



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**JÉSSICA VIEIRA CERQUEIRA**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE DERIVADO *N*-Acil-Hidrazona  
(HAH2) EM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA  
DAS VIAS AÉREAS INFERIORES**

Salvador, BA  
2017

**JÉSSICA VIEIRA CERQUEIRA**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE DERIVADO *N*-Acil-Hidrazona  
(HAH2) EM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA  
DAS VIAS AÉREAS INFERIORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Milena Botelho Pereira Soares

Co-Orientador: Dr<sup>a</sup> Luciana Souza de Aragão França

Salvador, BA  
2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cerqueira, Jéssica Vieira  
Efeito anti-inflamatório de derivado N-acil-hidrazona (HAH2)  
em modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas  
inferiores / Jéssica Vieira Cerqueira. -- Salvador, 2017.  
55 f. : il

Orientadora: Milena Botelho Pereira Soares.  
Coorientadora: Luciana Souza de Aragão França.  
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em  
Imunologia) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciências da Saúde, 2017.

1. Asma. 2. Inflamação alérgica das vias aéreas. 3. Modelo  
experimental. 4. Hidrazonas. I. Soares, Milena Botelho  
Pereira. II. França, Luciana Souza de Aragão . III. Título.

*Dedico o presente trabalho aos meus pais por todo amor, paciência e incondicional incentivo a minha escolha de seguir essa jornada científica.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pelo dom da vida, pela restauração constante da minha fé, “porque Tu és a minha rocha e a minha fortaleza; assim, por amor do teu nome, guia-me e encaminha-me, Salmo 31”*

*Ao meu orientador, Dr. Lain (in memoriam) pela oportunidade e confiança. Por nos ensinar que é possível ser um ser humano gentil e um profissional incrível!*

*A minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Milena Botelho Pereira Soares, por me acolher e tornar possível a conclusão deste trabalho.*

*A minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup> Luciana Aragão, por estar sempre presente durante esses anos de convivência, paciência e compreensão.*

*Aos meus pais, Magno e Cida, por terem colocado a educação como prioridade em minha vida, pela confiança, apoio e, sobretudo pelo imenso amor e carinho. As minhas irmãs Samara e Vanessa, por toda força que me dão mesmo de longe. E a Yuri, que com muita paciência e amor, superou cada obstáculo junto comigo.*

*A minha família, tios, tias, primos e primas, que sempre torceram pelo meu sucesso, aos meu vózinhos e avós (in memoriam) por serem nossos pilares! Em especial a tia Vera, Gabriela, Gal e Rai, pela convivência e cuidado.*

*A Dr Diogo Moreira e ao Msc. Cássio por toda a colaboração e ensinamentos que muito me enriqueceram durante esse período importante.*

*A Dr<sup>a</sup> Juliana Vasconcelos pela disponibilidade em ajudar durante todas as etapas.*

*As minhas primeiras parceiras de Laboratório, Candy, Cíntia, Vivi e Rafa que me receberam tão bem, e em especial a Manu, que continuou comigo até o fim dessa jornada.*

*As minhas parceiras de casa, Candy e Jessica, pelos conselhos, risadas e momentos, que por muitas vezes, me fizeram sentir em família.*

*Aos meus amigos do LETI, Carolzinha, Tati, Dahara, Pamela, Camila, Mari, Anna, Renan, Cassinho, vocês são inexplicáveis!!! Conviver com vocês diariamente tornou tudo mais leve.*

*A todos amigos do PPGIm, em especial a Regina e Marcus, por me ouvirem sempre com muita paciência. E a Anaque, por estar sempre disposto a ajudar.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, em especial aos professores, a Dilcéia, Jucy e Aline, por toda ajuda dedicada, por serem sempre tão disponíveis e prestativas.*

*As minhas amigas lindas da faculdade que ainda se fazem presente de maneira muito importante.*

*Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, divido com vocês essa conquista!*

*Obrigada!*

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender.”

