar foram coletados, fixados em formalina, embebidos em parafina e confecionadas lâminas que foram coradas com Hematoxilina-eosina, para determinar a intensidade da resposta inflamatória, ou pelo método de Picrosirius Red, para detectar fibras colágenas.

As imagens foram capturadas por câmera digital acoplada à microscópio óptico LX 400[®], Labomed, com magnitude 400X, conectada ao computador com programa Motic Images Plus 2.0. e transferidas no formato TIF e com uma resolução de 1024 x 768 pixels. Para identificação da área ocupada por fibras colágenas foi utilizado um microscópio óptico sob aumento de 400x, a análise foi feita em 5

campos aleatórios subjacentes ao epitélio de cada lâmina, totalizando 15 campos correspondentes a cada grupo.

1.3.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média) ou média \pm DPM (desvio padrão da média). A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA), ou duas vias (ANOVA), dependendo do modelo, seguida do teste de Tukey ou Bonferroni. Para comparação de densidade de mastócitos entre os grupos, utilizou-se os testes de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn com intervalo de confiança de 95% para todos os testes, utilizando o software *Graph Pad prism. 7.0*. Valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VIAS RESPIRATÓRIAS

O trato respiratório humano é dividido em duas porções funcionais: as vias aéreas condutoras e a região respiratória. As vias aéreas condutoras filtram e conduzem o ar inspirado e são compostas pela cavidade nasal, seios paranasais, faringe, laringe, traqueia, brônquios, bronquíolos e bronquíolos terminais. A região respiratória, local onde as trocas gasosas são realizadas, é composta por bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares (PEATE, 2018).

As partículas inaladas pelo trato respiratório são retidas ao longo das vias respiratórias. Ao alcançarem os alvéolos pulmonares, as partículas inaladas podem ser depositadas nos próprios alvéolos por longos períodos de tempo podendo, ocasionalmente, a partir dos alvéolos seguir duas vias principais: (1) o transporte alveolar e bronquíolar ou (2) depois de entrar no espaço intersticial interalveolar, alcançar a circulação sanguínea ou linfática (AUGUSTO; LOPES; GONÇALVES, 2016).

O epitélio das vias aéreas é a primeira linha de contato do organismo com o meio ambiente inalado na respiração, estando a toda hora exposto a agentes infecciosos ou nocivos nas partículas transportadas pelo ar que podem causar lesões agudas ou crônicas (JEGAL; KIM, 2016).

No epitélio respiratório humano - com base em critérios estruturais, funcionais e bioquímicos - as células epiteliais podem ser classificadas em três categorias: basal, secretora e ciliada. Além das células epiteliais estruturais, uma variedade de células do sistema imunológico, células inflamatórias e células fagocíticas migram para o epitélio respiratório, ultrapassam a membrana basal e transitam pelo lúmen ou residem no epitélio. Estão incluídas entre estas células mastócitos, linfócitos, células dendríticas e macrófagos (WHITSETT; ALENGHAT, 2014).

A membrana basal epitelial atua como âncora para o epitélio, facilitando a aderência e migração de células epiteliais; é essencial para regular o fenótipo de células epiteliais, bem como estabelecer e manter a sua polaridade e atua como uma barreira entre a superfície do epitélio e o interstício pulmonar (KASPER; BARTH, 2017).

O interstício pulmonar, que é o espaço extracelular e extravascular entre as células do tecido, contém uma variedade de células como monócitos, linfócitos, fibroblastos, miofibroblastos e plasmócitos, além de colágeno, fibras elásticas e fluido intersticial. A principal via de drenagem para o fluido intersticial, entre o epitélio e a membrana basal endotelial, é a via dos vasos linfáticos (LORUSSO *et al.*, 2015).

Embora o pulmão seja um órgão cheio de ar, sua mucosa é coberta por um surfactante que recobre uma área superficial extensa e geralmente umidifica quase todo o pulmão (AUVENSHINE, 2010).

O epitélio das vias aéreas está sujeito a agressões físicas, químicas, ambientais e inflamatórias, desempenhando função importante tanto fisiológica quanto patofisiológica. A interação entre os fosfolípidios do surfactante pulmonar e medicamentos inalados como glicocorticoides, polipeptídeos e antibióticos, afetam a absorção, solubilidade, retenção e remoção dos medicamentos no pulmão (RANGARAJ; PAILLA; SAMPATHI, 2018).

2.1.1 Distúrbios pulmonares

São doenças pulmonares em virtude de obstruções crônicas, fisiologicamente determinadas, das vias aéreas, independente da etiologia. Nestas doenças, a obstrução do fluxo de ar pode ser crônica e persistente ou episódica e recorrente. (STABLER; MORRISEY, 2016). O pulmão adulto tem a capacidade de regeneração, no entanto, a perda de unidades alveolares frequentemente desencadeia episódios repetidos de lesão, resultando em consumos incessantes de capacidade endógena de reparo pulmonar (CAO; XIAO, 2018).

Estes distúrbios são caracterizados fisiopatologicamente por eventos infecciosos e inflamatórios que resultam em acúmulo de secreções mucosas espessas e viscoelásticas, o que acarreta redução na eficácia dos mecanismos mucociliares e de tosse para eliminar o fluido estagnado (DHANISHA *et al.*, 2018).

A extensa superfície epitelial do trato respiratório entre o nariz e os alvéolos é exposta diariamente a patógenos virais e bacterianos, partículas e material gasoso com efeitos potencialmente prejudiciais (DICKSON; HUFFNAGLE, 2015).

Superfícies saudáveis das vias aéreas são revestidas por células epiteliais ciliadas e cobertas com uma camada de superfície das vias aéreas, que tem dois componentes, uma camada de muco que aprisiona partículas inaladas e patógenos estranhos, e uma camada periciliar de baixa viscosidade que lubrifica as superfícies das vias aéreas. A interação coordenada desses componentes na superfície do trato respiratório resulta no principal mecanismo de defesa dos pulmões que é o clearance mucociliar (BUSTAMANTE-MARIN; OSTROWSKI, 2017).

As propriedades reológicas do muco (isto é, a capacidade de sofrer fluxo e deformação em resposta às forças aplicadas a ele) e, portanto, a transportabilidade da camada mucosa, são determinadas pela composição do muco e seu estado de hidratação. O muco normal é composto de cerca 1% de mucinas, 1% de sal, 1% de outras proteínas e 97% de água (HAMED; FIEGEL, 2013).

A hidratação da camada superficial da via aérea é mantida pelo transporte iônico transmembranar ativo do epitélio ciliado. Na membrana apical, a reabsorção de Na^+ é mediada pelo canal epitelial de Na^+ (ENaC) com $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$, seguindo passivamente o gradiente osmótico (MOORE; TARRAN, 2018). Os principais constituintes macromoleculares da camada mucosa são as glicoproteínas mucina. O aumento da produção e secreção de mucinas é uma característica de muitas doenças crônicas das vias aéreas, incluindo asma, DPOC e fibrose cística (ZHOU-SUCKOW *et al.*, 2017).

Os constituintes essenciais da secreção brônquica podem ser divididos em três grupos, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Constituintes da secreção brônquica, sua origem e significado.

Origem	Constituintes		
Elementos secretados pelas glândulas e células mucosas	Mucinas ácidas: sialomucinas ¹ sulfamucinas ²	Mucinas neutras: fucomucinas ³	Imunoglobulina A
Elementos produzidos pela infecção brônquica e pela reação inflamatória	Proteínas plasmáticas: soroalbumina orosina haptoglobina	Outras proteínas: α_1 -antitripsina ⁴ calicreína ⁵	Água Íons
Elementos alveolares	Macrófagos alveolares	Fosfolípidos: provem do surfactante ⁶	

- 1) As sialomucinas são mais miscíveis em água, favorecendo a hidratação e fluidificação do muco.
- 2) Inibem cininas, portanto intervêm reduzindo a reação inflamatória.
- 3) São menos hidrossolúveis, colaborando para o aumento da consistência do muco.
- 4) Constitui eficiente bloqueador de enzimas secretadas por leucócitos e macrófagos da região.
- 5) Ao ser ativada, libera cininas que levam a broncoconstrição
- 6) Proteína fosfolipídica complexa produzida pelas células epiteliais alveolares do tipo 2.

Fonte: Adaptado de LARA; FILHO (1999).

No cenário de inflamação crônica das vias aéreas, o muco respiratório conterá detritos de bactérias ou células inflamatórias; isso é chamado de "escarro" quando é expectorado (MA; RUBIN, VOYNOW, 2018). A medição padrão das taxas de clearance mucociliar requer a inalação de um marcador não-permeável que se deposita na superfície da via aérea. Este método assume que o marcador se move para fora do pulmão na mesma taxa que as secreções das vias aéreas nas quais ele está imerso (BENNETT *et al.*, 2013).

Embora o epitélio das vias aéreas contenha diferentes tipos de células, as células ciliadas e as células secretoras do epitélio superficial e das glândulas submucosas contribuem diretamente para a função mucociliar (FLORES-DELGADO; LYTTLE; QUINTON, 2015).

As células caliciformes são as principais células secretoras no epitélio das grandes vias aéreas. Hiperplasia de células caliciformes é uma característica da asma (ALAGHA *et al.*, 2019) e DPOC (KIM *et al.*, 2015), enquanto a hipertrofia de células caliciformes, hiperplasia, ocorre na fibrose cística (CHEN *et al.*, 2018).

2.2 ASMA

A asma é definida como uma doença inflamatória crônica caracterizada pela obstrução variável do fluxo aéreo e hiperresponsividade das vias aéreas em associação com inflamação. Podem ocorrer crises recorrentes de falta de ar e pieira variando quanto à severidade e frequência de indivíduo para indivíduo. Esses sintomas podem ocorrer várias vezes ao dia ou semanalmente, podendo em alguns casos piorar durante atividade física ou à noite (GIRODET *et al.*, 2011).

A maioria dos pacientes sofrem de asma extrínseca (relacionada à predisposição genética), mas alguns pacientes têm asma intrínseca (onde os mecanismos de deflagração são não-ímmunes), e esses indivíduos frequentemente desenvolvem a forma mais severa da doença (TILLES, 2018).

Os fatores de risco na asma são classificados de acordo com as causas do início da doença, exposições à patógenos ambientais, estilo de vida, comorbidades, exposições ocupacionais e gravidade da doença. Fatores genéticos também contribuem significativamente para a expressão e gravidade da doença (LEMANSKE; BUSSE, 2010).

Durante um acometimento de asma ocorre a dilatação da mucosa brônquica, causando estreitamento das vias aéreas e a redução do fluxo de ar (KEGLOWICH; BORGER, 2015). Essa hiper-reatividade é acompanhada do aumento da irritabilidade sensorial das vias respiratórias e aumento da secreção do muco. A asma é uma doença heterogênea que relaciona a imunopatologia, fenótipos clínicos, respostas às terapias e história natural. As diferentes expressões clínicas da asma envolvem diferentes fatores ambientais e contribuições variadas de contração do músculo liso, edema e remodelação dos elementos formados das vias aéreas. A heterogeneidade da asma também se relaciona com a diferente resposta às terapias (BAO *et al.*, 2018).

A asma é classificada em intermitente ou persistente, podendo a asma persistente variar entre leve, moderada ou grave. Além disso, pacientes com asma podem ser classificados como alérgicos (mediada por Imunoglobulina E - IgE), não alérgicos (desencadeada por infecções virais do trato respiratório ou sem causa aparente), com doença ocupacional, doença respiratória exacerbada pela aspirina, doença potencialmente fatal, doença induzida pelo exercício e tosse variante de asma (KOTERBA; SALTOUN, 2012; LARSSON *et al.*, 2018). A asma é classificada geneticamente como uma desordem complexa e, como tal, não segue as características de mendelismo (LEMANSKE; BUSSE, 2010).

Esta patologia afeta todas as faixas etárias e apresenta alta morbidade e mortalidade em todo o mundo. As taxas de prevalência de asma têm aumentado em muitos países nas últimas décadas. Comparado com 50 anos atrás, quando os relatos da incidência de asma foram entre 2% a 4%, dados atuais sugerem a prevalência de 15% a 20% na população mundial (MORAES *et al.*, 2018). O Brasil tem alta prevalência de asma, assim como em outros países da América Latina. A mortalidade da asma no Brasil ainda é alta. Embora tenha havido uma pequena redução do total de óbitos, aproximadamente 5 pacientes morrem de asma diariamente no Brasil. Como a asma é uma doença tratável, óbitos por asma, muitas vezes prematuramente, deveriam ser uma fatalidade muito rara nesse contexto. Esta patologia é um importante problema mundial de saúde e tem impacto social negativo em diversas populações (CARDOSO *et al.*, 2017).

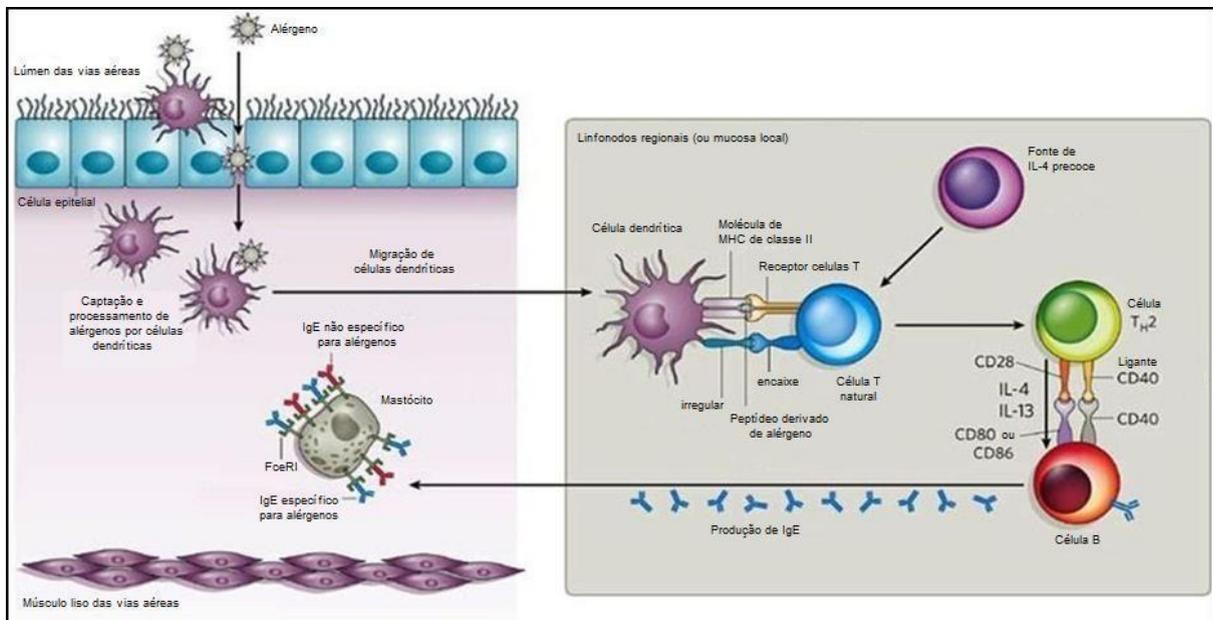
2.2.1 Resposta imunológica na asma

A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas caracterizada pelo envolvimento principalmente de células T CD4+ (HIROSE *et al.*, 2017). O início desta resposta (Figura 4) ocorre quando alérgenos que entram nas vias aéreas ultrapassam as barreiras do trato respiratório e são reconhecidos, fagocitados, processados e apresentados pelas células dendríticas (PLATZER; STOUT; FIEBIGER, 2015), consideradas as células apresentadoras de antígenos mais poderosas (APCs) que formam uma rede imune inata dentro do tecido pulmonar, (fase de sensibilização) via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) aos linfócitos T *helper* ou auxiliares (Th) que irão se diferenciar em Th2.

Os subtipos de linfócitos T CD4 são classificados em Th1 e Th2 de acordo com o perfil de citocinas liberados por essas células. O subtipo Th2 controla a resposta alérgica através da produção de citocinas IL4, IL-5, IL-9 e IL-13 (MURDOCH; LLOYD, 2010).

Neste processo, os antígenos inalados ativam três importantes mecanismos: (1) a sensibilização de mastócitos através de receptor de IgE induz a liberação de mediadores que estimulam a broncoconstrição, como leucotrienos cisteínicos e prostaglandina; (2) as células epiteliais liberam Fator de Células-Tronco (SCF) que promovem a manutenção dos mastócitos na mucosa da superfície das vias aéreas; (3) as células dendríticas processam os alérgenos (condicionados por Linfopoiatina Estromal Tímica (TSLP), proveniente tanto das células epiteliais quanto de mastócitos), e liberam quimiocina ligante (CCL17 e CCL22), que atuam sobre o Receptor 4 de quimiocina CC (CCR4), atraindo células Th2 para as vias aéreas (KOPF; SCHNEIDER; NOBS, 2015).

Figura 4 – Processo de sensibilização ao alérgeno específico.

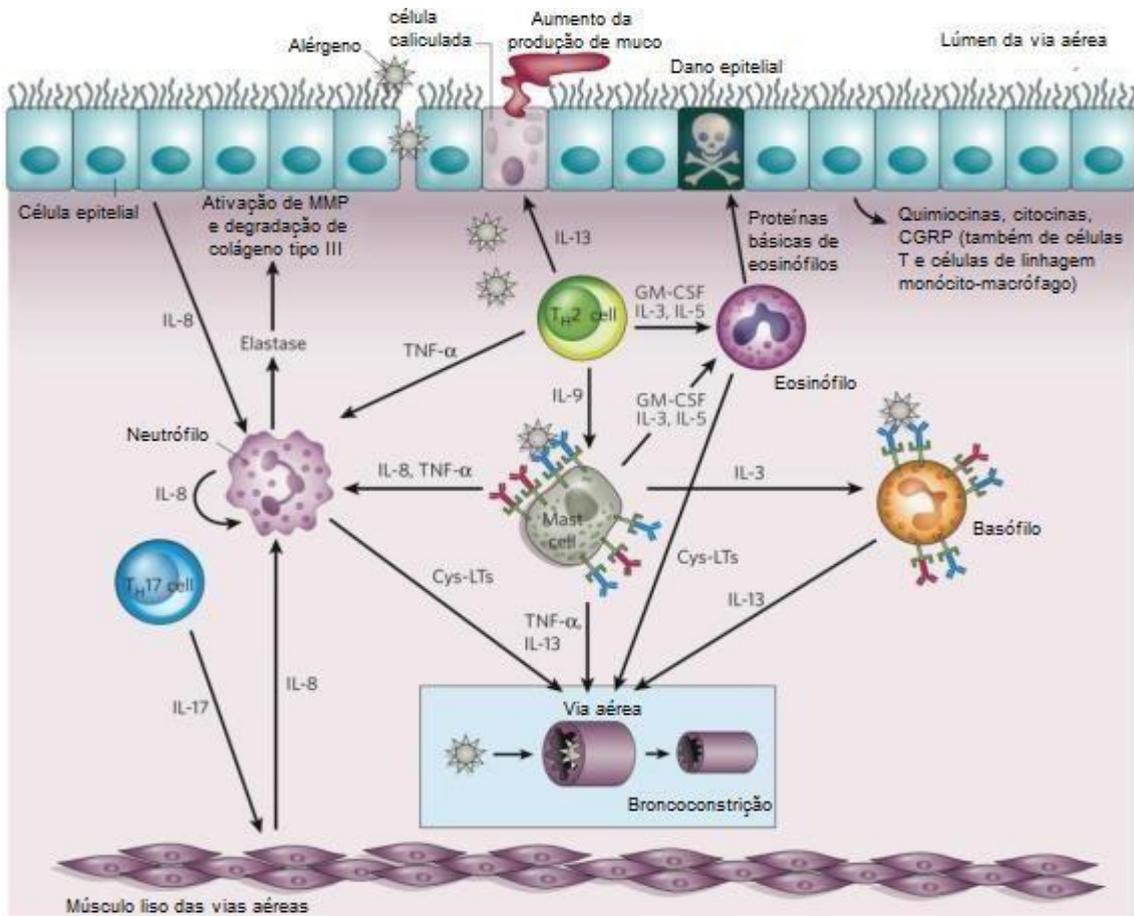


Fonte: Adaptado de GALLI *et al.* (2008).

Células dendríticas reconhecem o antígeno, migrando para os linfonodos regionais e apresentam o antígeno às células T, induzindo a ativação de células Th2 e células B. Células B secretam IgE específica para o plasma. Observa-se mastócito com IgE específica, com ligante de alta afinidade (FceRI).

Depois de sensibilizado, a resposta imune secundária é elaborada e caracterizada pelo repertório de interleucinas (IL) liberadas por estas células (IL4, IL5, IL9 e IL13) (GALLI *et al.*, 2008), e, também, pelo infiltrado de mastócitos, eosinófilos, e macrófagos para as vias aéreas (Figura 5).

Figura 5 – Resposta imune asmática à exposição ao antígeno, após processo de sensibilização.



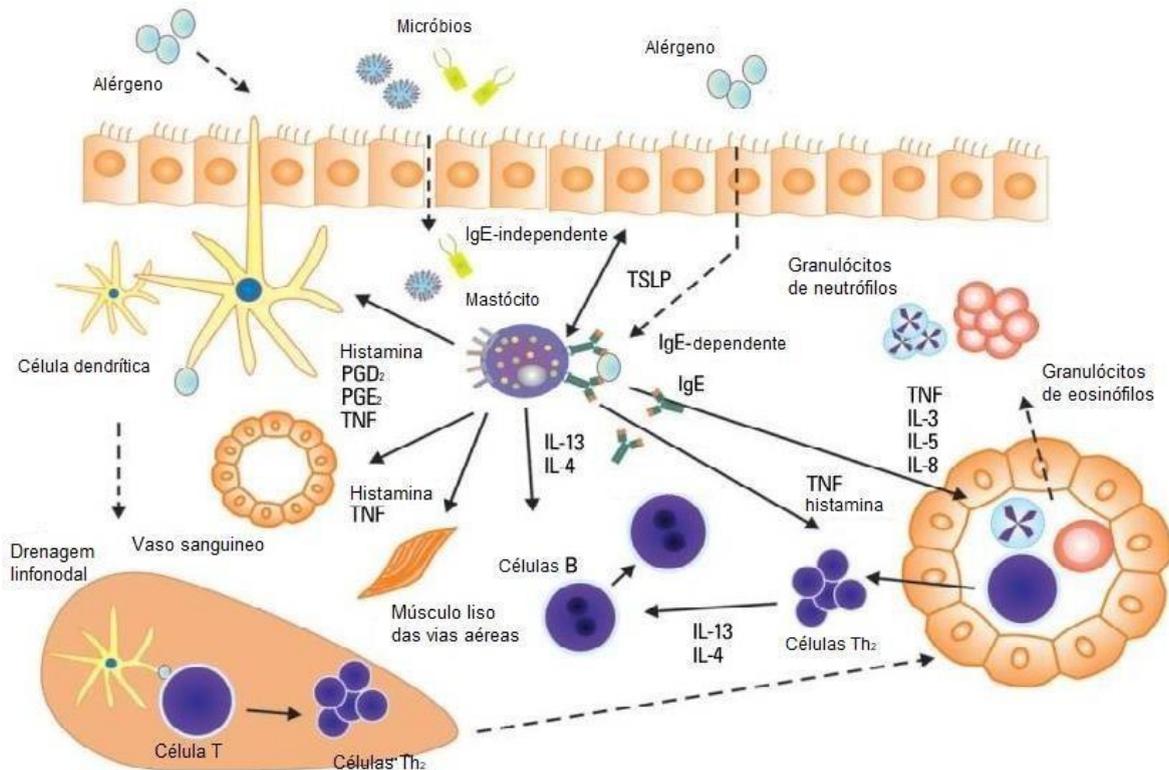
Fonte: Adaptado de GALLI *et al.* (2008).