Clarice Lispector

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

Coríntios 13:2

## RESUMO

### EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE DERIVADO *N*-Acil-Hidrazona (HAH2) EM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA DAS VIAS AÉREAS INFERIORES

Jéssica Vieira Cerqueira

Estima-se que cerca de 334 milhões de pessoas em todo mundo sofram de asma, e essas estimativas, bem como a gravidade dos sintomas, têm aumentado nas últimas décadas. A asma é uma doença inflamatória crônica, complexa e heterogênea, caracterizada por obstrução das vias aéreas inferiores. Atualmente os glicocorticóides são os fármacos mais utilizados no tratamento e controle dos sintomas da asma, porém seu uso prolongado pode causar efeitos adversos graves. Um grupo químico que tem demonstrado efeitos farmacológicos benéficos, como anti-inflamatórios, é o das hidrazonas, apresentando na sua estrutura básica centros ativos compostos por carbono e nitrogênio, os principais responsáveis pelas propriedades físicas e químicas da hidrazonas. O composto HAH2 (3,5-dinitro-*N*-(2-(4mitrofenil)hidrazino)propano-2-ilideno)benzohidrazida) é um derivado de *N*-acil-hidrazonas, que fazem parte de uma família de hidrazonas com estrutura química frequentemente utilizada para design de novos fármacos e de compostos heterocíclicos. O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito terapêutico do HAH2 em modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas. Camundongos BALB/c foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina por cinco dias consecutivos. O tratamento com HAH2 foi realizado por via oral 1 hora antes do desafio com antígenos. A administração de HAH2 causou redução da celularidade e dos eosinófilos no BALF (BALF, do inglês *broncho-alveolar lavage fluid*). O tratamento com HAH2 também reduziu citocinas do perfil de resposta Th2, IL-4, IL-5 e IL-13, de modo semelhante ao observado em camundongos tratados com dexametasona. Em contrapartida, a produção de IgE não foi significativamente alterada após o tratamento com HAH2. Os animais que receberam o tratamento com HAH2, também tiveram uma redução do infiltrado de leucócitos no tecido pulmonar, quando comparados com o grupo que recebeu apenas o veículo como tratamento. Além disso, foi observado uma redução na produção de muco dos animais tratados quando comparados com os que receberam apenas veículo. Os resultados mostraram que o composto HAH2 possui característica imunomodulatória, sugerindo potencial terapêutico para tratar doenças alérgicas.

**Palavras-chave:** Asma, inflamação alérgica experimental, *N* acil-hidrazonas



## ABSTRACT

### ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF DERIVATIVE *N*-Acyl-hydrazone (HAH2) IN MURINE MODEL OF ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATION LOWER

Jéssica Vieira Cerqueira

It is estimated that about 334 million people worldwide suffer from asthma, and these estimates, as well as the severity of symptoms, have increased in the last decades. Asthma is a chronic, complex and heterogeneous inflammatory disease, characterized by obstruction of the lower airways. Glucocorticoids are currently the most widely used drugs in the treatment and control of asthma symptoms, but their prolonged use can cause serious adverse effects. A chemical group that has demonstrated beneficial pharmacological effects, such as anti-inflammatories, is that of hydrazones, presenting in its basic structure active centers composed of carbon and nitrogen, the main ones responsible for the physical and chemical properties of the hydrazones. The HAH 2 compound (3,5-dinitro-*N*-(2-(4mitrofenil)hidrazino)propano-2-ilideno)benzohidrazida) is derived from the *N*-acyl-hydrazones, which are part of a hydrazone family of chemical structure often used to design novel drugs and heterocyclic compounds. The objective of this study was to investigate the therapeutic effect of HAH2 in a murine model of allergic airway inflammation. BALB/c mice were sensitized and challenged with ovalbumin for five consecutive days. Treatment with HAH2 was performed orally 1 hour prior to challenge with antigens. Administration of HAH2 caused reduction of cellularity and eosinophils in BALF (broncho-alveolar lavage fluid). Treatment with HAH2 also reduced cytokines in the Th2 response profile, IL-4, IL-5 and IL-13, similar to that seen in mice treated with dexamethasone. In contrast, IgE production was not significantly altered after treatment with HAH2. Animals that received HAH2 treatment also had a reduction in leukocyte infiltrate in lung tissue when compared to the group that received only vehicle as treatment. In addition, a reduction in the mucus production of the treated animals was observed as compared to those receiving vehicle alone. The results showed that the compound HAH2 possesses immunomodulatory characteristics, suggesting therapeutic potential to treat allergic diseases.