Células Th2 e mastócitos participando da ativação de eosinófilos, neutrófilos, basófilos e células caliciformes. Células Th17 induzindo a broncoconstrição.

Os mediadores, que são liberados por essas células, estão implicados não apenas na broncoconstrição, mas também no aumento da responsividade brônquica, causando dano epitelial, hiperplasia das glândulas mucosas, fibrose subepitelial, deposição de colágeno, infiltrados de células inflamatórias e aumento da massa muscular lisa através de hiperplasia e hipertrofia (FEHRENBACH; WAGNER; WEGMANN, 2017).

Os mastócitos demonstram iniciar e promover a inflamação das vias aéreas em modelos murinos e doenças humanas, que também envolve a secreção de vários mediadores produzidos por mastócitos (Figura 6). Em conjunto, esses achados demonstram claramente que os mastócitos não são meras células efetoras durante as reações alérgicas, mas também têm um papel complexo na indução e regulação das respostas imunes adaptativas (REUTER *et al.*, 2010)

Figura 6 – Papel dos mastócitos durante a sensibilização e desafio com alérgenos.



Fonte: Adaptado de REUTER, *et al.* (2010).

A inalação de um alérgeno em combinação com a exposição a um estímulo alternativo/ativador de células de mastócito independente da IgE leva à migração de células dendríticas para os linfonodos e a uma indução de resposta Th₂. Além disso, a exposição ao alérgeno resulta em ativação de mastócitos dependentes de IgE, levando a uma quimiotaxia aumentada de células inflamatórias, bem como a ativação local de células T.

Linfoproteína estromal tímica (TSLP); prostaglandina D₂ (PGD₂); prostaglandina E₂ (PGE₂); fator de necrose tumoral (TNF).

Os mastócitos são identificados por seus grânulos intracelulares ligados à membrana. Estes contêm uma matriz proteoglicana que consiste predominantemente de sulfato de heparina, e em menor grau, proteases neutras, hidrolases ácidas e moléculas de histamina. A heparina liga-se a várias citocinas e quimiocinas, causando conseqüências potenciais, como facilitar a apresentação parácrina local de citocinas nas células adjacentes, protegendo-as da degradação proteolítica e potencialmente interferindo na detecção de citocinas por ELISA e imunohistoquímica (BRADDING; ARTHUR, 2016).

A liberação de mediadores preformados e derivados de lipídios favorecem para os sinais e sintomas agudos associados à resposta alérgica inicial (BARNES, 2011). As aminas biogênicas, como a histamina, ligam-se a receptores específicos presentes em diferentes tipos celulares. No endotélio, a ligação de histamina causa contração celular, levando ao extravasamento do plasma para os tecidos, além de estimular a produção de prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico que levam à

vasodilatação local. Ademais, a histamina promove contração da célula muscular lisa das vias aéreas. As proteases neutras de serina são importantes constituintes proteicos dos grânulos de mastócitos, favorecendo para o remodelamento tecidual e o recrutamento de células efetoras. Assim como a histamina, os mediadores derivados de lipídios, principalmente os leucotrienos, instigam vasodilatação, broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, aumento da secreção de muco e da expressão de moléculas de adesão (GALLI *et al.*, 2008; EISENBARTH; FLAVELL, 2009; HOLGATE, 2012). Alguns dos mediadores liberados são capazes de estimular os terminais periféricos dos nervos sensoriais nas vias aéreas e ocasionar tosse (GALLI *et al.*, 2008;).

A ativação de mastócitos dependente de IgE um processo denominado "exocitose composta" ou "degranulação anafilática". A ativação da célula através desta via não é um evento citotóxico, e mesmo após a degranulação quase completa, os mastócitos do pulmão são capazes de re-granular (DAHLIN; HALLGREN, 2015). Os mastócitos ativados também liberam mediadores recém-sintetizados, incluindo interleucinas (IL-3, IL-5), fator estimulador do crescimento de granulócitos e monócitos (GM-CSF), que, juntamente com os leucotrienos, ativam e atraem outras células inflamatórias para a parede brônquica, perpetuando o processo inflamatório, mas são liberados mais lentamente do que os mediadores pré-formados (SILVA; DIAS, 2013).

Na asma há um acúmulo de células inflamatórias no tecido pulmonar constituído principalmente de linfócitos Th2, mastócitos, eosinófilos, células dendríticas e macrófagos e angiogênese em resposta ao aumento de secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (SIDDIQUI *et al.*, 2007; ERLE; SHEPPARD, 2014).

Os eosinófilos estão entre os principais constituintes do infiltrado inflamatório pulmonar em indivíduos com asma. A diferenciação terminal e a mobilização de eosinófilos na medula óssea são dirigidas pela IL-5 secretada durante reação de fase inicial e tardia. Eosinófilos ativados são capazes de produzir e secretar mediadores lipídicos (como o leucotrieno C4 (LTC4)), proteínas básicas, citocinas IL- 4, IL-5, IL-13, incluindo interferon (IFN)- γ , e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de linfócitos Th2, amplificando a resposta inflamatória alérgica (COHN *et al.*, 2004; HOLGATE 2012). Os eosinófilos também podem articular a resposta imune adaptativa e atuar como células apresentadoras de antígeno, agindo como amplificadores do processo inflamatório no sítio da inflamação (BARRETT; AUSTEN 2009).

2.2.2 Fisiopatologia da asma

A inflamação crônica na asma é frequentemente acompanhada de mudanças estruturais que podem envolver todas as camadas da parede das vias aéreas e tipicamente está associada com o aumento do número e tamanho de células caliciformes, a remoção do epitélio e espessamento da membrana reticular basal, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa brônquica, elastose e fragmentação das

fibras elásticas, hiperplasia das glândulas mucosas, aumento no desenvolvimento de miofibroblastos e da vascularidade (angiogênese) e deposição de componentes de matriz extracelular levando à fibrose subepitelial (PELAIA; VATRELLA; MASELLI, 2012; ERLE; SHEPPARD, 2014).

A parede das vias aéreas de pacientes asmáticos é impregnada com eosinófilos e células mononucleares, principalmente linfócitos T CD4⁺. A quantidade de mastócitos, macrófagos e neutrófilos também aumenta no tecido pulmonar. No lúmen das vias aéreas, o muco se mistura às células efetoras ativadas, incluindo macrófagos, linfócitos Th2 e eosinófilos. Nos casos mais graves, ocorre também um aumento substancial na quantidade de neutrófilos. Além disso, essas alterações estruturais acarretam comprometimento da função de barreira do epitélio das vias aéreas (BARNES, 2011).

As alterações estruturais na parede das vias aéreas e no parênquima pulmonar, anunciadas como remodelamento, parecem resultar da interação de mediadores inflamatórios com as células do estroma e células inflamatórias. Fatores locais, envolvendo as células estruturais e a matriz extracelular, respondem à inflamação de forma característica e coordenada na tentativa de reparar o dano causado pela inflamação local. Além disso, o espessamento da membrana basal reticular, como resultado da fibrose subepitelial, promove uma redução no diâmetro do lúmen dessas vias (ERLE; SHEPPARD, 2014)

2.2.3 Remodelamento das vias aéreas

A remodelação das vias aéreas na asma foi descrita pela primeira vez em 1922 por Hubert e Koessler em casos de asma fatal. Desde então, este remodelamento tem sido documentado em vias aéreas grandes e pequenas. Esta fisiopatologia refere-se às alterações estruturais nas vias aéreas de indivíduos asmáticos não vistos em indivíduos saudáveis (JAMES *et al.*, 2002).

A presença de inflamação crônica com a liberação de inúmeras substâncias mediadoras, poderia agir, teoricamente, em cada um dos compartimentos da via aérea, tendo como consequência as alterações de caráter anatômico. Sabe-se que a inflamação crônica pode seguir um quadro agudo ou apresentar-se de maneira crônica insidiosa, o que leva ao dano tecidual progressivo (MAUAD *et al.*, 2000).

Neste processo ocorre uma sequência de alterações estruturais que vão desde a superfície epitelial até a adventícia do brônquio. Dentre as alterações epiteliais ocorrem a descamação intensa de células para dentro do lume da via aérea. Paralelamente, há prejuízo da ciliogênese, metaplasia de células caliciformes na via aérea e, em menor grau, metaplasia escamosa, fenômenos inespecíficos e aparentemente relacionados à regeneração epitelial. Existem muitos fatores que podem levar ao estado de mutação epitelial na asma. O mais conhecido é o dano epitelial devido à ação dos produtos derivados da degradação de eosinófilos, que tem fator citotóxico epitelial. Outros fatores incluem radicais livres de oxigênio, efeito de proteases neutras e do edema subepitelial (RENNARD *et al.*, 1995).

A membrana basal é uma camada de matriz extracelular especializada que promove suporte mecânico e forma a estrutura mantenedora para o crescimento epitelial. É composta por colágeno tipo IV, proteoglicanos e complexos laminina/entactina/nidogênio (MORRISSEY; SHERWOOD, 2015). Na asma, a membrana basal mostrasse íntegra, havendo depósitos de colágenos na camada reticular. Isso determina um aspecto espessado e hialinizado, sendo considerado quase que uma característica da doença (TSARTSALI *et al.*, 2011).

Na matriz extracelular pulmonar encontram-se as fibras colágenas, as fibras elásticas, fibronectina, proteoglicanos e as substâncias que compõem as membranas basais epiteliais e endoteliais. As fibras do sistema elástico no pulmão regulam a patência das vias aéreas e o recolhimento elástico pulmonar (KULKARNI *et al.*, 2016). A perda de acoplamento das fibras elásticas na membrana basal pode resultar em uma diminuição da força elástica da via aérea, determinando um relaxamento deficiente da mesma e facilitando o mecanismo de broncoconstrição, contribuindo para a hiperresponsividade brônquica (KUDO; ISHIGATSUBO; AOKI, 2013).

Na asma ocorre uma vasodilatação brônquica por ação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento. A consequência final desse estado é a presença de edema, atribuída a um estado de extravasamento da microcirculação brônquica. Este estado de permeabilidade alterada tem implicações no mecanismo de remodelamento brônquico. O fator mais importante parece ser, principalmente em vias aéreas de menor calibre, o efeito amplificador que o espessamento da mucosa fornece para uma dada contração muscular no tamanho final da luz da via aérea (LI; WILSON, 1997).

O músculo liso brônquico é um dos principais alvos de atenção da asma. Vários estudos mostraram que há hipertrofia e hiperplasia da camada muscular. O aumento da massa muscular poderia refletir em uma proliferação muscular induzida por mediadores inflamatórios, na hipertrofia por repetidos episódios de broncoespasmo e no controle inibitório muscular reduzido resultando em atividade miogênica aumentada (VIGNOLA *et al.*, 1998).

A agressão ao epitélio das vias aéreas associada à inflamação parece ser o evento inicial desencadeante do processo anormal de reparo na asma. Os eosinófilos têm papel fundamental neste processo, uma vez que causam lesão epitelial e estimulam a fibrogênese através da produção de TGF- β , citocina que regula a produção de colágeno (NATIONAL HEART LUNG AND BLOOD INSTITUTE, 2007).

Os mastócitos podem produzir citocinas como TNF α , IL-4, fator de crescimento fibroblástico (FGF), que também atua na digestão da matriz extracelular. Estas células são capazes de produzir colágeno tipo VIII (KRISHNASWAMY *et al.*, 2006). Os linfócitos contribuem para o remodelamento através do efeito regulatório sobre a fibrose e sobre a inflamação na produção de citocinas como IL-3, IL-5, fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (BHATTACHARYA *et al.*, 2015). Os macrófagos produzem citocinas, metaloproteases e elastase, que podem degradar os componentes da matriz

extracelular. As próprias células epiteliais liberam diferentes mediadores, fatores quimiotáticos, citocinas, TGF- β e o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), contribuindo para perpetuação da lesão tecidual e formação de cicatriz (NAVEGANTES *et al.*, 2017).

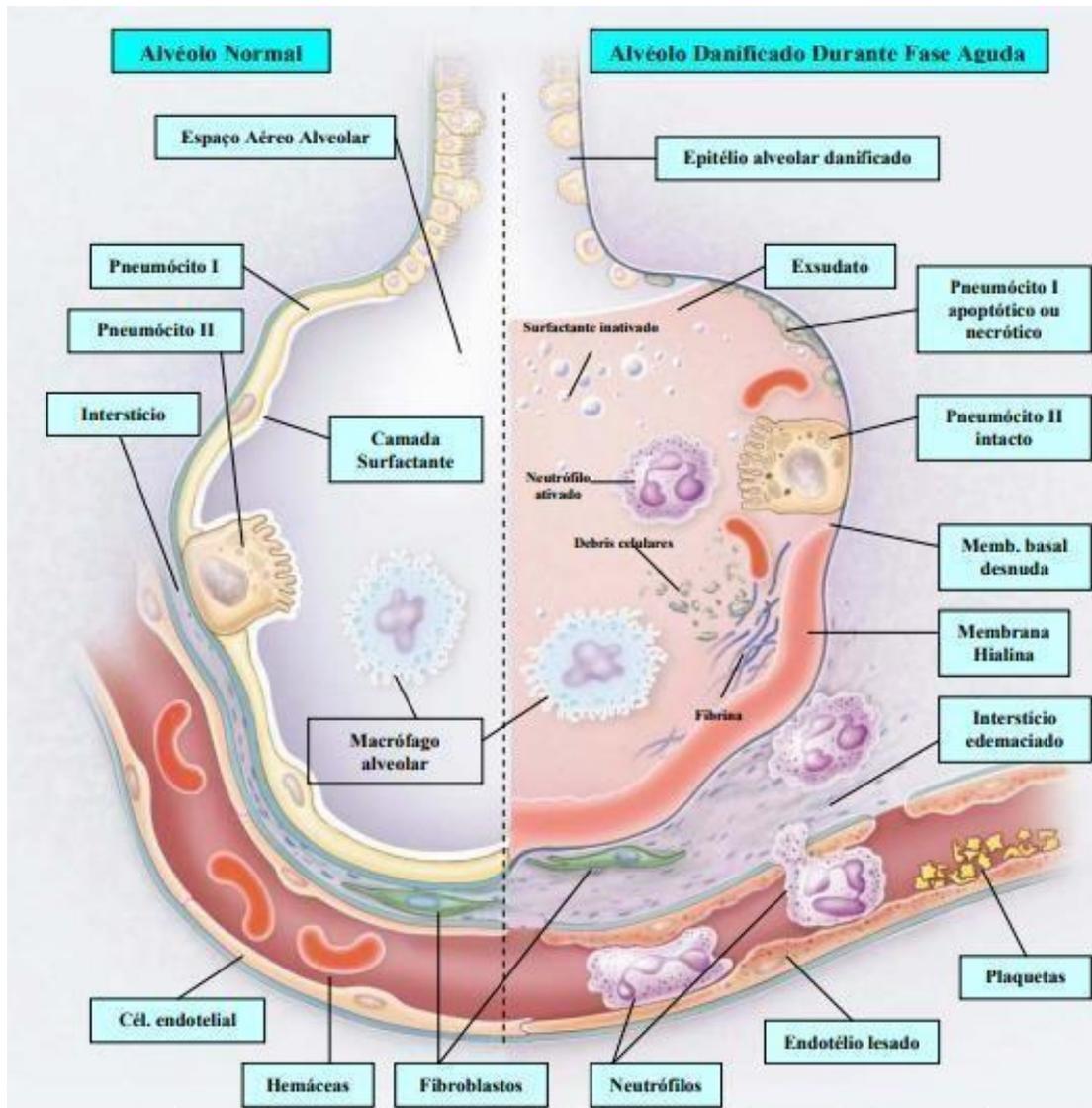
2.3 FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma doença que acomete o parênquima pulmonar de forma progressiva, em resposta a algum tipo de lesão epitelial alveolar, bem como estreitamento de vias aéreas (CHAMBERS; MERCER, 2015).

Dois tipos principais de células constituem o epitélio alveolar: os pneumócitos tipo I, que cobrem cerca de 90 a 95% da superfície alveolar; e os pneumócitos tipo II, que apesar de mais numerosos, revestem apenas 5 a 10% do restante da superfície alveolar. Estas células são mais resistentes aos danos, e têm as funções de produzir surfactante, realizar o transporte de íons, e de proliferação e diferenciação em pneumócitos tipo I, quando esses são lesados (CHUQUIMIA *et al.*, 2013). Os pneumócitos tipo II podem ser considerados progenitores para a reepitelização do epitélio alveolar, pois proliferam-se para cobrir a membrana basal e então diferenciam-se em células do tipo I, reestabelecendo a arquitetura alveolar normal e aumentando a capacidade de transporte de fluidos deste epitélio (CROSBY; WATERS, 2010).

A fibrose é morfologicamente caracterizada por processos inflamatórios difusos que resultam em proliferação excessiva de fibroblastos e espessamento dos septos alveolares com deposição de colágeno e remodelação do parênquima pulmonar (Figura 7) associada com o padrão histopatológico de pneumonia intersticial não especificada. (SMITH *et al.*, 2010; STEFANOV *et al.*, 2013). Alguns estudos sugerem que a FPI é provocada por uma cicatrização descontrolada em resposta à agressão alveolar (LAURENT *et al.*, 2008).

Figura 7 - Alvéolo normal (à esquerda) e alvéolo danificado (à direita).



Fonte: Adaptado de WARE; MATTHAY (2000).

A figura apresenta os elementos presentes em cada uma das situações. Os macrófagos intra-alveolares, durante a fase aguda, secretam citocinas (interleucinas, IL-1, 6, 8 e 10, e TNF- α) que agem localmente estimulando a quimiotaxia e a ativação dos neutrófilos, atraindo-os do interior dos capilares, para o interior dos espaços aéreos. Estes neutrófilos são responsáveis pela secreção de leucotrienos, radicais oxidantes, proteases e algumas moléculas pró-inflamatórias.

Em condições habituais, a barreira epitelial é muito menos permeável que a barreira endotelial, desta forma, danos ao epitélio podem aumentar esta permeabilidade, e contribuir para a infiltração de líquido nos espaços alveolares. Danos aos pneumócitos tipo II, além de causar uma redução na produção de surfactante, causam um desequilíbrio do transporte de fluidos, danificando a capacidade de absorção do edema, e permitindo que este se estabeleça nos espaços alveolares. Ademais, se a agressão ao epitélio alveolar for muito intensa, e o reparo epitelial não se desenvolver suficientemente, e de maneira organizada, este processo pode levar à fibrose pulmonar (ZHAO *et al.*, 2010).

O tipo de reparo após uma agressão ao epitélio alveolar depende do nível de integridade da barreira epitelial, pois tanto a regeneração quanto o processo cicatricial dependem de interações complexas entre células endoteliais, epitélio alveolar, fibroblastos, macrófagos, fatores de coagulação, citocinas e fatores de crescimento (CROSBY; WATERS, 2010).

Após a lesão epitelial alveolar, ocorre uma re-epitelização alveolar promovida pelos pneumócitos tipo II e por células indiferenciadas que regeneram o epitélio. No entanto, há uma produção exarcebada pelos pneumócitos de citocinas e fatores de crescimento, tais como a IL-8, o TGF- β e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (BORTHWICK; WYNN; FISHER, 2013).

A cicatrização resulta na deposição de fibras colágenas. O colágeno I, principal proteína estrutural do interstício pulmonar, é produzido em grande quantidade durante reações fibróticas e, sua deposição como substituto ao colágeno tipo III inicialmente produzido, provoca perda da arquitetura alveolar normal e contribui para a redução das trocas gasosas e demais alterações funcionais pulmonares (PARRA *et al.*, 2014).

Muitos mediadores promovem a proliferação e diferenciação de fibroblastos e a síntese de colágeno. (LAURENT *et al.*, 2008). O TGF- β é a citocina pró-fibrogênica mais notória em doenças fibróticas, sendo uma proteína multifuncional, realiza um papel fundamental na deposição de matriz extracelular (CHERESH *et al.*, 2013).

O TGF- β promove a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (células que sintetizam proteínas efetoras pró-fibróticas, tais como colágeno tipo I e fibronectina), induz a síntese de proteoglicanos, inibe a degradação do colágeno por inibidores de proteases e provoca redução de metaloproteinases (KULKARNI *et al.*, 2016). Isso auxilia na deposição e acúmulo de matriz extracelular através da regulação de atividades como: a proliferação celular, diferenciação, adesão, migração e apoptose (LUO *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015).

O TGF- β também está envolvido na progressão da fibrose e é capaz de regular outras citocinas tais como, fator de crescimento epidérmico (FGE), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1). (LAURENT *et al.*, 2008).

Devido ao acúmulo de colágeno ocorrerá um remodelamento do parênquima pulmonar com o espessamento dos septos alveolares. A cicatrização resultante estimula a produção de espécies reativas de oxigênio levando ao estresse oxidativo, podendo ativar a criação de um círculo vicioso pró-fibrogênico de TGF- β (CHERESH *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015).

2.4 TRATAMENTOS DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS PULMONARES

Os tratamentos para doenças pulmonares vêm sendo aprimorados ao longo dos anos, porém sua evolução não acompanha simultaneamente aos efeitos progressivos da asma (ITO *et al.*, 2019). Os objetivos do tratamento desta patologia são reduzir o comprometimento da função pulmonar e minimizar os riscos

associados à doença, como exacerbações futuras e efeitos adversos da medicação (McCRACKEN *et al.*, 2017).

As opções farmacológicas são classificadas como inaladores de alívio rápido (que tem benefício de curto prazo) ou medicamentos de controle a longo prazo, utilizados quase que diariamente, o qual reduzem os sintomas por atenuarem a inflamação nas vias aéreas. Os inaladores de alívio rápido (broncodilatadores) abrem rapidamente vias aéreas obstruídas que limitam a respiração. Em alguns casos, medicamentos para alergia são utilizados simultaneamente (STOLOFF, 1998).

Os medicamentos de controle são o alicerce do tratamento da asma. Esses medicamentos diminuem a probabilidade de recidivas (FALK; HUGHES; RODGERS, 2016). Tipos de medicamentos de controle a longo prazo incluem: β_2 -agonistas, antagonistas muscarínicos, corticosteroides inalados ou orais, antagonistas de receptor de leucotrienos, inibidor de síntese de leucotrienos, Anti-IgE, Anti-IL-5 e termoplastia brônquica (McCRACKEN *et al.*, 2017). A escolha inicial do medicamento é dirigida pela gravidade da classificação da asma (intermitente; persistente leve; moderada ou grave) no diagnóstico (GINA, 2016).

Para pacientes com asma intermitente são utilizados fármacos β_2 -agonistas (albuterol, levalbuterol, pirbuterol) ou antagonista muscarínico (ipratrópio) ambos de curta duração, administrados conforme necessário. Esses medicamentos também são usados para alívio rápido dos sintomas em todos os pacientes com asma, independente do nível de gravidade (SZEFLER *et al.*, 2008).

Os β agonistas exercem seus efeitos broncodilatadores via adrenoceptores β_2 (β_2 ARs) localizados nas células do músculo liso das vias aéreas. Após a ligação desses agonistas ao adrenoceptor β_2 , a adenilato ciclase é estimulada pela subunidade $\beta\gamma$ da proteína Gs, e converte a adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3,5'-monofosfato cíclica (AMPC), a qual ativa a proteína kinase A (PKA). Essa enzima promove o relaxamento do músculo liso através da fosforilação da cadeia leve da miosina e pela abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) dependente de potássio (K^+), aliviando a broncoconstrição (GODINHO; DUARTE; PACINI, 2015). Além disso, os agonistas β_2 inibem a neurotransmissão colinérgica nas vias aéreas humanas, reduzindo a broncoconstrição induzida por essa via. Alguns estudos também demonstraram que os agonistas β_2 -adrenérgicos aumentam a condutância de canais de K^+ das vias aéreas, provocando hiperpolarização e relaxamento da membrana (LIU *et al.*, 2015).

A ativação desses receptores resulta no relaxamento das vias aéreas através de processos moleculares. Estes broncodilatadores de alívio rápido agem em poucos minutos para aliviar rapidamente os sintomas durante um ataque de asma. A ligação do agonista β_2 ao adrenoceptor induz uma alteração conformacional permitindo a expressão de adenililciclase que aciona uma miríade de alvos celulares resultando na broncodilatação (BILLINGTON; PENN; HALL, 2017).

Além dos receptores expressos nas células do músculo liso das vias aéreas, β_2 ARs também são encontrados em vários outros tipos de células dentro dos pulmões, incluindo células epiteliais, submucosas, endotélio vascular, músculo liso

vascular e células inflamatórias, incluindo mastócitos, macrófagos e eosinófilos (BILLINGTON; PENN; HALL, 2016).

Já para asma persistente leve são preferencialmente utilizados corticosteróides inalados que melhoram a função pulmonar, sintomas e exacerbações na asma (ALANGARI, 2014).

Os glicocorticóides se ligam a receptores citoplasmáticos, denominados receptores de glicocorticóide (GR), translocando-se do citoplasma para o núcleo, onde pode se ligar e ativar a transcrição de promotores de genes (transativação) ou interagir com outros fatores de transcrição para alterar sua função (transrepressão) (KING *et al.*, 2013).

Na transativação, o complexo receptor-glicocorticóide ativado forma um dímero e liga-se ao elemento de resposta ao glicocorticóide (GRE) na região promotora dos genes sensíveis ao esteroide, levando a transcrição dos genes responsáveis pela codificação de mediadores anti-inflamatórios como também anexina-1, proteína-quinase fosfatase 1 ativada por mitógeno (MKP-1) e do inibidor do fator nuclear- κ B (I κ B). Já na transrepressão, o homodímero receptor-glicocorticóide ativado interage com moléculas coativadoras que apresentam atividade intrínseca histona acetiltransferase (HAT), as quais são ativadas por fatores transcricionais pró-inflamatórios (como AP-1 e NF- κ B), promovendo a inibição da expressão dos genes inflamatórios (SEDWICK, 2014).

Alem disso, os glicocorticóides podem exercer efeitos diretos sobre as células inflamatórias incluindo eosinófilos, linfócitos T e mastócitos (OKANO, 2009). Nos eosinófilos, os corticóides inibem a liberação de mediadores, como IL-5, que atuam quanto a sobrevivência destas células, contribuindo para redução da eosinofília das vias aéreas (McBRIEN; MENZIES-GOW, 2017). Estes fármacos inibem a ativação dos linfócitos T e bloqueiam a liberação de citocinas, as quais são importantes no recrutamento e sobrevivência de células inflamatórias (OLNES *et al.*, 2016), e apesar de não ter efeito inibitório direto sobre a liberação de mediadores pelos mastócitos, quando usado a longo prazo, ele diminui o número dessas células na mucosa brônquica. (WANG *et al.*, 2015).

Corticosteróides inalados (fluticasona, budesonida, mometasona, ciclesonida) reduzem a infiltração e ativação de eosinófilos e outras células inflamatórias. Um antagonista oral dos receptores de leucotrienos pode ser tão eficaz quanto os corticóides inalatórios, por bloquearem a ação dos leucotrienos cisteínicos que são mediadores chave da contração do músculo liso das vias aéreas, sendo um tratamento alternativo de primeira linha (PRICE *et al.*, 2012).

Além do seu efeito broncoconstritor, os leucotrienos também apresentam um papel fundamental nos processos inflamatórios das vias aéreas, por promoverem a secreção de muco, aumentar a permeabilidade vascular e interferir no recrutamento de eosinófilos (LAIDLAW; BOYCE, 2012). O zafirlucaste e montelucaste, sendo antagonistas dos receptores do CysLT₁, impedem a ação de broncospasmo, inflamação da parede pulmonar e quimiotaxia. O zileuton, por ser um inibidor de leucotrienos agindo na inibição da 5-lipoxigenase, impede a síntese de leucotrienos (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006).

Pacientes diagnosticados com asma grave tem como opções de medicação os corticosteroides inalatórios de alta dosagem ou orais, que podem ser associados a combinações com β 2-agonistas de longa duração, agonistas muscarínicos inalatórios de ação prolongada e terapia biológica (PETERS *et al.*, 2010; McCracken; TRIPPLE; CALHOUN, 2016).

Os corticosteroides estão entre os agentes antiinflamatórios mais potentes para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, fazendo deles a terapêutica antiinflamatória mais efetiva para a asma. Sua ação predominante é de desativar diversos genes inflamatórios (codificadores de citocinas, quimocinas, moléculas de adesão, enzimas inflamatórias, receptores e proteínas) expressos durante o processo inflamatório (CAMPOS, 2007). Com isso, obtêm-se alívio dos sintomas, melhora no fluxo aéreo, diminuição da hiperresponsividade das vias aéreas e prevenção das reincidências.

Pode-se precisar usar corticosteróides orais, como a prednisona ou a dexametazona, por vários dias ou semanas antes de alcançar o benefício máximo. Ao contrário destes, os corticosteróides inalatórios efetivamente administram o fármaco em locais-alvo nos pulmões e reduzem os efeitos colaterais em comparação aos corticosteróides orais (CARR; SZEFLER, 2016), porém a exposição sistêmica a longo prazo dos corticosteróides inalados continua sendo uma preocupação pois podem afetar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, a densidade e o crescimento ósseo, os olhos, a pele e a imunidade, incluindo um risco aumentado de pneumonia (PANDYA; PUTTANNA; BALAGOPAL, 2014).

O potencial de anticolinérgicos como broncodilatadores de ação prolongada fornece uma opção adicional no tratamento da asma. A liberação de acetilcolina dos nervos parassimpáticos aumenta o tônus das vias aéreas, contrai a musculatura lisa brônquica e leva à secreção de muco e vasodilatação, principalmente via interação com os receptores muscarínicos, localizados no pulmão humano e nos gânglios das vias aéreas, nervos, músculo liso, glândulas mucosas e endotélio vascular pulmonar (BUELS; FRYER, 2016).

A inflamação das vias aéreas também tem importante papel fisiopatológico na asma, e a acetilcolina induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios das células epiteliais brônquicas e células do sistema imune, incluindo macrófagos, mastócitos, monócitos, granulócitos, neutrófilos e eosinófilos (BUSSE *et al.*, 2016). Os antagonistas muscarínicos competem com a acetilcolina nos receptores muscarínicos do músculo liso das vias aéreas para induzir a broncodilatação. Dadas essas ações, há uma justificativa mecanicista para o uso de antagonistas muscarínicos no tratamento da asma (RESTREPO, 2007).

As fosfodiesterases (PDEs) são um grupo de 11 enzimas de metalofosfohidrolases estruturalmente relacionadas (PDE1 a PDE11), mas funcionalmente distintas, que estão envolvidas na degradação de nucleotídeos cíclicos purinérgicos (AMPc e GMPc) (AZEVEDO *et al.*, 2014).

A fosfodiesterase (PDE) do tipo 4 é a isoforma predominante nas células estruturais, inflamatórias e imunes envolvidas na fisiopatologia da asma (KAWAMATAWONG, 2017). A PDE4 constitui um grupo de enzimas

farmacologicamente distintas codificadas por, pelo menos, quatro genes (PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D), os quais apresentam especificidade pelo AMPc (BURGIN *et al.*, 2009). A PDE4 é encontrada em diversos tipos de células e tecidos, incluindo leucócitos e músculo liso das vias aéreas. O envolvimento da PDE4 em processos patológicos associados com esses tecidos sugere um potencial ponto de intervenção farmacológica em diversas desordens inflamatórias (LI; ZUO; TANG, 2018).

Através da modulação dos níveis de AMPc, a PDE4 regula a resposta de leucócitos incluindo ações pró-inflamatórias de monócitos, células T, eosinófilos e mastócitos. Além de regular a contração do músculo liso das vias aéreas e vasculares, e a sinalização de neurotransmissores (ZUO *et al.*, 2019). A teofilina é um inibidor não seletivo da PDE, utilizado no tratamento da asma e da DPOC. A inibição indiscriminada de enzimas PDEs leva ao aumento dos níveis de AMPc e GMPc em vários órgãos e tecidos incluindo: pulmão, rins, cérebro, coração, pâncreas e fígado, resultando em uma gama de efeitos adversos (DEVEREUX *et al.*, 2015).

O campo da terapia biológica tem crescido nas últimas duas décadas com abordagens distintas e altamente seletivas. Esses agentes agem sistemicamente influenciando a imunopatogênese da asma, em vez de tratar as consequências da inflamação e do broncoespasmo, como os tratamentos convencionais (McCRACKEN *et al.*, 2017).

Agentes biológicos para o tratamento da asma fornecem terapia direcionada para pacientes com fenótipos específicos de asma. Atualmente, o omalizumab (anticorpo anti-IgE humanizado) (BUSSE *et al.*, 2001), o mepolizumab (anticorpo monoclonal humanizado antagonista de IL-5) (CADA; BINDLER; BAKER, 2016) e o reslizumab (anticorpo monoclonal humanizado IL-5 alternativo que interrompe a maturação dos eosinófilos) (CASTRO *et al.*, 2015) são os únicos anticorpos monoclonais aprovados pela FDA disponíveis para o tratamento da asma.

Apesar de apresentar benefícios na redução das exacerbações, da redução da sobrecarga de esteróides e do potencial de redução da utilização de serviços de saúde, os custos muito elevados relacionados a esses agentes são significativos (McCRACKEN; TRIPPLE; CALHOUN, 2016).

Termoplastia brônquica, um procedimento aprovado em 2010 para asma. Utilizando energia térmica de radiofrequência, visa reduzir a massa muscular lisa das vias aéreas. Os mecanismos exatos pelos quais esse procedimento afeta a patogênese ainda não estão definidos, estudos são necessários para elucidar os mecanismos subjacentes que resultam nessas melhorias (LAXMANAN; HOGARTH, 2015). Ensaio por períodos estendidos não foram rigorosamente controlados, de modo que as evidências de benefício a longo prazo são limitadas (WECHSLER *et al.*, 2013).

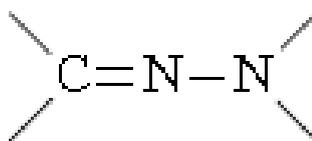
Apesar de os tratamentos disponíveis no mercado serem efetivos no controle de doenças respiratórias, uma pequena proporção de pacientes não responde favoravelmente mesmo a doses elevadas dessas substâncias (BARNES, 2011). Individualmente e coletivamente, a inflamação pulmonar, hiperresponsividade brônquica e a broncoconstrição podem produzir alterações estruturais das vias

respiratórias de aumento da massa muscular lisa, espessamento lâmina reticular e hipertrofia das glândulas mucosas, coletivamente conhecidas como remodelamento das vias aéreas. Não foi provado que qualquer terapia de asma reduz ou elimina esta remodelação (McCRACKEN *et al.*, 2017).

2.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS ACILHIDRAZÔNAS

Na literatura química, as hidrazonas não são habitualmente reconhecidas como formadoras de uma classe diferenciada de compostos orgânicos, sendo frequentemente consideradas como substâncias derivadas de compostos carbonílicos. Substâncias hidrazonas são consideradas moléculas que possuem em sua estrutura uma porção triatômica conforme a apresentada na Figura 8, considerando que esta não pertença a um heterociclo (KITAEV; BUZYKIN, 1972).

Figura 8 - Fragmento triatômico que caracteriza as hidrazonas.



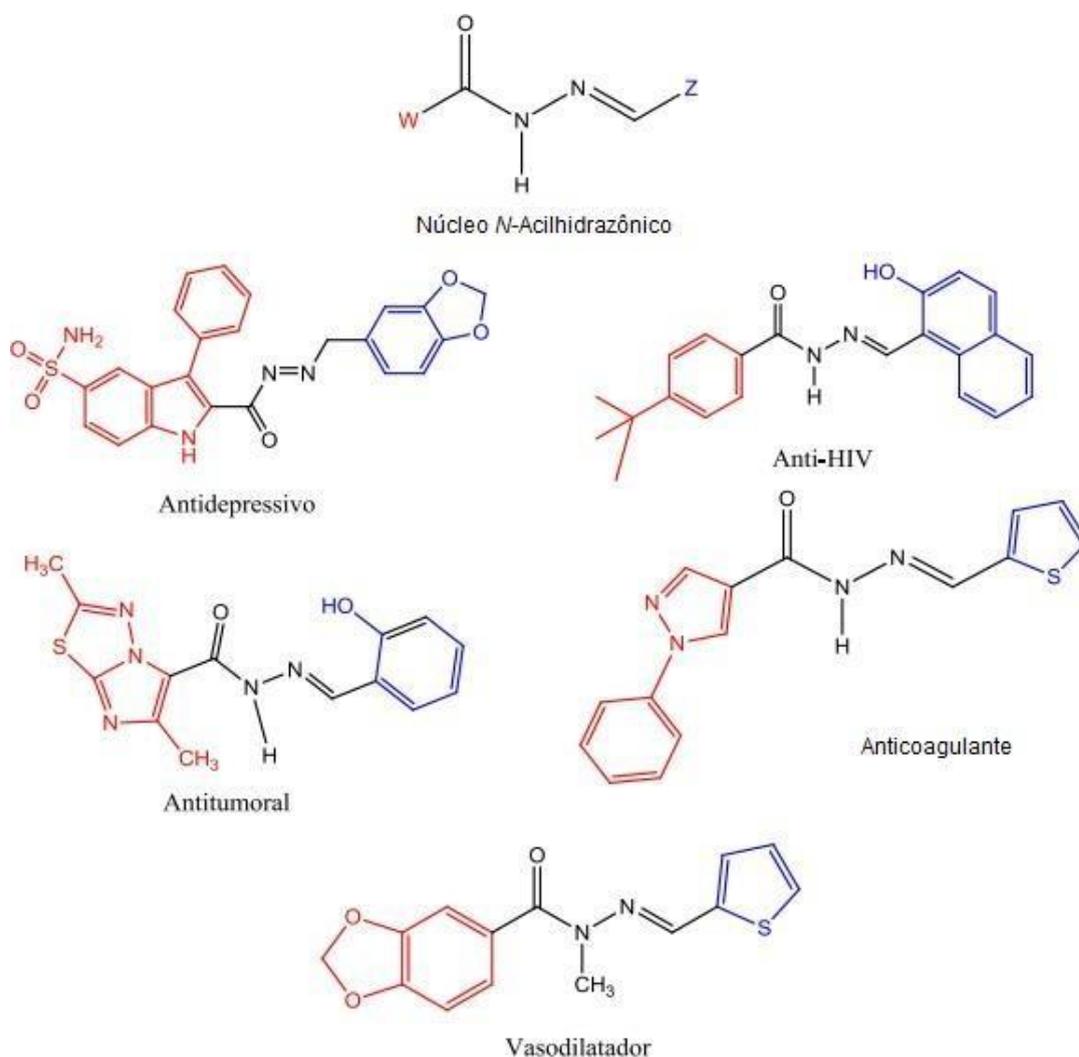
Fonte: KITAEV; BUZYKIN (1972).

Apesar da limitação de que a função C=N-N não pertença a um heterociclo, um dos átomos de nitrogênio ou de carbono pode associar-se a um anel não aromático (KITAEV; BUZYKIN, 1972).

As hidrazonas são substâncias fáceis de serem sintetizadas, sendo resultante da reação de hidrazinas com compostos carbonílicos, em especial aldeídos ou cetonas. Associado a isto, soma-se a elevada reatividade, o que confere às hidrazonas uma ampla aplicabilidade na química sintética, onde são utilizadas como intermediários na síntese de compostos com estruturas diversas, assim como aplicação na química analítica, onde são utilizadas na identificação e no isolamento de compostos carbonílicos, além da detecção de vários cátions metálicos (BARREIRO *et al.*, 2002).

N-acilhidrazona tem sido caracterizada como uma estrutura privilegiada, capaz de fornecer pontos de ligantes para mais do que um tipo de bioreceptor. Modificações das subunidades ligadas às suas funções acil e imina resultaram em várias derivadas, que modulam uma grande diversidade de alvos moleculares (MAIA *et al.*, 2014). A função acilhidrazônica faz parte de uma classe de moléculas que apresentam propriedades anti-inflamatórias, antimicrobiana, anticonvulsivante, analgésica, anticoagulante, antidepressiva, vasodilatadora, dentre outras (Figura 9). O perfil bioativo desta molécula é devido à variação racional das subunidades estruturais da região amídica (W) e imínica (Z) destes compostos (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Figura 9 – Perfis de moléculas bioativas de derivados *N*-Acilhidrazônicos.

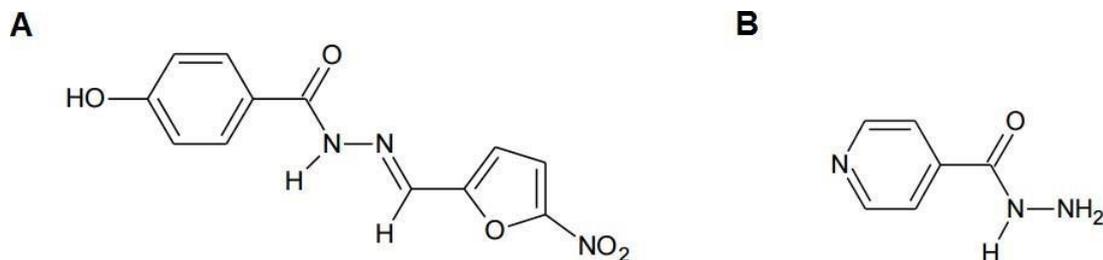


Fonte: BARREIRO; FRAGA (2015).

As hidrazonas foram descobertas por Emil Fischer em 1883, quando o mesmo estava sintetizando um derivado indólico a partir da reação fenil hidrazina com propanona (COSTA *et al.*, 2003). Desde então, esses compostos passaram a ser sintetizados em larga escala por apresentarem ação contra diferentes tipos de patologias (MAIA *et al.*, 2014).

A investigação das hidrazonas como fármacos é frequente. Uma molécula bastante conhecida nestas pesquisas é a nifuroxazida (Figura 10 A), princípio ativo de um medicamento comercial indicado como antisséptico intestinal. Outra hidrazida já comercializada é a isoniazida (Figura 10 B), que tem atividade contra tuberculose pulmonar. Seus derivados de hidrazona estão em estudo e testes *in vivo* tem se mostrado promissores (ROLLAS; KUCUKGUZEL, 2007).

Figura 10 – Compostos bioativos hidrazônicos.



Fonte: ROLLAS; KUCUKGUZEL (2007).

Entre os métodos de descoberta de novos fármacos, a modificação molecular se mostra como uma das técnicas mais promissoras (WERMUTH, 2004). De modo geral, as *N*-acilhidrazonas que têm sido sintetizadas recentemente são análogas a nifuroxazida, por possuírem anéis aromáticos e/ou heteroaromáticos em cada extremo do referido grupamento (KHLEBNIKOV *et al.*, 2008).

Lima *et al.* (2008) demonstraram que a subunidade *N*-acilhidrazona pode afetar a atividade do fármaco por alteração na conformação molecular, necessária para a interação com o receptor alvo.

Muitos estudos têm demonstrado que a presença da subunidade *N*-acilhidrazona confere aos compostos aumento na atividade antiinflamatória. Acredita-se que existe melhor reconhecimento pela COX-1 dessa subunidade e conseqüentemente melhor perfil de inibição da enzima reduzindo a formação de tromboxano A₂. Os mecanismos de ação destes compostos podem envolver a inibição de outras enzimas pró- inflamatórias como a 5-LOX (ABDELGAWAD *et al.*, 2017).

Estudos demonstram que compostos acilhidrazônicos agem como inibidores de PDE4, que indicam efeitos sobre características cruciais da doença, tais como inibição do recrutamento e ativação de células inflamatórias, além de benefícios sobre a função pulmonar em resposta a estímulos variados (KÜMMERLE *et al.*, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2018).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TOXICIDADE AGUDA ORAL

O teste de toxicidade aguda tem por finalidade determinar a capacidade de novas substâncias causarem danos à saúde humana, classificando-as apropriadamente de acordo com seu potencial de letalidade e toxicidade, conforme estabelecido pela legislação (VALADARES, 2006). Uma boa correlação tem sido relatada em estudos toxicológicos entre roedores e humanos. O estudo de toxicidade aguda em animais garante segurança aos seres humanos, evitando que estes sejam submetidos à estudos clínicos com substâncias que já demonstraram toxicidade em contato com o organismo animal (BURDEN; SEWELL; CHAPMAN, 2015).

Os camundongos tratados com os compostos AMH e AMZ-Bz não apresentaram alterações significativas no consumo de água e ração (Tabela 2) na dose de 2000 mg/kg, e o respectivo grupo controle entre o 1° e o 14° dia.

Tabela 2 – Consumos de água e ração pelos animais tratados na dose de 2000 mg/kg com AMH, AMZ-Bz e do grupo controle.

Tratamento	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)
Salina	30,19 ± 0,63	17,51 ± 0,67
AMH	33,07 ± 0,74	19,61 ± 0,18
AMZ-Bz	30,00 ± 1,99	17,71 ± 0,56

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Valores são expressos em média ± desvio padrão, n=6. $p < 0,05^*$ significativamente diferente do grupo controle (avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Tukey com interval de confiança de 95%).

No estudo da toxicidade aguda, todos os animais apresentaram valores entre 0 e 1 (ausente e raro) no *screening* hipocrático, não demonstrando mudanças comportamentais anormais durante o teste, nem foram encontradas alterações macroscópicas nos órgãos indicando baixa toxicidade das moléculas testadas.

A avaliação hipocrática propicia uma estimativa geral de natureza farmacológica e toxicológica de uma substância desconhecida sobre: estado consciente e disposição, reflexos, atividade e coordenação do sistema motor, atividade sobre o sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo (TRAESEL *et al.*, 2014).

Neste experimento não houve morte dos animais até o 14^o dia. De acordo com o Guia 423 (OECD, 2001), em um estudo de toxicidade aguda no qual não ocorra óbito de mais de um dos animais ao ser administrada a dose de 2000 mg/kg, o valor da DL₅₀ pode ser considerado como sendo maior que 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg.

O teste de toxicidade aguda forneceu ainda informações preliminares sobre o modo de ação tóxica e possíveis órgãos onde atuam a substância. Quanto a análise macroscópica dos órgãos dos animais em estudo, apenas o fígado dos animais tratados com AMZ-Bz apresentou alteração de tamanho. Também não houve alterações significativas no peso dos órgãos dos camundongos tratados com AMH e AMZ-Bz (Tabela 3) em relação ao grupo controle.