**Keywords:** Asthma, allergic airway inflammation, Hydrazone, *N*-Acyl Hydrazones

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Prevalência mundial de asma clínica .....	17
Figura 2.	Perfis de respostas imunológica das vias aéreas .....	20
Figura 3.	Sensibilização/reconhecimento do antígeno nas vias aéreas .	21
Figura 4.	Células Th2, Th17 e moléculas de sinalização que interagem para induzir uma resposta inflamatória .....	23
Figura 5.	Mecanismo de ação dos glicocorticoides .....	25
Figura 6.	Estrutura geral de hidrazonas .....	29
Figura 7.	Reação geral de formação de uma hidrazona e reação geral de formação de uma acilhidrazona .....	29
Figura 8.	Estrutura Química do HAH2 .....	34
Figura 9.	Protocolo experimental para o desenvolvimento de inflamação alérgica das vias aéreas .....	35
Figura 10.	Contagem de células totais e quantificação de eosinófilos em amostras do BALF .....	38
Figura 11.	Produção de citocinas em camundongos tratados com HAH2.	40
Figura 12.	Anticorpos de IgE específicos para ovalbumina em camundongos com inflamação alérgica de vias aéreas .....	41
Figura 13.	Histologia dos pulmões de camundongos naives e asmático ..	42
Figura 14.	Quantificação da inflamação nos pulmões dos camundongos.	43
Figura 15.	Análise da produção de muco em seções pulmonares coradas com PAS .....	44

## LISTA DE ABREVIações

<b>AMPc</b>	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
<b>APC</b>	Células apresentadoras de antígeno
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BALF</b>	Fluido do lavado broncoalveolar
<b>CD</b>	Células dendríticas
<b>COX</b>	Enzima cicloxigenase
<b>FcεRI</b>	Receptor de alta afinidade para IgE
<b>FcεRII</b>	Receptor de baixa afinidade para IgE
<b>GC</b>	Glicocorticoides
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
<b>GMPc</b>	Monofosfato cíclico de guanosina
<b>GR</b>	Receptor de glicocorticoides
<b>HAH2</b>	Composto Hidazina-N-acil-hidrazona 2
<b>IFN-γ</b>	Interferon gama
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>ILC</b>	Células linfoides inatas
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatratora de monócitos
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>NF-κB</b>	Fator de transcrição nuclear kappa B
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>PAS</b>	Coloração ácido periódico-Schiff
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PDE4</b>	Inibidores de fosfodiesterase 4

<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>SCF</b>	Fator de células-tronco
<b>TCD4+</b>	Células T que expressam na superfície a molécula CD4
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>Th</b>	Células T auxiliares
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de transformação do crescimento-alfa

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	DEFINIÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ASMA .....	16
<b>2.2</b>	IMUNOPATOLOGIA DA ASMA .....	18
<b>2.3</b>	ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NA ASMA.....	23
<b>2.3.1</b>	Corticóides (ou corticosteróides) .....	24
<b>2.3.2</b>	Agonistas $\beta$ 2-adrenérgicos .....	26
<b>2.3.3</b>	Inibidores de fosfodiesterase (PDE) 4 .....	26
<b>2.3.4</b>	Terapia anti-IgE .....	27
<b>2.4</b>	HIDRAZONAS .....	28
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE E OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1</b>	HIPÓTESE .....	32
<b>3.2</b>	OBJETIVO GERAL .....	32
<b>3.3</b>	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1</b>	ANIMAIS .....	33
<b>4.2</b>	COMPOSTO HAH2 .....	33
<b>4.3</b>	MODELO DE INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR .....	34
<b>4.4</b>	OBTENÇÃO DO SORO E LAVADO BRONCOALVEOLAR .....	35
<b>4.5</b>	ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	36
<b>4.6</b>	MENSURAÇÃO DE IgE NO PLASMA E MENSURAÇÃO DE CITOCINAS .....	36
<b>4.7</b>	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1</b>	EFEITO DO HAH2 SOBRE A INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS INDUZIDA POR OVA .....	37
<b>5.2</b>	EXPRESSÃO DE CITOCINAS TH2 INDUZIDA POR OVA E PRODUÇÃO DE IgE .....	38
<b>5.3</b>	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE PULMÕES DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM HAH2 .....	41
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A asma é um distúrbio respiratório, com interações complexas que envolvem obstrução do fluxo aéreo, hiperresponsividade, limitação do fluxo expiratório e inflamação (Alizadeh et al., 2017). Comumente caracterizada como uma doença inflamatória crônica, a asma é um complexo heterogêneo de múltiplos fenótipos clínicos, apresentando diferentes respostas às terapias farmacológicas (Kong et al., 2017; Calciano et al., 2017). A maioria dos pacientes asmáticos pode alcançar um bom controle de seus sintomas usando tratamentos padrão, incluindo corticosteroides inalatórios. No entanto, apesar de uma terapia otimizada, uma minoria de indivíduos não responde adequadamente ao tratamento e apresentam exacerbações frequentes (Pelaia et al., 2016).