Tabela 3 - Peso relativo dos órgãos (%) dos animais do grupo controle e tratados com AMH e AMZ-Bz na dose de 2000 mg/kg por via oral após 14 dias.

Orgãos				
Tratamento	Fígado	Rim	Baço	Estômago
Salina	58,10 ± 4,85	7,52 ± 1,57	7,40 ± 1,70	13,67 ± 2,90
AMH	55,38 ± 5,86 ⁺	5,72 ± 0,45	7,30 ± 0,85	10,01 ± 1,69 ⁺
AMZ-Bz	61,28 ± 8,28 ⁺	7,06 ± 1,70	9,32 ± 2,82	15,36 ± 0,88 ⁺

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Valores expressos em média ± desvio padrão da média, n = 6. $p < 0,05$ ⁺ significativamente diferente entre os grupos tratados (avaliada por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%).

Quanto à análise dos parâmetros bioquímicos não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle, exceto com relação à glicose dos animais tratados com AMZ-Bz, que se mostrou aumentada em comparação ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Determinação dos parâmetros bioquímicos no soro de camundongos do grupo controle e tratados com AMH e AMZ-Bz na dose de 2000 mg/kg por via oral após 14 dias.

	Controle	AMH	AMZ-Bz
Ureia (mg/dL)	49,4±9,73	47,4±7,33	53,2 ± 2,86
Creatinina (mg/dL)	0,41±0,03	0,32±0,03	0,40 ± 0,04
TGO (U/L)	184,8±63,3	170,4±34,6	208,6 ± 95,5
TGP (U/L)	45,5±9,50	82,2±23,6	65,8 ± 13,9
F. Alcalina (U/L)	130,4±36,7	136,3±30,2	135,5 ± 12,5
P. Total (g/dL)	5,67±1,12	5,63±0,62	4,98 ± 0,43
Albumina (g/dL)	3,08±0,26	2,68±0,11	2,53 ± 0,20

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Valores expressos em média ± desvio padrão da média, n = 6. $p < 0,05^*$ significativamente diferente do grupo controle. $p < 0,05^+$ significativamente diferente entre os grupos tratados (avaliada por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste de Tukey com interval de confiança de 95%).

Neste estudo, as moléculas apresentaram baixa toxicidade na dose testada, evidenciada pela ausência de alterações comportamentais. Também não ocorreram mortes durante todo o período de observação, não sendo constatadas diferenças significativas nos consumos de água e ração bem como nos órgãos analisados quando comparados ao grupo controle. Estes resultados corroboram com outras análises de toxicidade aguda com derivados hidrazônicos (SOOKVANICHSILP *et al.*, 1991; JAYALAKSHMI; NANJUNDAN, 2008).

A ureia é o metabólito quantitativamente mais importante do catabolismo das proteínas e da desaminação dos aminoácidos. Os níveis séricos da úreia são alterados por diferentes formas de ação. O aumento dos níveis séricos pode estar relacionado com a insuficiência renal aguda (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002). Neste estudo a taxa de creatinina foi analisada por creatinina sérica, sendo um importante indicador da saúde renal porque é um subproduto facilmente medido do metabolismo muscular que é excretado inalterado pelos rins. Filtrada livremente pelos glomérulos, fornece uma avaliação fiel da taxa de filtração glomerular. A creatinina além de avaliar a função renal, é útil para o acompanhamento da evolução da lesão renal e da resposta a terapêuticas (ALLEN, 2012). Quando analisados os grupos no experimento de toxicidade aguda, observou-se que não houve alteração nos níveis de uréia e creatinina, sendo indicativo de não ter ocorrido uma disfunção renal.

TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) são enzimas transaminases (ou aminotransferases) encontradas em diversos órgãos e tecidos, incluindo coração, fígado, músculo esquelético e eritrócitos. TGO está presente no citoplasma e nas mitocôndrias e, portanto, sua elevação indica comprometimento celular. Inúmeras drogas comumente usadas podem elevar os níveis dessa enzima, o que a torna útil na monitoração de terapias com substâncias hepatotóxicas. (STRYER, 2000).

TGP é um marcador mais específico para a lesão hepática que a TGO. Sua origem é citoplasmática e, desta forma, eleva-se rapidamente após lesão no fígado sendo, portanto, um marcador sensível (LEE *et al.*, 2012). Os resultados expressos na Tabela 4 mostram que não houve alterações significativas para os compostos AMH e AMZ-Bz quando comparados ao grupo controle, pois não ocorreu diferença significativa dos níveis dos marcadores bioquímicos em questão. O aumento de níveis apresentado, pode ter ocorrido pela possível presença de artefatos nas amostras após a centrifugação.

A fosfatase alcalina é uma enzima produzida principalmente nos ossos e fígado, mas também, no epitélio intestinal, túbulo renal e placenta. No fígado, a fosfatase alcalina é encontrada nas bordas das células que se unem para formar canais biliares, que drenam a bile do fígado para o intestino, onde é necessário para ajudar na digestão das gorduras. Aumenta, principalmente, na obstrução biliar (BRINGHURST *et al.*, 2011). Similarmente não houve variações significativas nos níveis de fosfatase alcalina avaliados neste estudo.

As proteínas totais são uma análise realizada para avaliar o estado nutricional e para acompanhar doenças renais, neoplasias, enfermidades hepáticas avançadas, casos de desidratação e diferentes processos patológicos. A Albumina representa cerca de 60% das proteínas plasmáticas (PERICLEOUS *et al.*, 2016). A concentração de albumina é resultado de síntese e catabolismo, que são processos complexos e independentes. O fígado é o único órgão capaz de sintetizar a albumina sérica (SANTOS *et al.*, 2004). Com o resultado das proteínas totais e albumina do estudo em questão, verificou-se que não houve diferenças significativamente estatísticas ao comparar com o grupo controle, indicando que não ocorreu lesão no fígado, como já demonstrado com as demais análises bioquímicas.

3.2 PLEURISIA ALÉRGICA INDUZIDA POR OVOALBUMINA

Para avaliar se os compostos acilhidrazônicos apresentam atividade na inflamação pulmonar, foi utilizado o modelo de pleurisia induzido por ovoalbumina (OVA). Camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com AMH e AMZ-BZ apresentaram redução significativa na quantidade de células presentes no lavado pleural (Tabela 5), quando comparados aos animais também sensibilizados e desafiados com OVA, porém, tratados com salina – grupo controle. Também foi avaliado o grupo sadio, onde os animais foram sensibilizados, desafiados e tratados apenas com salina.

Tabela 5 - Total de leucócitos polimorfonucleares e percentual de inibição da inflamação em lavado pleural dos animais no teste de pleurisia induzida por ovoalbumina.

Tratamento	Dose mg/kg	N° de leucócitos/mL (x10 ⁶)	Inibição %
Salina/Sadio		0,94 ± 0,08	-
Salina/Controle	-	4,06 ± 0,2	-
	1	2,76 ± 0,7***	32,0
AMH	10	1,52 ± 0,4****	62,5
	100	1,30 ± 0,2****	67,9
	1	1,58 ± 0,4****	61,0
AMZ-Bz	10	1,56 ± 0,2****	61,5
	100	1,90 ± 0,4****	53,2
Dexametasona	0,5	1,78 ± 0,2****	56,1

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Valores são expressos em média ± desvio padrão, n=5. $p < 0,05^*$ significativamente diferente do grupo controle (avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Tukey com interval de confiança de 95%).

A alergia respiratória é caracterizada pela hiperreatividade das vias aéreas, gerada por mecanismos complexos e desencadeada pelo sistema imunológico resultando na obstrução das vias pulmonares (FLORSHEIM *et al.*, 2015). O modelo de pleurisia induzida por alérgenos é caracterizado principalmente por influxo leucocitário 24 h após a indução, o que permite a análise de mediadores e células inflamatórias. Este modelo também pode ser usado para avaliar a eficácia terapêutica de várias substâncias na inflamação aguda (AGRA *et al.*, 2016).

Estudos anteriores (SOUSA *et al.*, 2009; ZIMECKI *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2015; AGRA *et al.*, 2016) demonstraram que o modelo experimental de inflamação alérgica em camundongos sensibilizados e desafiados pela OVA, é caracterizado pelo recrutamento de eosinófilos para cavidade pleural sendo este teste adequado para investigar mecanismos de tratamento anti-alérgico (BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006).

Os nossos resultados mostraram que os compostos AMH e AMZ-Bz foram capazes de reduzir a quantidade de células polimorfonucleares presentes na cavidade pleural dos animais no modelo de pleurisia induzido por OVA, não apresentando respostas estatisticamente diferentes entre doses de 10 e 100 mg/kg, bem como apresentaram inibição estatisticamente semelhante à dexametasona, demonstrando a capacidade dessas moléculas em interferir no processo de migração celular. Entretanto, para a realização de testes posteriores a dose de 10 mg/kg foi escolhida por ter apresentado a eficácia estatisticamente semelhante à dose de 100 mg/kg, e como dose menor, espera-se que cause menos efeitos colaterais e/ou tóxicos.

3.3 ATIVIDADE MUCOLÍTICA

No tratamento de doenças pulmonares, uma das vertentes é a melhora da depuração mucociliar através da redução da viscosidade e da elasticidade do muco. As principais perspectivas neste sentido mostram uso de irrigações com soluções salinas, de estimulantes mucociliares, e dos muco-reguladores ou expectorantes (FAHY; DICKEY, 2010).

A hipersecreção de muco é uma das características mais importantes das doenças crônicas das vias aéreas. Sob muitos tipos de patogêneses, as células que revestem as vias aéreas secretam numerosos fatores prosecretórios que levam à hipertrofia das células secretoras e à hiperplasia das células caliciformes nas vias aéreas, com superprodução concomitante de muco (SHEN et al., 2018).

A hipersecreção de muco nas vias aéreas pode obstruir o lúmen do trato respiratório, limitar o fluxo de ar e acelerar o declínio da função pulmonar. Ao mesmo tempo, as respostas inflamatórias comprometem a eliminação do muco pelos cílios, removem substâncias ativas superficiais alveolares, como os surfactantes, e alteram as propriedades biofísicas do muco, o que pode levar a infecções recorrentes, causando mais obstrução e remodelação das vias aéreas (TIAN; WEN, 2015; ALLINSON et al., 2016).

A hipersecreção de muco nas vias aéreas manifesta-se clinicamente como tosse crônica e expectoração. O mecanismo de ação expectorante não é totalmente compreendido (SHEN et al., 2018). Neste experimento foram administradas oralmente as substâncias AMH e AMZ-Bz que apresentaram uma maior excreção de vermelho de fenol em comparação para o grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade mucolítica dos grupos controle e tratados com os derivados N-acilhidrazonas AMH e AMZ-Bz.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Densidade óptica (546 nm)	Concentração vermelho de fenol (ug/mL)	Inibição (%)
Controle	-	0,133 ± 0,03	1,20 ± 0,31	-
AMH	10	0,239 ± 0,06	2,20 ± 0,55*	45,6
AMZ-Bz	10	0,354 ± 0,06	3,30 ± 0,58***	63,8
Ambroxol	5	0,610 ± 0,11	5,82 ± 1,06****	79,5

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Valores são expressos em média ± desvio padrão, n=5. $p < 0,05$ * significativamente diferente entre os grupos tratados com ambroxol e os compostos em estudo (avaliada por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste de Tukey com interval de confiança de 95%).

A atividade secretagoga de algumas drogas é parcialmente mediada pela estimulação do reflexo vagal iniciado pela estimulação da mucosa gástrica após administração oral (ALVES et al., 2014).

Em muitos mecanismos relacionados com a atividade mucolítica, os expectorantes atuam por redução da viscosidade do muco, promoção da secreção dos fluidos do trato respiratório e normalização do muco traqueal (ALBRECHT; DICPINIGAITIS; GUENIN, 2017).

A secreção de escarro é benéfica pela deflogisticação da traquéia e alívio da tosse. Drogas expectorantes geralmente diluem ou aumentam a capacidade de expulsão do muco nas vias respiratórias para que possa ser expectorado facilmente com o movimento ciliar (HAN *et al.*, 2010).

Atualmente, as doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas, são tratadas principalmente por meio de broncodilatadores para abertura de vias aéreas obstruídas ou pela inalação de corticosteroides para controle da inflamação. Dado o importante significado clínico da hipersecreção de muco em doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas, a terapia expectorante é amplamente utilizada para ajudar a aliviar a estenose das vias aéreas, evitar infecções e exacerbações recorrentes e retardar o declínio da função pulmonar (SHEN *et al.*, 2018).

O ambroxol é o agente procinético mais utilizado na clínica. Ele pode estimular a produção de surfactante no trato respiratório, regular a secreção de fluidos serosos e mucosos, melhorar a depuração de muco nas áreas ciliadas e não-ciliadas do trato respiratório e facilitar a expectoração (MALERBA; RAGNOLI, 2008). Estudos em animais e em humanos demonstraram sua capacidade de modulação da produção e da viscosidade do muco, e de aumentar o transporte mucociliar (PALEARI *et al.*, 2011).

Os dois compostos estudados neste trabalho foram avaliados frente a sua capacidade de modular a quantidade de secreção das vias aéreas. Os compostos AMH e AMZ-Bz apresentaram atividade expectorante de 45,6% e 63,8%, respectivamente, indicada por um aumento da excreção do vermelho de fenol pela via respiratória quando comparados ao grupo controle. O fármaco padrão, ambroxol, aumentou a expectoração do vermelho de fenol em 79,5%.

O teste de atividade mucolítica baseia-se na administração, por via intraperitoneal, do vermelho de fenol que em parte é absorvido sistemicamente e então, excretado nas vias respiratórias onde pode ser coletado e quantificado. Este método oferece a vantagem de avaliar a função secretora do sistema respiratório como um todo. Foi mostrado que a concentração de vermelho fenol no fluido do trato respiratório é capaz de agir como um marcador para secreção de mucina e água, e que esta secreção pode ser influenciada pela administração de vários fármacos com atividade expectorante (LOCK; CARLSON; CARRIER, 2018).

Esse modelo de experimentação animal é copiosamente utilizado para avaliação da atividade de um potencial candidato à medicamento expectorante (GUO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011; CHAKRABORTY *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2014).

Os derivados estudados apresentaram significativa atividade mucolítica, aumentando o volume das secreções respiratórias, que indica que a ação expectorante pode estar relacionada a sua capacidade de aumentar a secreção de muco traqueobrônquico e, assim, diminuir a viscosidade do muco.

3.4 MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA

No protocolo de asma alérgica experimental induzida por OVA, os animais tratados na dose de 10 mg/kg com AMH e AMZ-Bz apresentaram redução significativa no número de células totais, quando comparados ao grupo Salina/Controle (Tabela 7).

Tabela 7 - Total de leucócitos polimorfonucleares e percentual de inibição da inflamação em lavado broncoalveolar no teste de asma alérgica induzida por ovalbumina.

Tratamento	Dose mg/kg	N° de leucócitos/mL (x10 ⁶)	Inibição %
Salina/Sadio	-	0,56 ± 0,1	-
Salina/Controle	-	5,43 ± 0,8	-
AMH	10	1,46 ± 0,5***	73,1
AMZ-Bz	10	1,64 ± 0,4***	69,8
Montelucaste	10	1,80 ± 0,6***	66,8
Dexametasona	0,5	1,60 ± 0,6***	70,5

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Valores são expressos em média ± desvio padrão, n=5. $p < 0,05^*$ significativamente diferente do grupo controle (avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%).

Modelos experimentais murinos que mimetizam asma alérgica têm fornecido novas oportunidades para se estudar a patogênese dessa doença e o desenvolvimento de novas terapias (PACÍFICO *et al.*, 2009).

Embora modelos animais nem sempre reproduzam todos os sintomas da doença no homem, alguns estudos experimentais desenvolvem síndromes que remetem proximamente à asma alérgica, caracterizada pela inflamação dos pulmões, elevada presença de quimiocinas e citocinas, aumento da secreção de IgE, hipersecreção de muco, e eventualmente, remodelamento das vias aéreas. Esses modelos são considerados bons sistemas para teste de novos tratamentos de atopias (WU *et al.*, 2006). O modelo da asma alérgica em BALB/c mostrou-se eficiente para o estudo desses aspectos (PACÍFICO *et al.*, 2009).

Durante a resposta alérgica, ocorre uma intensa migração de células inflamatórias para o pulmão (ERPENBECK *et al.*, 2003). Dado o grande número de eosinófilos encontrado nas vias aéreas de pessoas com asma leve, e verificado por dados em experimentos de modelos murinos, a asma foi por muito tempo considerada uma patologia coordenada por células Th2. Sabe-se agora que algumas inflamações asmáticas são neutrofílicas, controladas pelo subconjunto Th17 de células T auxiliares, e que algumas inflamações eosinofílicas são controladas por células linfoides inatas tipo 2 (células ILC2) agindo em conjunto com basófilos (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

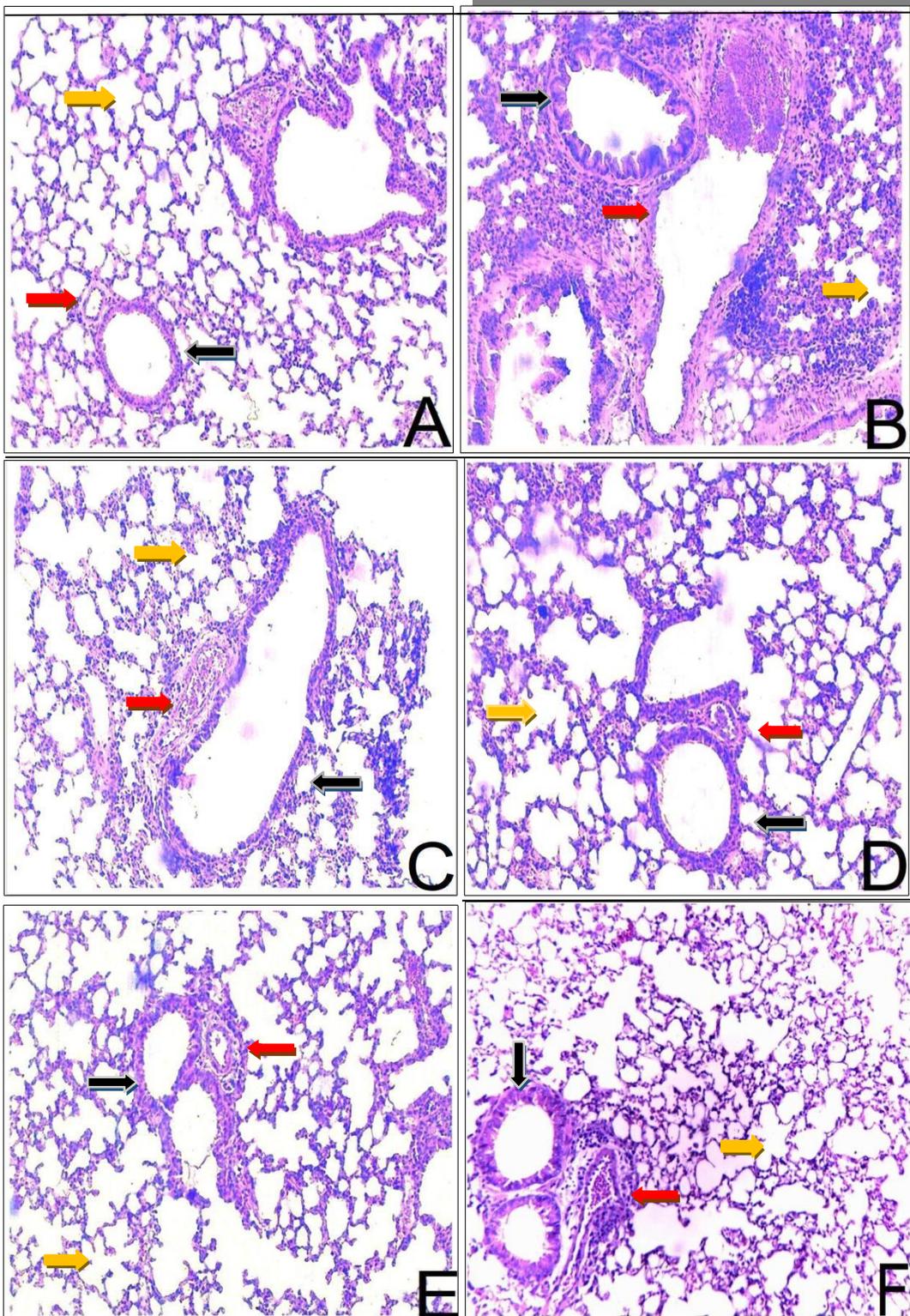
O lavado brônquio-alveolar foi realizado para verificar a presença dessas células e, na contagem de células totais, o grupo controle apresentou uma quantidade muito maior de leucócitos em comparação aos grupos tratados com as substâncias em teste, mostrando que estes compostos diminuem significativamente a inflamação dos pulmões.

Inflamação e alterações estruturais nas pequenas vias aéreas representam uma característica importante deste modelo, uma vez que vários estudos publicados têm apontado o papel das pequenas vias aéreas na patogênese da asma brônquica (TULIC; CHRISTODOULOPOULOS; HAMID, 2001; LAHZAMI; KING, 2008; BJERMER, 2014; USMANI *et al.*, 2016). Em pacientes com asma grave, várias alterações histológicas importantes nas vias aéreas têm sido observadas: infiltração com leucócitos na parede da via aérea e nos espaços aéreos distais, tamponamento do muco e hipertrofia do músculo liso (BAI; KNIGHT, 2005).

3.4.1 Análise histológica das amostras do tecido pulmonar dos animais submetidos ao modelo de asma experimental induzida por ovoalbumina

A quantidade de infiltrado celular nas vias aéreas correlaciona-se com a extensão da inflamação no parênquima do pulmão (EPSTEIN, 2004). Os cortes histológicos apresentados na Figura 11 mostram que o tecido pulmonar de animais dos grupos tratados com AMH e AMZ-Bz apresentaram menor infiltrado leucocitário quando comparado ao grupo controle. Esse fato se mostra de acordo com os resultados anteriormente mencionados.

Figura 11 – Fotomicrografias do pulmão de camundongos tratados com derivados acilhidrazônicos AMH e AMZ-Bz sobre as mudanças histopatológicas do tecido pulmonar em modelo de asma experimental induzido por ovoalbumina.



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina. (A) grupo sadio: não sensibilizado ou desafiado com OVA; (B) grupo alérgico: sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com salina; (C) grupo alérgico: desafiado com OVA e tratado com dexametasona, 0,5 mg/kg; (D) grupo alérgico: desafiado com OVA e tratado com montelucaste, 10 mg/kg; (E) grupo alérgico: desafiado com OVA e tratado com o derivado acilhidrazônico AMH, 10 mg/kg; (F) grupo alérgico: desafiado com OVA e tratado com o derivado acilhidrazônico AMZ-Bz, 10 mg/kg. Aumento 100X.

(→) saco alvéolar; (→) brônquios; (→) vasos sanguíneos.

Os resultados também mostraram que os animais do grupo sadio exibiram sacos alvéolares íntegros, brônquios e bronquíolos terminais com epitélio de revestimento conservados, tecido conjuntivo mucoso conservado, vasos sanguíneos com endotélio preservado e preservação do tecido epitelial de revestimento. Os camundongos do grupo controle apresentaram aumento da parede epitelial de revestimento e diminuição da luz dos alvéolos, intenso infiltrado leucocitário perivascular e peribronquiolar, basofilia nuclear e não houve preservação do epitélio de revestimento dos alvéolos, brônquios e bronquíolos terminais.

Os camundongos tratados com dexametasona mostraram conservação do tecido epitelial de revestimento, brônquios, bronquíolos e aumento da luz alveolar. O tecido pulmonar do grupo experimental montelucaste indicou aumento da espessura do tecido epitelial alveolar, brônquios, bronquíolos e discreta diminuição da luz alveolar. Os grupos tratados com os compostos AMH e AMZ-Bz apresentaram preservação do tecido epitelial de revestimento, do epitélio de revestimento dos alvéolos, brônquios, bronquíolos terminais e aumento da luz alveolar.

Um dos objetivos na terapêutica da asma é reduzir a resposta inflamatória, diminuindo a concentração de células induzidas por alérgenos para as vias aéreas, responsáveis em manter a resposta alérgica. Associada a essa ação antiinflamatória o tratamento da asma necessita reverter a broncoconstrição, restabelecendo a função pulmonar prejudicada (KAWAI *et al.*, 2007). Resultante da sensibilização a alérgenos específicos, diversas células, citocinas e mediadores inflamatórios participam da resposta imune e da inflamação tecidual. A presença e atividade de eosinófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos Th2 nas vias aéreas são características da doença (McBRIEN; MENZIES-GOW, 2017).

O acúmulo de células inflamatórias, o exsudato, o aumento da musculatura lisa pulmonar e a hiperplasia epitelial contribuem para o estreitamento da luz das vias aéreas, que parece ser à base da diminuição do fluxo de ar, característico da broncoconstrição em asmáticos. O epitélio respiratório tem sido reconhecido por ser a primeira barreira de proteção contra estímulos irritantes. A perda morfofuncional desta barreira pode ser o papel chave da hiperreatividade, por permitir um acesso amplo a estímulos broncoconstritores da árvore brônquica (REIS; CRUZ, 2013).

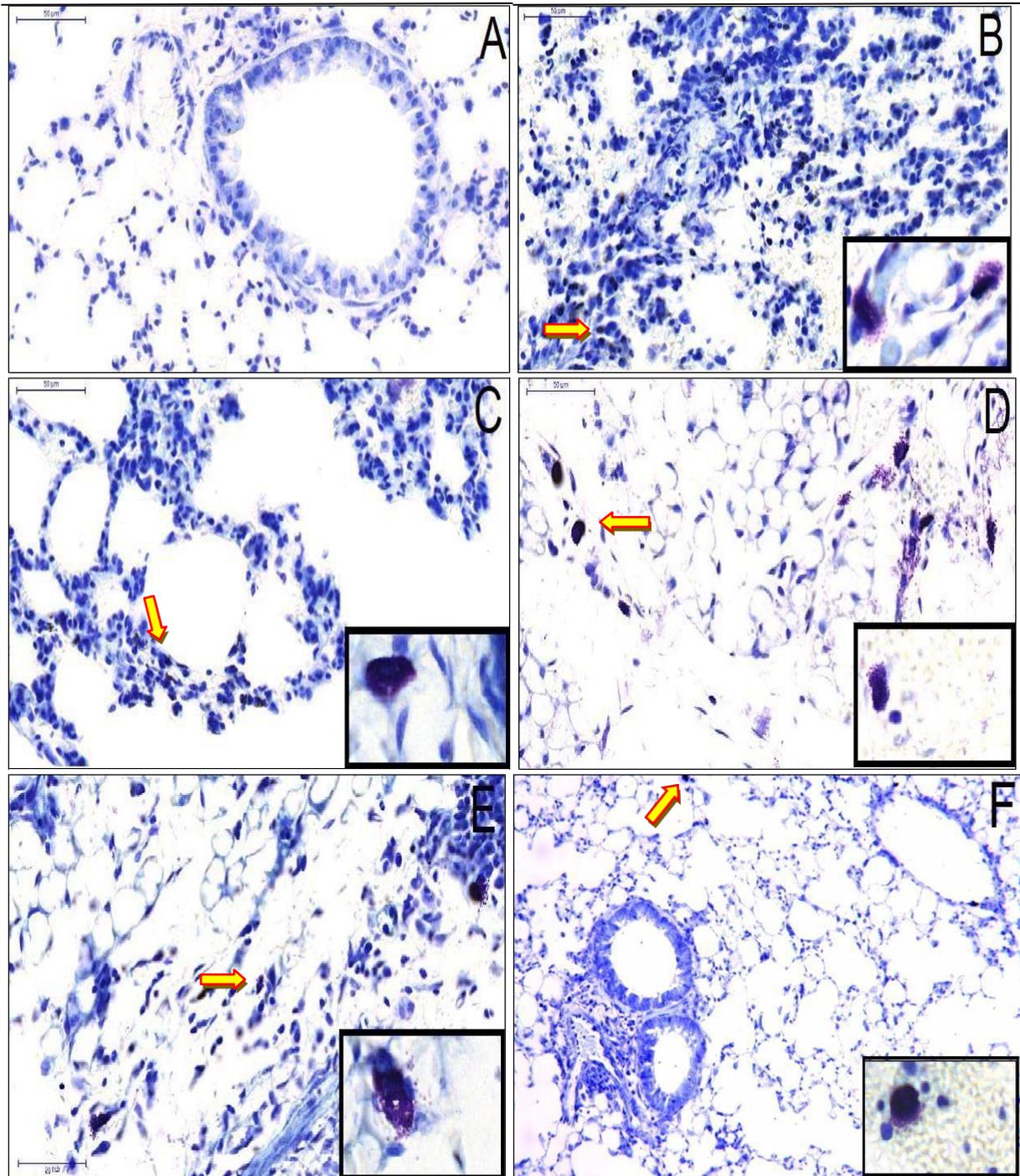
Dados da literatura mostram que derivados acilhidrazônicos diminuíram a broncoconstrição e a hiperreatividade brônquica em camundongos sensibilizados com OVA (CARDOZO, 2014; CERQUEIRA, 2017). Corroborando com os resultados encontrados no nosso estudo. Apesar do mecanismo responsável pelo desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas ainda parecer bastante controverso, onde alguns trabalhos demonstraram que, com o infiltrado inflamatório observa-se hiperreatividade brônquica frente ao alérgeno (NAKAJIMA *et al.*, 1992; KIPS *et al.*, 1995; FOSTER *et al.*, 1996; HAMELMANN *et al.*, 1997; MATTES *et al.*, 2002).

Assim como na doença humana, após exposição por via inalatória de antígeno específico, os camundongos desenvolvem uma fase imediata dependente da desgranulação de mastócitos (HALL; AGRAWAL, 2014). Após a desgranulação, o mastócito causa dano epitelial, aumento da propagação inflamatória e é considerado o principal responsável pelo processo flogístico persistente na via aérea do asmático (HOLGATE, 2012).

Em etapa posterior foi realizada a coloração do tecido pulmonar com Azul de Toluidina para estimar o número de mastócitos metacromáticos. Através desta coloração específica foi possível quantificar os mastócitos de acordo com a sua integridade morfológica.

A análise dos cortes histológicos (Figura 12) indicou que os animais do grupo sadio não apresentaram mastócitos no parênquima pulmonar. No grupo controle os mastócitos apresentam alta porcentagem de células intactas. Houve uma diminuição significativa da quantidade média de mastócitos no pulmão dos animais alérgicos em todos os demais grupos tratados quando comparados ao grupo controle. Foram encontrados mastócitos desgranulados em todos os grupos de animais sensibilizados com OVA, porém, estes não foram considerados na análise quantitativa destas células.

Figura 12 – Fotomicrografias de mastócitos metacromáticos do parênquima pulmonar de camundongos tratados com derivados acilhidrazônicos em modelo de asma experimental induzido por ovoalbumina.



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Os tecidos foram corados com Azul de Toluidina. (A) grupo sadio: não sensibilizado ou desafiado com OVA; (B) grupo alérgico: sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com salina; (C) grupo alérgico: desafiado com OVA e tratado com dexametasona, 0,5 mg/kg; (D) grupo alérgico: desafiado com OVA e tratado com montelucaste, 10 mg/kg; (E) grupo alérgico: desafiado com OVA e tratado com o derivado acilhidrazônico AMH, 10 mg/kg; (F) grupo alérgico: desafiado com OVA e tratado com o derivado acilhidrazônico AMZ-Bz, 10 mg/kg. Aumento 40X.

(→) mastócitos no tecido pulmonar evidenciando grânulos metacromáticos no citoplasma.

A densidade de mastócitos (Tabela 8) nos tecidos é tema divergente. Esta divergência de resultados pode ser explicada pelo fato de doenças inflamatórias apresentarem diferentes estágios de evolução. Sugere-se que os mastócitos estejam participando ativamente no processo de defesa e inflamação nos tecidos, justificando sua presença em maior quantidade no grupo controle (OVA). Esta afirmativa coincide com as afirmações de STEINSVOLL *et al.*, (2004) ao relatarem que os mastócitos são conhecidos pelo seu papel nos processos inflamatórios e que são capazes de fagocitar, processar e apresentar antígenos tão efetivamente quanto os macrófagos.

Tabela 8 – Média dos valores absolutos do número total de mastócitos do tecido pulmonar de camundongos Balb/c no modelo de asma experimental induzido por ovoalbumina.

Tratamento	Dose mg/kg	Nº de mastócitos (células/m ²)	Inibição %
Salina/Sadio	-	02 ± 0,7	-
Salina/Controle	-	393 ± 22,4	-
AMH	10	112 ± 10,3****	71,3
AMZ-Bz	10	83 ± 15,1****	78,9
Montelucaste	10	171 ± 13,6***	56,4
Dexametasona	0,5	139 ± 12,2****	64,4

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Valores são expressos em média ± erro padrão, n=5. $p < 0,05^*$ e significativamente diferente do grupo controle (avaliada por análise do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn com interval de confiança de 95%).

O número de mastócitos aumentou significativamente no tecido pulmonar de camundongos BALB/c induzidos por OVA sem tratamento específico, no estudo que comparava diferentes linhagens de camundongos comumente usados para estudar a reação asmática induzida, mostrando que essa linhagem é propensa a resposta imunológica induzida por Th2 (GUEDERS, 2009), corroborando com os resultados de nosso estudo. De acordo com Reber e Fahy (2016), a terapia antialérgica específica diminui o recrutamento de mastócitos. Estudos prévios do número de mastócitos nas vias aéreas mostraram que, comparados com casos controle, aqueles que se submetem ao tratamento da asma têm o número de mastócitos diminuído (BENTLEY, 1996; JAMES *et al.*, 2012).

Os mastócitos apresentam também o potencial de influenciar as células vizinhas, através do conteúdo de seus grânulos, resultando em efeito inibitório, tóxico ou estimulador (KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016). Oliveira Junior *et al.* (2016) demonstraram que a inibição da desgranulação de mastócitos impede a liberação de histamina, leucotrienos e prostaglandinas. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados em biópsias

brônquicas e lavado brônquico de pacientes com asma alérgica (BRANNAN *et al.*, 2006; RAM; MAKHIJA; SHREEDHARA, 2013).

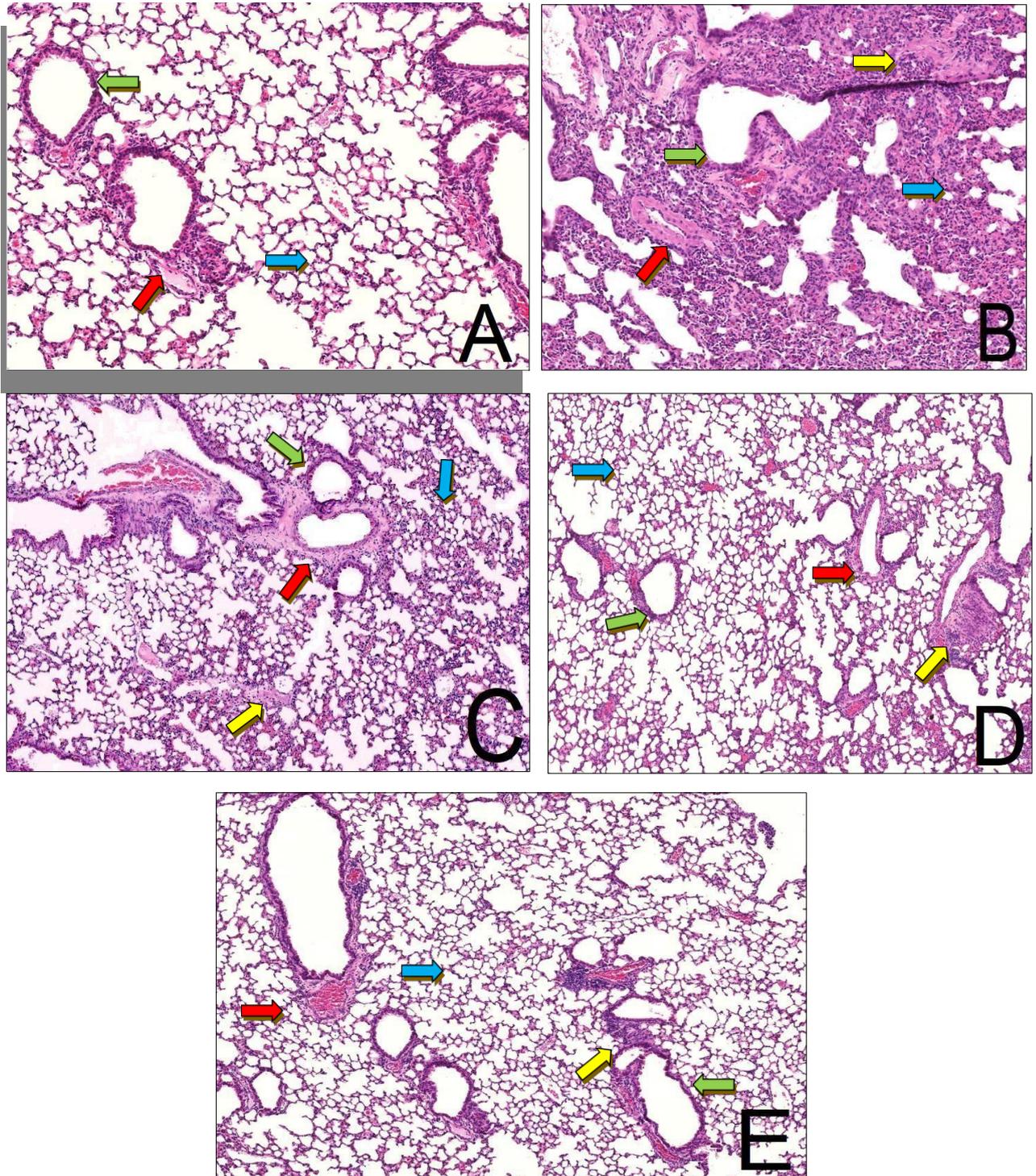
A análise histopatológica no presente estudo, corroborou com os dados anteriormente relatados, visto que os animais alérgicos tratados com os fármacos padrão e os compostos AMH e AMZ-Bz diminuíram a de migração celular tanto para leucócitos (coloração em H/E), como na contagem de mastócitos feita a partir do método de Azul de Toluidina. O tamanho da amostra e a contagem dos mastócitos manualmente podem ser limitações deste estudo. Entretanto, a contagem automatizada também apresenta limitações, visto que podem ser consideradas como mastócitos outras estruturas pigmentadas, mesmo que não seja uma célula.

Estudos sugerem que os mastócitos podem ter participação na degradação tecidual visto que eles expressam alguns tipos de metaloproteinases da matriz (MMPs) (SEGUIER; GODEAU; BROUSSE, 2000; XU *et al.*, 2017), liberam histamina, a qual promove edema, estimula o encurtamento do músculo liso e a vasodilatação, favorecendo a penetração de células inflamatórias no tecido (RANG *et al.*, 2004; LAGDIVE *et al.*, 2013). As proteases liberadas durante a degranulação, como a triptase, podem ativar MMPs e participar da destruição dos tecidos (KORNMAN; VAN DYKE, 2008; LAGDIVE *et al.*, 2013), mostrando que os mastócitos não são apenas meras células efetoras durante as reações alérgicas, mas também têm um papel complexo na indução e regulação das respostas imunes adaptativas (REUTER, 2010).

3.5 MODELO DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDO POR BLEOMICINA

Neste estudo, foi utilizado o modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, considerado o melhor modelo murino caracterizado atualmente. Na análise macroscópica dos pulmões foram observadas alterações características de fibrose nos animais do grupo controle (fibrose induzida, tratados com salina), tais como: regiões compactas, de consistência firme e de coloração branco-avermelhada sugestivas de fibrose na superfície pulmonar. Essas alterações não foram observadas nos animais com fibrose e tratados com os compostos acilhidrazônicos (FIGURA 13).

Figura 13 - Análise morfológica do tecido pulmonar de animais tratados com os derivados acilhidrazônicos.



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Fotomicrografias representativas de secções do tecido pulmonar de camundongos desafiados com salina estéril (A), desafiados com bleomicina 5 mg/kg e tratados com salina (B), desafiados com bleomicina 5 mg/kg e tratados com dexametasona 0,5 mg/kg (C), desafiados com bleomicina 5 mg/kg e tratados com AMH 10 mg/kg (D), desafiados com bleomicina 5 mg/kg e tratados com AMZ-Bz 10 mg/kg (E). Os cortes histológicos foram processados e corados com hematoxilina e eosina e as imagens foram capturadas e analisadas em microscópio óptico de campo claro (LX400 Labomed). Aumento 100 X.

(→) formação de fibrose intersticial; (→) alvéolos; (→) brônquios; (→) vasos sanguíneos.

A fibrose pulmonar em humanos induzida por bleomicina é caracterizada por lesões de células epiteliais alveolares, hiperplasia de pneumócitos tipo II, o acúmulo de fibroblastos e miofibroblastos, e a deposição de proteínas da matriz extracelular, resultando em perda progressiva da arquitetura pulmonar normal e comprometimento na troca gasosa (MOORE; HOGABOAM, 2007).

A administração de bleomicina resulta em estresse oxidativo e inflamação aguda com o subsequente aparecimento de fibrose pulmonar (MOELLER *et al.*, 2008). Diversas características histológicas do modelo da bleomicina são semelhantes às da fibrose pulmonar idiopática, incluindo lesão de células epiteliais com hiperplasia reativa, dano à membrana basal, aglomerados de células mesenquimais fusiformes semelhantes a focos fibroblásticos e fibrose intersticial e intra-alveolar (SCHAEFER *et al.*, 2011).

Existem diferentes vias de administração de bleomicina, neste estudo foi utilizada uma única instilação intranasal desta molécula. A presença de fibrose pulmonar induzida por bleomicina foi confirmada macroscopicamente e microscopicamente.

As análises histopatológicas de secções de tecido pulmonar coradas com hematoxilina-eosina mostraram que os pulmões de animais do grupo sadio (fibrose não induzida) apresentaram características de tecido pulmonar saudável, como brônquios, bronquíolos e alvéolos revestidos por epitélio típicos e conservados, vasos sanguíneos de aspectos normais e ausência de foco fibrótico ou infiltrados inflamatórios (Figura 14 A). No grupo controle salina (fibrose induzida, tratados com salina) apresentaram características próprias de tecido fibrótico, assim como destruição da arquitetura de alvéolos, brônquios e bronquíolos, aumento do epitélio de revestimento e conseqüentemente diminuição do lúmen dessas estruturas, além de alta frequência de infiltrados inflamatórios (Figura 14 B). Já no grupo dexametasona (fibrose induzida, tratados com dexametasona) foi observado redução de massa fibrótica, apresentando apenas focos isolados, semelhantes aos descritos no grupo controle salina, no entanto, grande parte da amostra manteve conservada a arquitetura dos brônquios, bronquíolos e alvéolos (Figura 14 C). Nos grupos tratados (fibrose induzida, tratados com os derivados AMH e AMZ-Bz) foi observada redução dos focos de fibrose e infiltrados inflamatórios, com maior atividade no grupo tratado com AMZ-Bz, apresentando características semelhantes ao grupo tratado com dexametasona (Figuras 14 D e E).

Contudo, a fibrose no modelo da bleomicina tem várias diferenças fundamentais em relação à doença humana, incluindo a reversibilidade parcial, o rápido início e progressão em resposta a uma lesão bem definida. Além disso, as variações do modelo de indução apresentam diferenças importantes. Doses únicas de bleomicina induzem lesões sub-crônicas, mas múltiplas administrações deste medicamento resultam em uma fibrose mais duradoura. Já a instilação intratraqueal de bleomicina, resulta em uma distribuição broncoquiliocêntrica da fibrose, enquanto a administração sistêmica (intravenosa ou intraperitoneal), resulta em uma fibrose subpleural que é mais semelhante àquela observada em fibrose pulmonar idiopática (CHUA *et al.*, 2005).

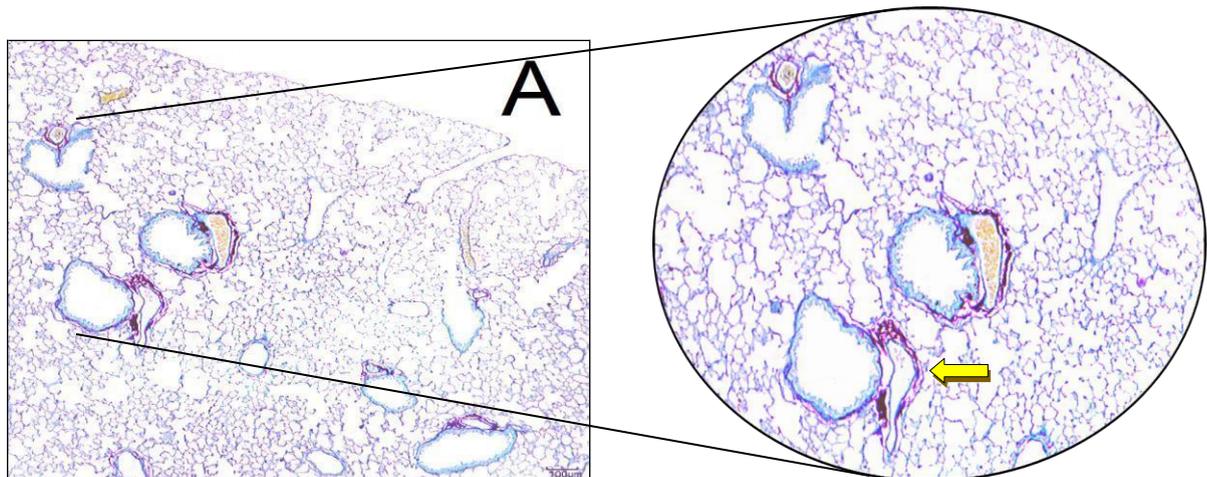
O modelo de fibrose pulmonar induzido por bleomicina é caracterizado por infiltração maciça de células inflamatórias, proliferação excessivamente intensificada de fibroblastos, hiperreatividade e aumento da deposição de colágeno (GAO *et al.*, 2015; IMPELLIZZERI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2016). Este tem sido usado como um modelo clássico para a avaliação do efeito antifibrótico de potenciais compostos candidatos à fármacos (TANAKA *et al.*, 2010). Além disso, devido ao mecanismo patológico pouco claro e alta letalidade da fibrose pulmonar, novos agentes potentes são urgentemente necessários.

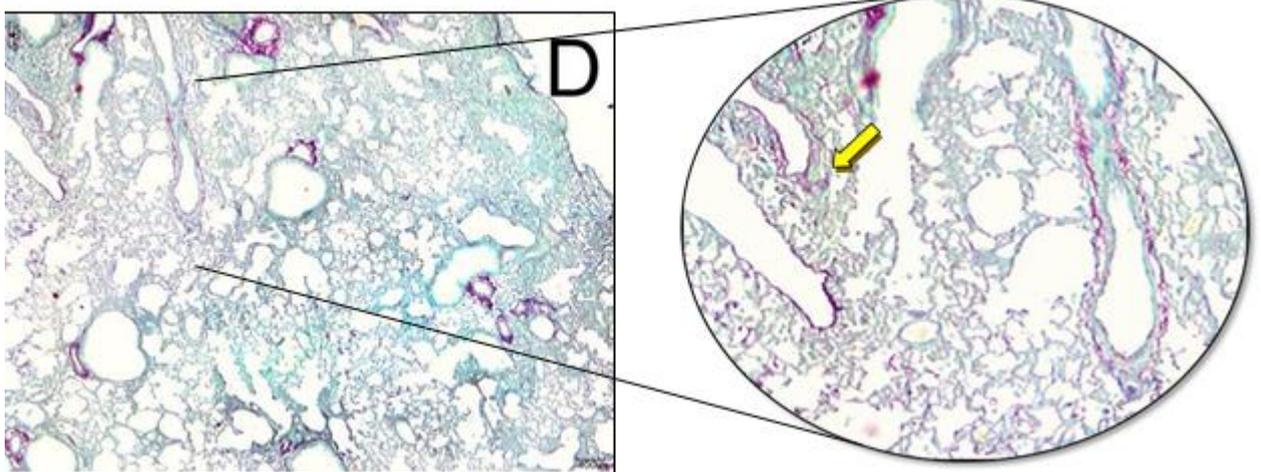
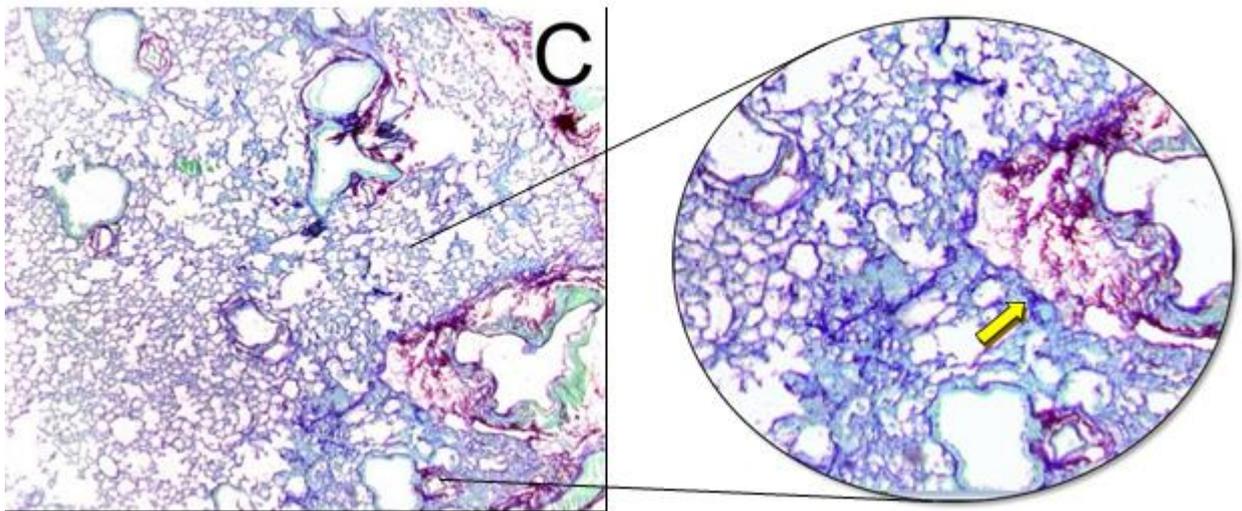
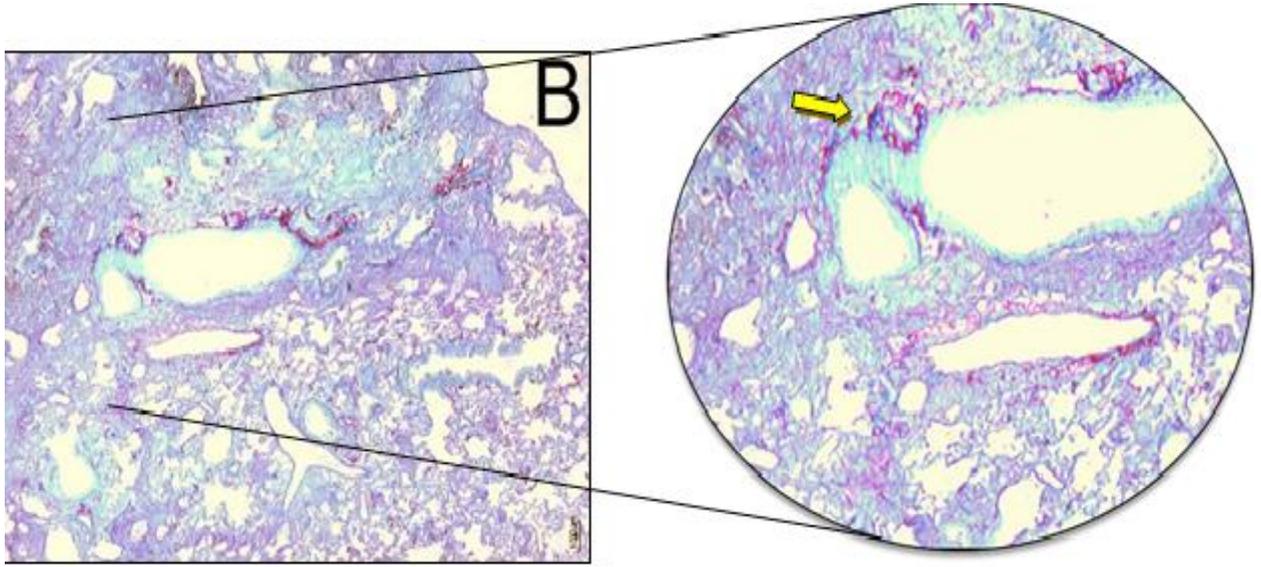
A injeção de bleomicina também pode levar a respostas orquestradas em parte por neutrófilos e macrófagos e acompanhada pelo acúmulo de líquido nos pulmões. Estas células inflamatórias ativadas migrarão para os focos inflamatórios onde aumentarão a atividade da mieloperoxidase, liberando citocinas inflamatórias e perturbando o processo de reparação que contribuiria para reduzir os processos fibróticos induzidos pela bleomicina (WANG *et al.*, 2016).

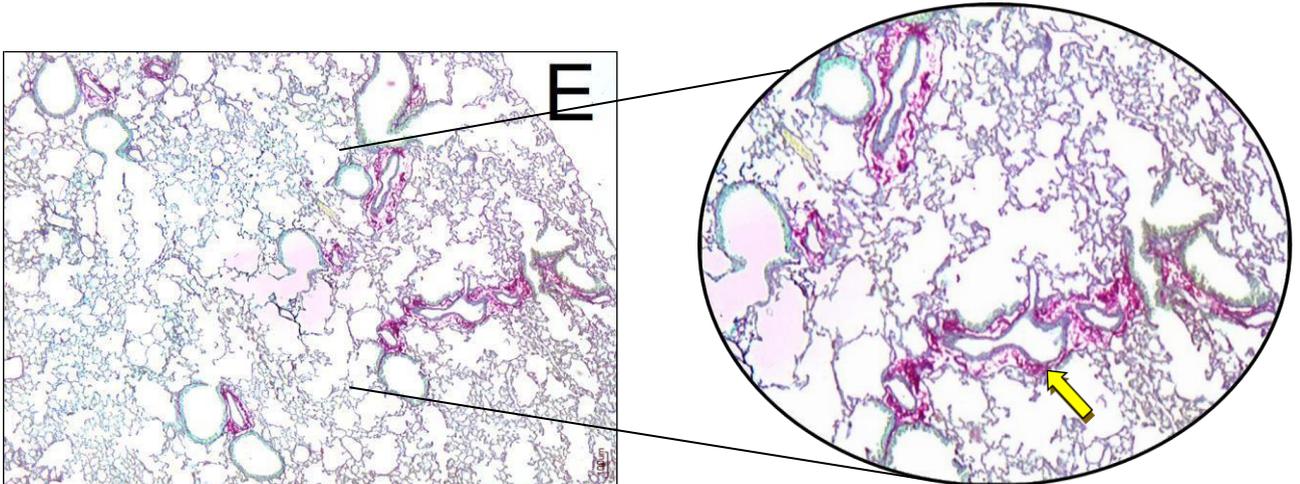
Os resultados mostraram que houve intensa migração leucocitária no grupo controle, sendo este infiltrado celular reduzido nos grupos tratados. A fibrose pulmonar induzida por bleomicina causou perda de peso corporal e anomalias histopatológicas pulmonares exacerbadas nos animais tratados com salina. No entanto, essas conseqüências adversas causadas pela bleomicina foram atenuadas eficazmente pela dexametasona e derivados acilhidrazônicos. Além disso, as substâncias foram administradas por via oral neste estudo e não foram observados efeitos tóxicos após a sua administração.

Estudos anteriores vêm descrevendo promissores compostos anti-fibróticos por apresentarem, em análise histológica, a redução de focos de fibrose (redução de anormalidades, depósito de colágeno pulmonar e células inflamatórias) (YOU *et al.*, 2015; XIANG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016). Com base nesses estudos, analisamos a distribuição de fibras colágenas presentes no tecido pulmonar de camundongos (Figura 14), visando enfatizá-las.

Figura 14 - Fotomicrografia do tecido pulmonar de animais tratados com os derivados acilhidrazônicos mostrando a disposição das fibras colágenas.







Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Fotomicrografias representativas de secções do tecido pulmonar de camundongos desafiados com salina estéril (A), desafiados com bleomicina 5 mg/kg e tratados com salina (B), desafiados com bleomicina 5 mg/kg e tratados com dexametasona 0,5 mg/kg (C), desafiados com bleomicina 5 mg/kg e tratados com AMH 10 mg/kg (D), desafiados com bleomicina 5 mg/kg e tratados com AMZ-Bz 10 mg/kg (E). Os cortes histológicos foram processados e corados com *Picrosirius Red* e as imagens foram capturadas e analisadas em microscópio óptico de campo claro (LX400 Labomed). Aumento 100 X.

(⇒) formação de fibrose intersticial.

Diversos autores já utilizaram deste modelo para indução de fibrose pulmonar (SHI *et al.*, 2014; ASKER *et al.*, 2015; SEO *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017; LV *et al.*, 2017), desse modo, o qualifica seguro para indução e estudos de fibrose pulmonar.

Na fibrose, múltiplos locais de lesão epitelial alveolar são substituídos por focos de proliferação fibroblástica e de diferenciação em miofibroblastos com deposição exuberante de matriz extracelular, destruição das unidades alvéolos-capilares e diminuição ou perda da função do órgão (IWANO *et al.*, 2002; GEISER, 2003).

A análise demonstrou que o tecido pulmonar do grupo sadio permaneceu íntegro e com suas características morfológicas preservadas, entretanto todos os grupos experimentais apresentaram diferenças significativas na quantidade de colágeno quando comparados ao grupo controle. O aumento da deposição de fibras colágenas pulmonares nos animais do grupo controle sugere maior remodelamento pulmonar. Estas alterações provavelmente contribuiriam para a exacerbação da hiperresponsividade brônquica.

A resposta fibroproliferativa começa quase que imediatamente após o início da lesão, numa tentativa de reparar o dano à parede alvéolo-capilar. O acúmulo de células inflamatórias e a entrada de plasma nos espaços alveolares alteram o microambiente alveolar, conduzindo a evolução do remodelamento tecidual para a fibrose progressiva (SOUZA, 2003). Este processo faz com que os tecidos pulmonares sejam progressivamente substituídos por fibroblastos e colágeno, causando uma perda irreversível destes tecidos em transferir oxigênio para a corrente sanguínea via alvéolos pulmonares (LEE *et al.*, 2002; WALDMAN *et al.*, 2003).

Apesar de diversas drogas terem sido investigadas em ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos randomizados como agentes potenciais para o tratamento da fibrose, até o momento, apenas duas substâncias mostraram eficácia no tratamento: o nintedanibe e a pirfenidona (BADDINI-MARTINE *et al.*, 2015).

Knupel *et al.* (2017), analisaram os efeitos dessas drogas sobre os fibroblastos e sua função como fonte de matriz extracelular. O acúmulo de matriz extracelular, principalmente colágeno, é uma característica principal da fibrose pulmonar. Eles mostraram que tanto nintedanibe como a pirfenidona exercem efeitos antifibróticos através de um novo mecanismo de ação: a inibição da formação de fibrilas de colágeno I, o que leva a uma redução no tamanho e número de feixes de fibras colágenas.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que os derivados *N*-acilhidrazonas AMH e AMZ-Bz apresentaram efeito anti-inflamatório, mucolítico e antiasmático uma vez que a quantidade de leucócitos totais presentes na cavidade pleural dos animais foi reduzida pelo tratamento com ambos os derivados *N*-acilhidrazônicos, assim como, a quantidade de leucócitos totais presentes na cavidade pleural também foi reduzida no modelo experimental de asma, além de reduzir a migração de mastócitos. Isto pode ter ocasionado a supressão do remodelamento pulmonar, mostrando eficácia na diminuição das fibras colágenas. Além disso, os derivados em estudo apresentaram atividade expectorante através do aumento da excreção de vermelho de fenol pelas vias aéreas, o que contribuiria na diminuição da exarcebação de doenças pulmonares inflamatórias.

De um modo geral, a supressão eficaz da resposta inflamatória, representa um efeito farmacológico potencial das substâncias testadas, podendo constituir uma opção de tratamento eficaz e conveniente para doenças pulmonares e o remodelamento das vias aéreas.

REFERENCIAS

- ABDELGAWAD, M. A., LABIB, M. B., ABDEL-LATIF, M. Pyrazole-hydrazone derivatives as anti-inflammatory agents: Design, synthesis, biological evaluation, COX-1,2/5-LOX inhibition and docking study. **Bioorganic Chemistry**. v. 74, p. 212–220. 2017.
- AGRA, L.C., LINS, M.P., MARQUES, P.S., SMANIOTTO, S., MELO, C.B., LAGENTE, V., BARRETO, E. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 780, p. 232–242, 2016.
- ALAGHA, K., BOURDIN, A., VERNISSE, C., GARULLI, C., TUMMINO, C., CHARRIOT, J., GRAS, D. *et al.* Goblet Cell Hyperplasia as a feature of neutrophilic asthma. **Clinical & Experimental Allergy**. v. 1, p. 1-22. 2019.
- ALANGARI, A. Corticosteroids in the treatment of acute asthma. **Annals of Thoracic Medicine**. v. 9, n. 4, p. 187-192. 2014.
- ALBRECHT, H. H., DICPINIGAITIS, P. V., GUENIN, E. P. Role of guaifenesin in the management of chronic bronchitis and upper respiratory tract infections. **Multidisciplinary Respiratory Medicine**, v. 12, n. 31, p. 1-12 2017.
- ALHASSAN, S., HATTAB, Y., BAJWA, O. BIHLER, E., SINGH, A. C. Asthma. **Critical Care Nursing Quarterly**. v. 39, n. 2, pp. 110–123, 2016.
- ALLINSON, J. P., HARDY, R., DONALDSON, G. C., SHAHEEN, S. O., KUH, D., WEDZICHA, J. A. The Presence of Chronic Mucus Hypersecretion across Adult Life in Relation to Chronic Obstructive Pulmonary Disease Development. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 6, p. 662–672. 2016.
- ALVES, G.M.B., MAIA, M.B.S., FRANCO E.S., GALVÃO, A.M., SILVA, T.G., GOMES, R.M., MARTINS, M.B., FALCÃO, E.P.S., CASTRO, C.M.M.B., SILVA, N.H. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. v. 27, p. 139-143, 2014.
- ALLEN, P. J. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? **Neurosci Biobehav Rev**. v. 36, n. 5, p. 1442–1462, 2012.
- ARNAUD, R. R., SOARES, M. S. M., SANTOS, M. G. C., LIRA, C. C. Density of mast cells in lesions of actinic cheilitis. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 51, n. 3, p. 378-387, 2014.

ASKER, S. A., MAZROA, S. A., BOSHRA, V., HASSAN, A. M. Biochemical and histological impact of direct renin inhibition by aliskiren on myofibroblasts activation and differentiation in bleomycin induced pulmonary fibrosis in adult mice. **Tissue and Cell**. v. 47, p. 373–381, 2015.

AUGUSTO, L. L. X., LOPES, G. C., GONÇALVES, J. A. S. A cfd study of deposition of pharmaceutical aerosols under different respiratory conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 33, n. 03, p. 549 - 558, 2016.

AUVENSHINE, R. C. Anatomy of the Airway: An Overview. **Sleep Medicine Clinics**, V. 5, N. 1, p. 45-57, 2010.

AZEVEDO, M. F., FAUCZ, F. R., BIMPAKI, E., HORVATH, A., LEVY, I., DE ALEXANDRE, R. B., STRATAKIS, C. A. *et al.* Clinical and Molecular Genetics of the Phosphodiesterases (PDEs). **Endocrine Reviews**. v. 35, n. 2, p.195–233. 2014.

BADDINI-MARTINEZ, J., BALDI, B. G., COSTA, C. H. DA, JEZLER, S., LIMA, M. S., & RUFINO, R. Update on diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 41(5), 454–466, 2015.

BAI, T. R., KNIGHT, D. A. Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. **Clinical Science**, v. 108, n. 6, p. 463–477. 2005.

BAO, W., ZHANG, Y., ZHANG, M., BAO, A., FEI, X., ZHANG, X., ZHOU, X. Effects of ozone repeated short exposures on the airway/lung inflammation, airway hyperresponsiveness and mucus production in a mouse model of ovalbumin-induced asthma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 293–303. 2018.

BACKMAN, H., RAINSANEN, P., HEDMAN, L., STRIDSMAN, C., ANDERSSON, M., LINDBERG, A., LUNDBECK, B., REONMARK, E. Increased prevalence of allergic asthma from 1996 to 2006 and further to 2016—results from three population surveys. **Epidemiology of Allergic Disease**. v, 47, p. 1426-1435, 2017.

BANNO, A., REDDY, A. T., LAKSHMI, S. P., REDDY, R. C. PPARs: Key Regulators of Airway Inflammation and Potential Therapeutic Targets in Asthma. **Nuclear Receptor Research**. v. 5, p. 1-15, 2018.

BARNES, P. J. Glucocorticosteroids: current and future directions. **British Journal of Pharmacology**, v, 163, p. 29–43, 2011.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., MIRANDA, A. L. P., RODRIGUES, C. R. A química medicinal de n-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**, v 25, n. 1, p. 129-148, 2002

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. 3º ed. **Artmed**; 2015.

BARRETT, N. A., AUSTEN, K. F. Innate Cells and T Helper 2 Cell Immunity in Airway Inflammation. **Immunity**. v. 31, n. 3, p. 425–437.2009.

BHATTACHARYA, P., BUDNICK, I., SINGH, M., THIRUPPATHI, M., ALHARSHAWI, K., ELSHABRAWY, H., PRABHAKAR, B. S., *et al.* Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 8, p. 585–599. 2015.

BENNETT, W. D., LAUBE, B. L., CORCORAN, T., ZEMAN, K., SHARPLESS, G., THOMAS, K., DONALDSON, S. *et al.* Multisite Comparison of Mucociliary and Cough Clearance Measures Using Standardized Methods. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, n. 26, v. 3, p. 157–164. 2013.

BENTLEY, A. M., HAMID, Q., ROBINSON, D. S., SCHOTMAN, E., MENG, Q., ASSOEFI, B., DURHAM, S. R., *et al.* Prednisolone treatment in asthma. Reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon-gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 153, n. 2, 551–556, 1996.

BEZERRA-SANTOS, C., VIEIRA-DE-ABREU, A., BARBOSA-FILHO, J.M., BANDEIRA-MELO, C., PIUVEZAM, M.R., BOZZA, P.T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**. v. 6, p. 1152–1160, 2006.

BILLINGTON, C. K., PENN, R. B., HALL, I. P. β 2-agonists. **Handbook of Experimental Pharmacology**. v. 237, p. 23-40. 2017.

BISPO JÚNIOR, W.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; ALVES, M. A. *et al.* Analgesic and Anti-Inflamatory activities of Salicylaldehyde 2-Chlorobenzoyl Hydrazone (H2LASSBio-466), Salicylaldehyde 4-Chlorobenzoyl Hydrazone (H2LASSBio-1064) and Their Zinc (II) Complexes. **Molecules**. v.16, p. 6902-6915. 2011.

BJERMER, L. The role of small airway disease in asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, 20(1), 23–30, 2014.

BRADDING, P., ARTHUR, G. Mast cells in asthma - state of the art. **Clinical & Experimental Allergy**. v. 46, n. 2, p. 194–263. 2016.

BRANNAN, J. D., GULLIKSSON, M., ANDERSON, S. D., CHEW, N., SEALE, J. P., KUMLIN, M. Inhibition of mast cell PGD₂ release protects against mannitol-induced airway narrowing. **European Respiratory Journal**, v. 27, n. 5, p. 944–950. 2006.

BRINGHURST, F. R., DEMAY, M. B., KRONENBERG, H. M. Hormones and Disorders of Mineral Metabolism. In: Melmed. Williams Textbook of Endocrinology. 12^o ed. **Saunders**; 2011.

BORTHWICK, L. A., WYNN, T. A., FISHER, A. J. Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Molecular Basis of Disease**. v. 1832, n. 7, p. 1049–1060. 2013.

BOUSQUET, J., LACOSTE, J. Y., CHANEZ, P., VIC, P., GODARD, P., MICHEL, F. B. Bronchial elastic fibers in normal subjects and asthmatic patients. **American Journal Respiratory Crit Care Medicine**, v 153, p. 648-654, 1996.

BUELS, K. S., FRYER, A. D. Muscarinic Receptor Antagonists: Effects on Pulmonary Function. **Handbook of Experimental Pharmacology**. p. 317–341. 2011.

BURDEN, N., SEWELL, F., CHAPMAN, K. Testing Chemical Safety: What Is Needed to Ensure the Widespread Application of Non-animal Approaches? **PLOS Biology**. v.13, n. 5, p. 1-8. 2015.

BURGIN, A. B., MAGNUSSON, O. T., SINGH, J., WITTE, P., STAKER, B. L., BJORNSSON, J. M., GURNEY, M. E., *et al.* Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. **Nature Biotechnology**. v. 28, n. 1, p. 63–70. 2009.

BUSSE, W., CORREN, J., LANIER, B. Q., *et al.* Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 108, n. 2, p. 184-190. 2001.

BUSSE, W. W., DAHL, R., JENKINS, C., CRUZ, A. A. Long-acting muscarinic antagonists: a potential add-on therapy in the treatment of asthma? **European Respiratory Review**. v. 25, p. 54–64. 2016.

BUSTAMANTE-MARIN, X. M., OSTROWSKI, L. E. Cilia and Mucociliary Clearance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 9, n. 4, p. 1-17. 2016.

CADA, D. J., BINDLER, R. J., BAKER, D. E. Formulary Drug Reviews - Mepolizumab. **Hospital Pharmacy**. v. 51, n. 5, p. 405-414. 2016.

CAMPOS, H. S. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do Corticosteroide. **Revista Brasileira Pneumologia Sanitaria**, v 15, n. 1, p. 47-60, 2007.

CAÑAS, J. A., SASTRE, B., RODRIGO-MUÑOZ¹, J. M., FERNANDEZ-NIETO, M., BARRANCO, P., QUIRCE, P., SASTRE, J., DEL POZO, V. Eosinophil-derived exosomes contribute to asthma remodelling by activating structural lung cells. **Basic Mechanisms in Allergic Disease**. v. 48, p. 1173–1185, 2018.

CARDOSO, T. A., CRISTIAN RONCADA, C., SILVA, E. R., PINTO, L. A., JONES, M. H., STEIN, R. T., PITREZ, P. M. Impacto da asma no Brasil: análise longitudinal de dados extraídos de um banco de dados governamental brasileiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.43, n. 3, p. 163-168, 2017.

CARDOZO, S. V. S. Triagem e avaliação farmacológica de novos inibidores de PDE4, da classe das N-metil-N-acilidrazonas, para controle da asma. 2014. **Tese** (Doutorado em biologia celular e molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

CARR, W. W., SZEFLER, S. J. Inhaled corticosteroids: Ocular safety and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**. v. 117, p. 589-594. 2016.

CASTRO, M., ZANGRILLI, J., WECHSLER, M. E., *et al.* Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil counts: results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. **Lancet Respiratory Medicine**. v. 3, n. 5, p. 355-366. 2015.

CAO, X.-Y., & XIAO, S.-Y. Chronic lung disease, lung regeneration and future therapeutic strategies. **Chronic Diseases and Translational Medicine**. v. 4, n. 2, p. 103–108. 2018.

CHAKRABORTY, R., DEVANNA, B. N., SEM, S. Antitussive, expectorant activity of *Marsilea minuta* L., an Indian vegetable. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**. v. 4, n. 1, p. 61-64, 2013.

CERNAK, T., KEVIN D. DYKSTRA, K. D., SRIRAM TYAGARAJAN, S., PETR VACHAL, P., KRŠKA, W. S. The medicinal chemist's toolbox for late stage functionalization of drug-like molecules. **Chemical Society Reviews**. v. 45, n. 3, p. 546-576, 2016.

CERQUEIRA, J. V. Efeito anti-inflamatório de derivado N-acil-hidrazona (HAH2) em modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas inferiores. 2017. **Dissertação**

(Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia.

COHN, L., ELIAS, J. A., CHUPP, G. L. Asthma: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. **Annual Review of Immunology**. v. 22, n. 1, p. 789–815. 2004.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS. Substâncias Carboniladas e Derivados. Artmed Editora S A Subdivisão Bookman Companhia Editora. Série Química Orgânica. 2003.

CHAMBERS, R. C., MERCER, P. F. Mechanisms of Alveolar Epithelial Injury, Repair, and Fibrosis. **Annals of the American Thoracic Society**. v. 12, p. S16–S20. 2015.

CHELUCCI, R. C., DUTRA, L. A., PIRES, M. E. L., MELO, T. R. F., BOSQUESI, P. L., CHUNG, M. C., SANTOS, J. L. Antiplatelet and antithrombotic activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs containing na N-acyl hydrazone subunit. **Molecules**, v 19, p.2089-2099, 2014.

CHEN, W., PILLING, D., GOMER, R. H. Dietary NaCl affects bleomycin-induced lung fibrosis in mice. **Experimental Lung Research**. v. 43, p. 395-406, 2017.

CHEN, Z., LI, Y., WANG, Z., LI, M., LIM, H., ZHOU, Y., *et al.* Aberrant epithelial remodeling with impairment of cilia architecture in non-cystic fibrosis bronchiectasis. **Journal of Thoracic Disease**. v. 10, n. 3, p. 1753-1764. 2018.

CHERESH, P., KIM, S. J., TULASIRAM, S., KAMP, D. W. Oxidative stress and pulmonary fibrosis. **Biochimica Biophysica Acta**, v 7, p. 1028-1040, 2013.

CHUA, F., GAULDIE, J., & LAURENT, G. J. Pulmonary Fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 33(1), 9–13, 2005.

CHUQUIMIA, O. D., PETURSDOTTIR, D. H., PERIOLO, N., FERNÁNDEZ, C. Alveolar Epithelial Cells Are Critical in Protection of the Respiratory Tract by Secretion of Factors Able To Modulate the Activity of Pulmonary Macrophages and Directly Control Bacterial Growth. **Infection and Immunity**. v. 81, n. 1, p. 381–389. 2012.

CROSBY, L. M., WATERS, C. M. Epithelial repair mechanisms in the lung. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 298, n. 6, p. L715–L731. 2010.

CUNHA, L. C., AZEREDO, F. S., MENDONÇA, A. C. V., VIEIRA, M. S., PUCCI, L. L., VALADARES, M. C., *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2^a, p. 403-411, 2009.

DAHLIN, J. S., HALLGREN, J. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. **Molecular Immunology**. v. 63, n. 1, p. 9–17. 2015.

DEVEREUX, G., COTTON, S., BARNES, P., BRIGGS, A., BURNS, G., CHAUDHURI, R., PRICE, D., *et al.* Use of low-dose oral theophylline as an adjunct to inhaled corticosteroids in preventing exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: study protocol for a randomised controlled trial. **Trials**. v. 16, n. 1, p. 1-10. 2015.

DHANISHA, S. S., GURUVAYOORAPPAN, C., DRISHYA, S., ABEESH, P. Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 122, p. 98–122. 2018.

DICKSON, R. P., HUFFNAGLE, G. B. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. **PLOS Pathogens**, v.11, n. 7, p. 1-5, 2015.

DRISCOLL, D., FARNIA, S., KEFALAS, P., MAZIARZ, R. T. Concise Review: The High Cost of High Tech Medicine: Planning Ahead for Market Access. **Stem Cells Translationalmedicine**. v. 6, p. 1723–1729, 2017.

DURHAM, A. L., CARAMORI, G., CHUNG, K. F., ADCOCK, I. M. Targeted anti-inflammatory therapeutics in asthma. **Translational Research**. v. 167, n. 1, p. 192-203, 2016.

EISENBARTH, S. C., FLAVELL, R. A. Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome. **EMBO Molecular Medicine**, v.1, n. 2, p. 92–98. 2009.

EL-DIN, N. S., BARSEEM, A. Synthesis, bioactivity and docking study of some new indole-hydrazone derivatives. **Jornal of Applied Pharmaceutical Science**, v 6, n. 12, p. 75-83, 2016.

EPSTEIN M. M; Do mouse models of allergic asthma mimics clinical disease? **International archives of allergy and immunology**. v. 133, p. 84-100,2004.

ERLE, D. J., SHEPPARD, D. The cell biology of asthma. **The Journal of Cell Biology**, v. 205, n. 5, p. 621–631. 2014.

ERPENBECK V. J, HOHLFELD J. M, PETSCHALLIES J, EKLUND E, PETERSON C. G. B, FABEL H, KRUG N. Local release of eosinophil peroxidase following segmental allergen provocation in asthma. **Clinical and Experimental Allergy**. v. 33, p. 331-336, 2003.

FAHY, J. V., DICKEY, B. F. Airway Mucus Function and Dysfunction. **New England Journal of Medicine**. v. 363, n. 23, p. 2233–2247. 2010.

FALK, N. P., HUGHES, S. W., RODGERS, B. C. Medications for Chronic Asthma. **American Family Physician**. v. 94, n. 6, p. 454-462. 2016.

FEHRENBACH, H., WAGNER, C., WEGMANN, M. Airway remodeling in asthma: what really matters. **Cell and Tissue Research**. v. 367, n. 3, p. 551–569. 2017.

FLORES-DELGADO, G., LYTLE, C., QUINTON, P. M. Site of Fluid Secretion in Small Airways. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 54, n. 3, p. 312–318. 2016.

FOSTER, P.S.; HOGAN, S.P.; RAMSAY, A.J.; MATTHAEI, K.I.; YOUNG, I.G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. **Journal of Experimental Medicine**. v.183, p.195-201, 1996.

FRANSSON, L., FRANZEN, S., ROSENGREN, V., WOLBERT, P., SJOHOLM, A., & ORTSATER, H. β - cell adaptation in a mouse model of glucocorticoid-induced metabolic syndrome. **Journal of Endocrinology**, 219(3), 231–241, 2013.

FIORI, N. S., GONÇALVES, H., DUMITH, S. C., CESAR, M. A. D. C., MENEZES, A. M. B., MACEDO, S. E C. Ten-year trends in prevalence of asthma in adults in southern Brazil: comparison of two population-based studies. **Caderno Saude Publica**, v 28, n.1, p.135-144. 2012.

FLORSHEIM, E., YU, S., BRAGATTO, I., FAUSTINO, L., GOMES, E., RAMOS, R. N., RUSSO, M., *et al.* Integrated Innate Mechanisms Involved in Airway Allergic Inflammation to the Serine Protease Subtilisin. **The Journal of Immunology**. v. 194, n.10, p. 4621–4630. 2015.

GBD 2015 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**. v. 388, p. 1459–544, 2016.

GALLI, S. J., TSAI, M. PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v 454, n.7203, p. 445-454. 2008.

GAO, L., TANG, H., HE, H., LIU, J., MAO, J., JI, H., LIN, H., WU, T., Glycyrrhizic acid alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Frontiers Pharmacology**. v. 6, p. 1-12, 2015.

GAO, Q., LI, Y., PAN, X., YUAN, X., PENG, X., LI, M. Lentivirus expressing soluble ST2 alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **International Immunopharmacology**. v. 30, p. 188–193, 2016.

GEISER, T. Idiopathic pulmonary fibrosis – a disorder of alveolar wound repair? **Swiss Medical Weekly**, v. 133, p. 405-411, 2003.

GIRODET, P. O.; OZIER, A.; BARA, I.; TUNON DE LARA, J. M.; MARTHAN, R.; BERGER, P. Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 130, p. 325-337, 2011.

GINA - GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2016.

GODINHO, R. O., DUARTE, T., PACINI, E. S. A. New perspectives in signaling mediated by receptors coupled to stimulatory G protein: the emerging significance of cAMP efflux and extracellular cAMP-adenosine pathway. **Frontiers in Pharmacology**. v. 06, p. 1-9. 2015.

GUEDERS, M. M., PAULISSEN, G., CRAHAY, C., QUESADA-CALVO, F., HACHA, J., VAN HOVE, C., CATALDO, D. D., *et al.* Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. **Inflammation Research**, 58(12), 845–854, 2009.

GUIMARÃES, S., MOURA, D., DA SILVA, P. S. Manual de farmacologia e farmacoterapia. (5a edição). Porto: Porto Editora. 2006.

GUIMARÃES, E. T., DOS SANTOS, T. B., SILVA, D. K. C., MEIRA, C. S., MOREIRA, D. R. M., DA SILVA, T. F., SOARES, M. B. P., *et al.* Potent immunosuppressive activity of a phosphodiesterase-4 inhibitor N-acylhydrazone in models of lipopolysaccharide-induced shock and delayed-type hypersensitivity reaction. **International Immunopharmacology**. v. 65, p. 108–118. 2018.

GUO C, TANG X, DONG X, YANG Y. Studies on the expectorant, antitussive and antiasthmatic properties of asterosaponin extracted from *Luidia quinaria*. *Afr J biotechnol* v. 8, p. 6694-6, 2009.

HALL, S., AGRAWAL, D. K. Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma. **International Immunopharmacology** v. 23, n. 1, p. 316–329. 2014.

HAMED, R., FIEGEL, J. Synthetic tracheal mucus with native rheological and surface tension properties. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 102, n. 6, p. 1788–1798. 2013.

HAMELMANN, E.; SCHWARZE, J.; TAKEDA, K.; OSHIBA, A.; LARSEN, G.L.; IRVIN, C.G.; GELFAND, E.W. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. **Am J Respir Crit Care Med**, v.156, p. 766-775, 1997.

HAN, N., CHANG, C., WANG, Y., HUANG, T., LIU, Z., YIN, J. The *in vivo* expectorant and antitussive activity of extract and fractions from *Reineckia carnea*. **J Ethnopharmacol** v. 131, p. 220-3, 2010.

HIROSE, K., IWATA, A., TAMACHI, T., NAKAJIMA, H. Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. **Immunological Reviews**. v. 278, n. 1, p. 145–161. 2017.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature Medicine Review**. v. 18, n. 5, p. 673-83, 2012.

IMPELLIZZERI, D., TALERO, E., SIRACUSA, R., ALCAIDE, A., CORDARO, M., MARIA, ZUBELIA, J., BRUSCHETTA, G., CRUPI, R., ESPOSITO, E., CUZZOCREA, S., MOTILVA, V. Protective effect of polyphenols in an inflammatory process associated with experimental pulmonar fibrosis in mice. **British Journal of Nutrition**. v. 114, p. 853–865, 2015.

ITO, J. T., LOURENÇO, J. D., RIGHETTI, R. F., TIBERIO, I. F. L. C., PRADO, C. M., LOPES, F. D. T. Q. S. Extracellular Matrix Component Remodeling in Respiratory Diseases: What Has Been Found in Clinical and Experimental Studies? **Cells**. v. 8, n. 4, 2019.

IWANO, M., PLIETH, D., DANOFF, T.M., XUE, C., OKADA, H., NEILSON, E.G. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 341-350, 2002.

SBPT - Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. III. Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. **Jornal Pneumologia**, v,28 n, 1, p, S1-28, 2002.

JAMES, A. L., MAXWELL, P. S., PEARCE-PINTO, G., ELLIOT, J. G., CARROLL, N. G. The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**. V 166, p. 1590–1595, 2002.

JAMES, A., GYLLFORS, P., HENRIKSSON, E., DAHLÉN, S. E., ADNER, M., NILSSON, G., & DAHLÉN, B. Corticosteroid treatment selectively decreases mast cells in the smooth muscle and epithelium of asthmatic bronchi. **Allergy**, 67(7), 958–961, 2012.

JAYALAKSHMI, N., NANJUNDAN, S. Synthesis, characterization and pharmacological studies of selenadiazole and hydrazone derivatives of 2, 6–diphenyl–4–piperidone. **International Journal of Chemical Sciences**. v. 6, n. 3, p. 1177-1188, 2008.

KASPER, M., BARTH, K. Potential contribution of alveolar epithelial type I cells to pulmonar fibrosis. **Bioscience Reports**. v.37, n. 6, p. 1-36, 2017.

KAWAMATAWONG, T. Roles of roflumilast, a selective phosphodiesterase 4 inhibitor, in airway diseases. **Journal of Thoracic Disease**. v. 9, n. 4, p. 1144-1154, 2017.

KAWAI, M.; HIRANO, T.; HIGA, S.; ARIMITSU, J.; MARUTA, M.; KUWAHARA, Y.; OHKAWARA, T.; HAGIHARA, K.; YAMADORI, T.; SHIMA, Y.; OGATA, A.; KAWASE, I.; TANAKA, T. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. **Allergol Int**, v.56, p 113-123, 2007.

KEGLOWICH, L. F., BORGER, P. The Three A's in Asthma – Airway Smooth Muscle, Airway Remodeling & Angiogenesis. **Open Respiratory Medicine Journal**. v.9, p. 70–80, 2015.

KHLEBNIKOV, A. I., SCHEPETKIN, I. A., KIRPOTINA, L. N., QUINN, M. T. Computational structure-activity relationship analysis of non-peptide inducers of macrophage tumor necrosis factor- α production. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9302-9312. 2008.

KIM, H. J., PERLMAN, D., TOMIC, R. Natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory Medicine**, v 6, p. 661-670, 2015.

KIM, V., OROS, M., DURRA, H., KELSEN, S., AKSOY, M., CORNWELL, W. D., CRINER, G. J., *et al.* Chronic Bronchitis and Current Smoking Are Associated with More Goblet Cells in Moderate to Severe COPD and Smokers without Airflow Obstruction. **Plos One**. v. 10, n. 2, p. 1-11. 2015.

KING, E. M., CHIVERS, J. E., RIDER, C. F., MINNICH, A., GIEMBYCZ, M. A., NEWTON, R. Glucocorticoid Repression of Inflammatory Gene Expression Shows Differential Responsiveness by Transactivation- and Transrepression-Dependent Mechanisms. **PLoS ONE**. v. 8, n. 1, p. e53936. 2013.

KIPS, J.C.; BRUSSELLE, G.G.; JOOS, G.F.; PELEMAN, R.A.; DEVOS, R.R.; TAVERNIER, J.H.; PAUWELS, R.A. Importance of interleukin-4 and interleukin-12 in allergen-induced airway changes in mice. **Int Arch Allergy Immunol**, v.107, p.115-118, 1995.

KITAEV, Yu.P.; BUZYKIN, B.I. The Reactions of Hydrazones. **Russian Chemical Reviews**. v. 41, n. 6, p. 495-515, 1972.

KRISHNASWAMY, G., AJITAWI, O., CHI, D. S. The Human Mast Cell: An Overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 315, p. 13-34, 2006.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M., DILEEPAN, K. N., WOOD, J. G. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1-12. 2016.

KOLB, M., BONDUE, B., PESCI, A., MIYAZAKI, Y., SONG, J. W., BHATT, N. Y., HUGGINS, J. T., OLDHAM, J. M., PADILLA, M. L., ROMAN, J., SHAPER, S. Acute exacerbations of progressive fibrosing interstitial lung diseases. **European Respiratory Review**. v. 27, p. 1-8, 2018.

KORNMAN, K. S., & VAN DYKE, T. E. Bringing Light to the Heat: "Inflammation and Periodontal Diseases: A Reappraisal." **Journal of Periodontology**, 79(8), 1313–1313, 2008.

KOPF, M., SCHNEIDER, C., NOBS, S. P. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. **Nature Immunology**. v. 16, n. 1, p. 36–44. 2015.

KOTERBA, A. P.; SALTOUN, C. A. Chapter 9: Asthma classification. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 33, p. 28-31, 2012.

KNÜPPEL, L., ISHIKAWA, Y., AICHLER, M., HEINZELMANN, K., HATZ, R., BEHR, J., STAAB-WEIJNITZ, C. A., *et al.* A Novel Antifibrotic Mechanism of Nintedanib and Pirfenidone. Inhibition of Collagen Fibril Assembly. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 57(1), 77–90, 2017.

KUDO, M., ISHIGATSUBO, Y., AOKI, I. Pathology of asthma. **Frontiers in Microbiology**. v.4, p. 1-16. 2013.

KULKARNI, T., O'REILLY, P., ANTONY, V. B., GAGGAR, A., THANNICKAL, V. J. Matrix Remodeling in Pulmonary Fibrosis and Emphysema. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 54, n. 6, p. 751–760. 2016.

KÜMMERLE, A. E., SCHMITT, M., CARDOZO, S. V. S., LUGNIER, C., VILLA, P., LOPES, A. B., BARREIRO, E. J., *et al.* 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**. v. 55, n. 17, p. 7525–7545. 2012.

LAGDIVE, S. S., LAGDIVE, S. B., MANI, A., ANARTHE, R., PENDYALA, G., PAWAR, B., MARAWAR, P. P. Correlation of mast cells in periodontal diseases. **Journal of Indian Society of Periodontology**, 17(1): 63–67, 2013.

LAHZAMI, S., & KING, G. G. Targeting small airways in asthma: the new challenge of inhaled corticosteroid treatment. **European Respiratory Journal**, 31(6), 1145–1147, 2008.

LAILAW, T. M.; BOYCE, J. A. Cysteinyl leukotriene receptors, old and new; implications for asthma. **Clinical & Experimental Allergy**. v. 42, n. 9, p. 1313-1320, 2012.

LAMBRECHT, B. N., & HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, 16(1), 45–56, 2015.

LARA, P. F., FILHO, R. M. O. Evolução farmacológica dos mucolíticos. **Arquivos Fundação Otorrinolaringologia**, v 3, n. 2, p. 68-72, 1999.

LARSSON, K., STÄLLBERG, B., LISSPERS, K., TELG, G., JOHANSSON, G., THURESSON, M., JANSON, C. Prevalence and management of severe asthma in primary care: an observational cohort study in Sweden (PACEHR). **Respiratory Research**, v. 19, n. 1, p. 1-10. 2018.

LAURENT, G.J., MCANULTY, R.J., HILL, M., CHAMBERS, R. Escape from the Matrix Multiple Mechanisms for Fibroblast Activation in Pulmonary Fibrosis. **American Thoracic Society**, v. 5, 311-315, 2008.

LAXMANAN, B., HOGARTH, D. K. Bronchial thermoplasty in asthma: current perspectives. **Journal of Asthma and Allergy**. v. 8, p. 39-49. 2015.

LEE J.S., et al. The major histopathologic pattern of pulmonary fibrosis in scleroderma is nonspecific interstitial pneumonia. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung.*, v.19:p.121-127, 2002.

LEE, K. S.; KIM, S. R.; PARK, S. J.; MIN, K. H.; LEE, K. Y.; JIN, S. M.; YOO, W. H.; LEE, Y.C. Antioxidant down-regulates interleukin-18 expression in asthma. **Molecular Pharmacology**. v. 70, p. 1184-1193. 2006.

LEE, T. H., KIM, W. R., POTERUCHA, J. J. Evaluation of elevated liver enzymes. **Clin Liver Dis**. v. 16, n. 2, p. 183-98, 2012.

LEMANSKE, R. F. JR.; BUSSE, W. W. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. 95-102, 2010.

LI, X., WILSON, J. W. Increased Vascularity of the Bronchial Mucosa in Mild Asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 156, n. 1, p. 229–233. 1997.

LI, X.W., WU Y. H., LI X. H., LI D., DU J., HU C. P., LI Y. J. Role of eukaryotic translation initiation factor 3a in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **European Journal Pharmacology**, v 749, p. 89-97, 2015.

LI, H., ZUO, J., TANG, W. Phosphodiesterase-4 Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. **Frontiers in Pharmacology**. v. 9, p.1048. 2018.

LIMA, L. M. et al. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 348–356, 2008.

LIU, Y.-H., WU, S.-Z., WANG, G., HUANG, N.-W., LIU, C.-T. A long-acting β 2-adrenergic agonist increases the expression of muscarine cholinergic subtype-3 receptors by activating the β 2-adrenoceptor cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in airway smooth muscle cells. **Molecular Medicine Reports**. v. 11, n. 6, p. 4121–4128. 2015.

LOCK, J. Y., CARLSON, T. L., CARRIER, R. L. Mucus models to evaluate the diffusion of drugs and particles. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 124, p. 34–49. 2018.

LOPES, C., RAVASQUEIRA, A., SILVA, I., CAIADO, J., DUARTE, F., DIDENKO, I., *et al.* Allergy School Hannover 2006: “Allergy, from diagnosis to treatment”. **Revista Portuguesa Imunoalergologia**., v. 14, n. 4, p. 355-364, 2006.

LORUSSO, B., FALCO, A., MADEDDU, D., FRATI, C., CAVALLI, S., GRAIANI, G., QUAINI, F., *et al.* Isolation and Characterization of Human Lung Lymphatic Endothelial Cells. **BioMed Research International** v,1 p.1–12, 2015.

LOZANO, R., NAGHAVI, M., FOREMAN, K., LIM, S., SHIBUYA, K., ABOYANS, V., AHN, SY, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**. v.380, p. 2095-2128, 2012.

LOSSOS, I. S., IZBICKI, G., OR, R., GOLDSTEIN, R. H., & BREUER, R. The effect of suramin on bleomycin-induced lung injury. **Life Sciences**, v. 67, n. 23, p. 2873–2881, 2000.

LUO, F., ZHUANG, Y., SIDES, M. D., SANCHEZ, C. G., SHAN, B., WHITE, E. S., LASKY, J. A. Arsenic trioxide inhibits transforming growth factor- β 1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation in vitro and bleomycin induced lung fibrosis in vivo. **Respiratory Research**. v 1, n. 51, p. 1-14, 2014.

LV, J., XIONG, Y., LI, W., YANG, W., ZHAO, L., HE, R. BLT1 Mediates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis Independently of Neutrophils and CD4+ T Cells. **The Journal of Immunology**. v. 198, p. 1673-1684, 2017.

MA, J., RUBIN, B. K., VOYNOW, J. A. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. **Chest**. v.154, n. 1, p.169–176. 2018.

MACHADO, A. Asma: um breve histórico de uma doença negligenciada no Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v.15, n. 2, p. 137-138, 2016.

MAIA, R. C., TESCH, R., FRAGA, T. A. M. Acylhydrazone derivatives: a patent review. **Expert Opin. Ther. Patents**, v 24, p. 1161-1170, 2014.

MALERBA, M., RAGNOLI, B. Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**. v. 4, n. 8, p. 1119–1129. 2008.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD. R. C. A hippocratic screening for pure or drug materials. **Lloydia**, v.25, p.23-53, 1962.

MALONE, M. H. – Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity. Berlin: H. Wagner, Wolf Springer–Verlag, 1977.

MAUAD, T., SOUZA, A. S. L., SALDIVA, P. H. N., DOLHNIKOFF, M. Remodelamento brônquico na asma. **Jornal de Pneumologia**, v 26, n. 2, p. 1-11, 2000.

MATTES, J.; YANG, M.; MAHALINGAM, S.; KUEHR, J.; WEBB, D.C.; SIMSON, L.; HOGAN, S.P.; KOSKINEN, A.; MCKENZIE, A.N.; DENT, L.A.; ROTHENBERG, M.E.; MATTHAEI, K.I.; YOUNG, I.G.; FOSTER, P.S. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. **J Exp Med**, v.195, p.1433-1444, 2002.

McCRACKEN, J., TRIPPLE, J., CALHOUN, W. J. Biologic therapy in the management of asthma. **Current opinion in allergy and clinical immunology**. n. 16, v. 4, p. 375–382, 2016.

McCRACKEN, J. L., VEERANKI, S. P., AMEREDES, B. T., CALHOUN, W. J. Diagnosis and Management of Asthma in Adults - A Review. **Clinical Review & Education**. v. 318, n. 3, p. 279-290. 2017.

McBRIEN, C. N., MENZIES-GOW, A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. **Frontiers in Medicine**, v. 4, n. 93, p. 1-14. 2017.

MOTOHIRO, A., FURUKAWA, T., YASUMOTO, K., & INOKUCHI, K. Mechanisms Involved in Acute Lung Edema Induced in Dogs by Oleic Acid. **European Surgical Research**, v. 18, n. 1, p. 50–57, 1986.

MOELLER, A., ASK, K., WARBURTON, D., GAULDIE, J., & KOLB, M. The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 40(3), 362–382, 2008.

MOHSIN, N. A., AHMAD, M. Hybrid organic molecules as antiinflammatory agents; a review of structural features and biological activity. **Turkish Journal of Chemistry**. v. 42, p. 1-20, 2018.

MOORE, B.B., HOGABOAM, C.M. Murine models of pulmonary fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 294, n. 2, p. 152-160, 2007.

MOORE, P. J., TARRAN, R. The epithelial sodium channel (ENaC) as a therapeutic target for cystic fibrosis lung disease. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 22, n. 8, p. 687–701.2018.

MORAES, T. J., SEARS, M. R., SUBBARAO, P. Epidemiology of Asthma and Influence of Ethnicity. **Seminars in Respiratory Critical Care Medicine**. v. 39, n. 1, p. 3-11, 2018.

MORRISSEY, M. A., & SHERWOOD, D. R. An active role for basement membrane assembly and modification in tissue sculpting. **Journal of Cell Science**, v.128, n. 9, p.1661–1668, 2015.

MURAKAMI, K.; KOHNO, M.; KADOYA, M. et. al. Knock Out of S1P3 Receptor Signaling Attenuates Inflammation and Fibrosis in Bleomycin-Induced Lung Injury Mice Model. **PLoS One**. v. 9, p. 1-10. 2014.

MURDOCH, J. R., LLOYD, C. M. Chronic inflammation and asthma. **Mutation Research**. v. 690, p. 24–39, 2010.

NAKAJIMA, H.; IWAMOTO, I.; TOMOE, S.; MATSUMURA, R.; TOMIOKA, H.; TAKATSU, K.; YOSHIDA, S. CD4+ T-lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-

induced eosinophil infiltration into the mouse trachea. **Am Rev Respir Dis**, v.146, p.374-377,1992.

NAVEGANTES, K. C., DE SOUZA GOMES, R., PEREIRA, P. A. T., CZAIKOSKI, P. G., AZEVEDO, C. H. M., MONTEIRO, M. C. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. **Journal of Translational Medicine**. v. 15, n. 1, p. 1-21 2017.

NATIONAL HEART LUNG AND BLOOD INSTITUTE: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Highlights of expert panel report III, NIH Publication Number 08-5846. 2007.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. *Am J Kidney Dis*. 2002.

OECD - Guidelines for the Testing of Chemicals, 2001. OECD 423. Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OKANO, M. Mechanisms and clinical implications of glucocorticosteroids in the treatment of allergic rhinitis. **Clinical & Experimental Immunology**. v. 158, n. 2, p. 164–173. 2009.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. DE, PORTELLA JUNIOR, C. S. A., & COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, n. 1, p.S35-42, 2016.

OLNES, M. J., KOTLIAROV, Y., BIANCOTTO, A., CHEUNG, F., CHEN, J., YOUNG, N. S. *et al*. Effects of Systemically Administered Hydrocortisone on the Human Immunome. **Scientific Reports**. v. 6, n. 1, p. 1-15. 2016.

PACÍFICO L. G, MARINHO F. A, FONSECA C. T, BARSANTE M. M, PINHO V, SALES JUNIOR P. A, CARDOSO L. S, ARAÚJO M. I, CARVALHO E. M, CASSALI G. D, TEIXEIRA M. M, OLIVEIRA S. C; *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells independent of interleukin-10. **Infection and immunity**. v. 77, n. 1, p. 98-107, 2009.

PALEARI, D., ROSSI, G. A., NICOLINI, G., OLIVIERI, D. Ambroxol: a multifaceted molecule with additional therapeutic potentials in respiratory disorders of childhood. **Expert Opinion on Drug Discovery**. v. 6, n. 11, p. 1203–1214. 2011.

PEATE, I. Anatomy and physiology, 10. The respiratory system. **British Journal of Healthcare Assistants**. v. 12, n. 4, p. 178-181, 2018.

PANDYA, D., PUTTANNA, A., BALAGOPAL, V. Systemic Effects of Inhaled Corticosteroids: An Overview. **The Open Respiratory Medicine Journal**. v.8, suppl 1: m2, p. 59-65. 2014.

PARRA, E. R., PINCELLI, M. S., TEODORO, W. R., VELOSA, A. P. P., MARTINS, V., RANGEL, M. P., CAPELOZZI, V. L., et al. Modeling pulmonary fibrosis by abnormal expression of telomerase/apoptosis/collagen V in experimental usual interstitial pneumonia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 47, n. 7, p. 567–575. 2014.

PELAIA, G., VATRELLA, A., MASELLI, R. The potential of biologics for the treatment of asthma. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.11, n. 12, p. 958–972. 2012.

PERICLEOUS, M., SARNOWSKI, A., MOORE, A., FIJTEN, R., ZAMAN, M. The clinical management of abdominal ascites, spontaneous bacterial peritonitis and hepatorenal syndrome: a review of current guidelines and recommendations. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v. 28, p. e10-e18, 2016.

PERLROTH, N. H., BRANCO, C. W. C. Current knowledge of environmental exposure in children during the sensitive developmental periods. **Jornal de Pediatria**. v. 93, n. 1, p. 17-27, 2017.

PETERS, S. P., KUNSELMAN, S. J., ICITOVIC, N., MOORE, W. C., PASCUAL, R., AMEREDES, B. T., et al. Tiotropium Bromide Step-Up Therapy for Adults with Uncontrolled Asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n.18, p. 1715–1726, 2010.

PETERS, SP, BLEECKER, ER, CANONICA, GW, PARQUE, YB, RAMIREZ, R., HOLLIS, S., et al. Serious Asthma Events with Budesonide plus Formoterol vs. Budesonide Alone. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 9, p. 850–860, 2016.

PLATZER, B., STOUT, M., FIEBIGER, E. Functions of dendritic-cell-bound IgE in allergy. **Molecular Immunology**. v. 68, n. 2, p. 116–119. 2015.

PRICE, D., MUSGRAVE, S. D., SHEPSTONE, L., HILLYER, E. V., SIMS, E. J., GILBERT, R. F. T., HARVEY, I., et al. Leukotriene Antagonists as First-Line or Add-On Asthma-Controller Therapy. **Survey of Anesthesiology**, 56(3), 157–158, 2012.

RAFACHO, A., ORTSATER, H., NADAL, A., & QUESADA, I. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. **Journal of Endocrinology**, 223(3), R49–R62, 2014.

- RAM, H. N. A., MAKHIJA, I., SHREEDHARA, C. Mast cell stabilization potential of Sitopaladi churna: An ayurvedic formulation. **Pharmacognosy Research**, v. 5, n. 4, 306-308. 2013.
- RANGARAJ, N., PAILLA, S. R., & SAMPATHI, S. Insight into pulmonary drug delivery: Mechanism of drug deposition to device characterization and regulatory requirements. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. v.18, p. 1-61, 2018.
- RANG M.P., DALE M.M., RITTER J.M., MOORE P.K; **Farmacologia**. 5ªed. USA: Elsevier, 2004.
- REBER, L. L., & FAHY, J. V. Mast cells in asthma: biomarker and therapeutic target. **European Respiratory Journal**, 47(4), 1040–1042, 2016.
- REDDEL, H. K., BATEMAN, E. D., BECKER, A., BOULET, L-P., CRUZ, A. A. DRAZEN, J. M., HAAHTELA, T., *et al.* A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. **European Respiratory Journal**, v. 46, p. 622-639, 2015.
- REIS, A. P., CRUZ, A. A. Doença das pequenas vias aéreas na asma: revisão. **Brazilian Journal Allergy Immunology**. v. 1, n. 6, p. 313-318, 2013.
- REIS, A.C., ALESSANDRI, A.L., ATHAYDE, R.M., PEREZ, D.A., VAGO, J.P., ÁVILA, T.V., FERREIRA, T.P.T., ARANTES, A.C.S., COUTINHO, D.S., RACHID, M.A., SOUSA, L.P., MARTINS, M.A., MENEZES, G.B., ROSSI, A.G., TEIXEIRA, M.M., PINHO, V. Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. **Cell Death and Disease**. v. 6, p. 1-10, 2015.
- RENNARD, S. I., ROMBERGER, D. J., ROBBINS, R. A., SPURZEM, J. R. Is asthma a epithelial disease? **Chest**. v. 107, p. 127-131, 1995.
- RESTREPO, R. D. Use of Inhaled Anticholinergic Agents in Obstructive Airway Disease. **Respiratory Care**. V. 52, n. 7, p. 833-851, 2007.
- REUTER, S., STASSEN, M., TAUBE, C. Mast Cells in Allergic Asthma and Beyond. **Yonsei Medical Journal**. v. 51, n. 6, p. 797-807, 2010.
- ROLLAS, S., KUCUKGUZEL, S. G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, v. 12, p. 1910-1939. 2007.
- ROSTOM, S.A., SHALABY, M.A., EL-DEMELLAWY, M.A. Pirazoles polissubstituídos, parte 5.11 Para a parte 4: ver ref. [18] Síntese de novos análogos de hidrazida do ácido 1- (4-clorofenil) -4-hidroxi-1H-pirazole-3-carboxílico e alguns sistemas de anel derivados. Uma nova classe de potenciais agentes antitumorais e

anti-VHC. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38 n, 11-12, p. 959-974, 2003.

SÁ, R. C. S.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, v.18, n.1, p.1227–1254, 2013.

SANTOS, N.S.J; DRAIBE, S.A.; KAMIMURA, M.A; CUPPARI, L. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Revista de Nutrição**. v.17, n. 3, p. 339-349, 2004.

SEDWICK, C. Wanted: A New Model for Glucocorticoid Receptor Transactivation and Transrepression. **PLoS Biology**. v. 12, n. 3, p. e1001814. 2014.

SEO, J., LEE, C., HWANG, H. S., KIM, B., THAO, L. Q., LEE, E. S., OH, K. T., LIM, J., CHOI, H., YOUN, Y. S. Therapeutic advantage of inhaled tacrolimus-bound albumin nanoparticles in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse model. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. v. 36, p. 53-61, 2016.

SCHAEFER, C. J., RUHRMUND, D. W., PAN, L., SEIWERT, S. D., & KOSSEN, K. Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. **European Respiratory Review**, 20(120), 85–97, 2011.

SHEN, F., WANG, Z., WU, S., REN, S., MAN, R., WANG, B., ZHU, H. Synthesis of novel hybrids of pyrazole and coumarin as dual inhibitors of COX-2 and 5-LOX. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 27, p.3653–3660, 2017.

SHEN, Y., HUANG, S., KANG, J., LIN, J., LAI, K., SUN, Y., XIAO, W., YANG, L., YAO, W., CAI, S., HUANG, K., WEN, F. Management of airway mucus hypersecretion in chronic airway inflammatory disease: Chinese expert consensus (English edition). **International Journal of COPD**. v. 13, p. 399-407, 2018.

SHI, K., JIANG, J., MA, T., XIE, J., DUAN, L., CHEN, R., et al. Pathogenesis pathways of idiopathic pulmonary fibrosis in bleomycin-induced lung injury model in mice. **Respiratory Physiology Neurobiology**. v 190, p. 113-117, 2014.

SIDDIQUI, S.; SUTCLIFFE, A.; SHIKOTRA, A.; WOODMAN, L.; DOE, C.; MCKENNA, S.; WARDLAW, A.; BRADDING, P.; PAVORD, I.; BRIGHTLING, C. Vascular remodeling is a feature of asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, p. 813-819, 2007.

SILVA, G.A; COSTA, L. M. M.; BRITO, F.C.F.; MIRANDA, A. L.P.; BARREIRO, E. J. FRAGA, C.A.M. New class of potent antinociceptive and antiplatelet 10H phenothiazine-1- acylhydrazone derivatives. **Bioorg. Med. Chem**. v.12, p.3149-3158, 2004.

SILVA, E. C., DIAS, G. A.C. Patogenia da asma. **Revista HUPE**. v.12, n. 2, p. 31-40. 2013.

SILVA, S.C. Caracterização farmacológica pré-clínica da atividade anti-inflamatória de novos derivados *N*-acilhidrazônicos. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SMITH, M. R., GANGIREDDY, S. R., NARALA, V. R., HOGABOAM, C. M., STANDIFORD, T. J., CHRISTENSEN, P. J, et al. Curcumin inhibits fibrosis-related effects in IPF fibroblasts and in mice following bleomycin-induced lung injury. **American Journal Physiology Lung Cell Molecular Physiology**. v 5, p. 616-625, 2010.

SOOKVANICHSILP, N., NAKORNCHAI, S., WEERAPRADIST, W. Toxicological study of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone: acute and subchronic toxicity. **Drug and chemical toxicology**, v. 14, n. 4, p. 395-403, 1991.

SOUZA, A.B., SANTOS, F.B., NEGRI, E.M., ZIN, W.A., RIEKEN, P., ROCCO, M. Remodelamento do tecido pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo. **J Pneumol** 29(4), 2003.

SOUSA, L.P., ALINE F. CARMO, A.F., REZENDE, B.M., LOPES, F., SILVA, D.M., ALESSANDRI, A.L., BONJARDIM, C.A., ROSSI, A.G., TEIXEIRA, M.M., PINHO, V. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kB. *Biochemical Pharmacology*. v, 78, p. 396–405, 2009.

SOUZA, M.F.M., MALTA, D. C., FRANÇA, E.B., BARRETO, M, L. Transição da saúde e da doença no Brasil e nas Unidades Federadas durante os 30 anos do Sistema Único de Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 23, n. 6, p. 1737-1750, 2018.

STABLER, C. T., MORRISEY, E. E. Developmental pathways in lung regeneration. **Cell and Tissue Research**, v. 367, n. 3, p. 677–685, 2016.

STEFANOV, N. A., FOX, J., HASTON, C. K. Positional Cloning Reveals Strain-Dependent Expression of *Trim16* to Alter Susceptibility to Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. **PLoS Genet**, v 9, n. 1, p. e1003203, 2013.

STEINSVOLL, S., HELGELAND, K., & SCHENCK, K. Mast cells - a role in periodontal diseases? **Journal of Clinical Periodontology**, 31(6), 413–419, 2004.

STRYER, Lubert. *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman and Company, 2000.

STOLOFF, S. W. Pharmacologic Therapy for Asthma. **Asthma**. v. 1 n. 2 p. 17-38. 1998.

TANIGUCHI, H., KONDOH, Y. Acute and subacute idiopathic interstitial pneumonias. **Respirology**. v. 21, p. 810–820, 2016.

TANAKA, K., TANAKA, Y., NAMBA, T., AZUMA, A., MIZUSHIMA, T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Biochemical Pharmacology**. v. 80, n. 6, p. 920–931, 2010.

TIAN, P., WEN, F. Clinical significance of airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Translational Internal Medicine**. v. 3, n. 3, p. 89–92. 2015.

TILLES, S. A. Biomarkers in Allergic Diseases and Asthma: Essential Tools for Diagnosis and Treatment. **Immunology and Allergy Clinics of North America**. 2018.

TRAESEL, G. K., DE SOUZA, J. C., DE BARROS, A. L., SOUZA, M. A., SCHMITZ, W. O., MUZZI, R. M., ARENA, A. C., *et al.* Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 74, p. 320–325. 2014.

TSARTSALI, L., HISLOP, A. A., MCKAY, K., JAMES, A. L., ELLIOT, J., ZHU, J., SAGLANI, S., *et al.* Development of the bronchial epithelial reticular basement membrane: relationship to epithelial height and age. **Thorax**, v. 66, n. 4, p. 280–285. 2011.

TULIC, M. K., CHRISTODOULOPOULOS, P., HAMID, Q. Small airway inflammation in asthma. **Respiratory Research**, v. 2, n. 6, p. 333-339, 2001.

USMANI, O. S., SINGH, D., SPINOLA, M., BIZZI, A., & BARNES, P. J. The prevalence of small airways disease in adult asthma: A systematic literature review. **Respiratory Medicine**, 116, 19–27, 2016.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletronica de Farmacia**.v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VIGNOLA, A. M., BONSIGNORE, G., BOUSQUET, J., CHANEZ, P. Pathophysiological correlates of fatal asthma. **Pulmonary Biology in Health and Disease**, v 115, p. 139-155, 1998.

WALDMAN J, et al. The role of microvascular injury in the evolution of idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Clin Pathol.** v.119, p.556-67, 2003.

WANG, D., ZHU, J., WANG, S., WANG, X., OU, Y., WEI, D., *et al.* Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from *Bulbus Fritillariae Cirrhosae*. **Fitoterapia.** v.82, p. 1290-4, 2011.

WANG, G., BAINES, K. J., FU, J. J., WOOD, L. G., SIMPSON, J. L., MCDONALD, V. M., GIBSON, P. G. *et al.* Sputum mast cell subtypes relate to eosinophilia and corticosteroid response in asthma. **European Respiratory Journal.** v. 47, n. 4, p. 1123–1133. 2015.

WANG, X., OUYANG, Z., YOU, Q., HE, S., MENG, Q., HU, C., WU, X., SHEN, Y., SUN, Y., WU, X., XU, Q. Obaculactone protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology.** v. 303, p.21–29, 2016.

WARE, L. B., MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **New England Journal of Medicine.** v. 342, n. 18, p. 1334-49, 2000.

WECHSLER, M. E., LAVIOLETTE, M., RUBIN, A. S., *et al.* Bronchial Thermoplasty – Long Term Safety and Effectiveness in Severe Persistent Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.** v.132, n. 6, p. 1295–1302, 2013.

WEHRMEISTER, F. C., MENEZES, A. M. B., CASCAES, A. M., MARTINEZ-MESA, J., BARROS, A. J. D. Time trend os asthma in children and adolecents in Brazil, 1998-2008. **Revista Saúde Pública,** v. 46, n. 2, p. 242-250, 2012.

WERMUTH, C. G. Multitargeted drugs: the end of the "one-target-one-disease" philosophy? **Drug Discov. Today.**, v. 9, n. 19, p. 826-827, 2004.

WHITSETT, J. A., ALENGHAT, T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. **Nature Immunology,** v.16, n. 1, p. 27–35, 2015.

WU C, YANG G, BERMÚDEZ-HUMARÁN L. G, PANG Q, ZENG Y, WANG J, GAO X. Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice. **International Immunopharmacology.** v. 6, p. 610-615, 2006.

XIANG, J.; CHENG, S.; FENG, T.; WU, Y.; XIE, W.; ZHANG, M.; XU, X.; ZHANG, C. Neotuberostemonine attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by suppressing the recruitment and activation of macrophages. **International Immunopharmacology.** v. 36, p. 158-164, 2016.

XU, L., CAI, Z., YANG, F., & CHEN, M. Activation-induced upregulation of MMP9 in mast cells is a positive feedback mediator for mast cell activation. **Molecular Medicine Reports**, 15(4), 1759–1764, 2017.

YOU, X.; XUE, Q.; FANG, Y.; LIU, Q.; ZHANG, F.; ZHAO, C.; ZHANG, M.; XU, X, H. Preventive effects of Ecliptae Herba extract and its component, ecliptasaponin A, on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 175, p. 172-180, 2015.

YOON, M. S. The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Insulin Resistance and Metabolism. **Nutrients**, 8(7), 405, 2016.

ZHANG, Z., YU, X., FANG, X., LIANG, A., YU, Z., GU, P., ZENG, Y., HE, J., ZHU, H., LI, S., FAN, D., HAN, F., ZHANG, L., XIANGHUA, Y. Preventive effects of vitamin D treatment on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Scientific Reports** v. 5, p. 1-10, 2015.

ZHAO, C., FANG, X., WANG, D., TANG, F., & WANG, X. Involvement of type II pneumocytes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Medicine**. v. 104, n. 10, p. 1391–1395. 2010.

ZHOU-SUCKOW, Z., DUERR, J., HAGNER, M., AGRAWAL, R., & MALL, M. A. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. **Cell and Tissue Research**, v. 367, n. 3, p. 537–550, 2017.

ZHU, J., YAMANE, H., PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations*. **Annual Review Immunology**, v.28, p.445-89. 2010.

ZIMECKI, M., ARTYM, J., KOCIEBA, M., KALETA-KURATEWICZ, K., KRUZEL, M.L. Lactoferrin restrains allergen-induced pleurisy in mice. **Inflammation Research**. v. 61, p. 1247–1255, 2012.

ZUO, H., CATTANI-CAVALIERI, I., MUSHESHE, N., NIKOLAEV, V. O., SCHMIDT, M. Phosphodiesterases As Therapeutic Targets for Respiratory Diseases. **Pharmacology & Therapeutics**. p. 1-24. 2019.