De acordo com os dados publicados na "*Global initiative for asthma*" (GINA) em 2014, estima-se que o número de pessoas com asma em todo o mundo pode chegar a 334 milhões. Este número vem das análises mais recentes do Global Burden of Disease Study (GBD) realizadas em 2008-2010. Estudos demonstram que a prevalência de asma tem aumentado em todo o mundo, afetando tanto os países desenvolvidos como os em desenvolvimento (Pearce et al., 2007). No Brasil, ainda são poucos os estudos epidemiológicos referentes à asma. Dados do "*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*" (ISAAC), publicados pela GINA, revelaram um aumento na prevalência da asma, afetando principalmente crianças entre 13-14 anos, refletindo em quase 10% das crianças brasileiras. Esses dados apontam a asma como uma doença de alto impacto na população, devendo ser encarada como um problema de saúde pública (Sole, 2005; Solé et al., 2014)

Associada ao acúmulo e ativação de células inflamatórias, a asma frequentemente exibe um perfil de resposta promovido por células TCD4+ auxiliares do tipo 2 (Th2, do inglês *T-helper 2*), com presença de eosinófilos e mastócitos no interior da mucosa brônquica (Miyasaka et al., 2017). A produção de citocinas, como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 produzidas por células Th2 sensibilizadas por alérgenos, induzem eosinofilia nas vias aéreas, inflamação crônica e outras alterações patológicas, características da

asma atópica (Bao et al., 2017). A produção de imunoglobulina E (IgE) específica ao alérgeno também é promovida, bem como a ativação de mastócitos, que uma vez sensibilizados, irão degranular e liberar mediadores como histamina, leucotrienos, e fatores quimiotáticos de neutrófilos e eosinófilos (Antwi, Obiri e Osafo, 2017). Esses mediadores promovem vasodilatação, edema e broncoconstrição, além de recrutarem outras células imunes para o local da inflamação (AL-Kouba et al., 2017).

Os objetivos no controle da asma são a melhoria dos sintomas e a redução do risco futuro para o paciente, incluindo exacerbações da doença (GINA, 2017). A terapia para asma mais eficaz até o momento, é o uso de corticosteroides inalatórios, ou uso oral em casos mais graves (Jenkins et al., 2017). O uso de inaladores combinados que contêm um corticosteroide e um agonista adrenérgico  $\beta_2$  de ação prolongada, tem sido o tratamento mais recomendado (Barnes, 2004). A maioria dos casos de asma pode ser bem controlada usando fármacos atualmente disponíveis, no entanto, existem um número crescente de asmáticos, cuja doença não é controlada, particularmente aqueles com asma grave (Rolph et al. 2006). Esses pacientes são pouco responsivos aos glicocorticoides e precisam de doses maiores de medicamento, o que pode ocasionar em efeitos adversos como: refluxo, mudanças de humor, hipertensão, diabetes e síndrome metabólica (Barnes, 2011; GINA 2017; Sullivan et al., 2017).

Embora tenham sido feitos avanços na compreensão da asma, o progresso no tratamento é relativamente lento e as terapias efetivas que controlam a inflamação da asma grave ainda são limitadas (Fahy, 2015). Desta maneira, esforços devem ser feitos para desenvolver novas terapias com menos efeitos adversos e que melhore a qualidade de vida do paciente.

Nesse contexto, evidências descritas na literatura apontam a importância das hidrazonas na síntese de compostos heterocíclicos, sendo compostos orgânicos com importantes atividades biológicas como por exemplo: antioxidantes, anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, analgésicos e antimicrobianos (Bala et al., 2013; Kajal et al., 2014). Estudos demonstram que o grupamento químico das hidrazonas apresentam características farmacológicas para a inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX) que é chave

para desencadear a biossíntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, que estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, assim como em processos patológicos, como a inflamação (De Leval et al., 2000; Reis et al., 2010).

Diante do exposto, o presente trabalho apoia-se no efeito imunomodulatório já descrito dos derivados de hidazonas para um possível tratamento de doenças alérgicas, com intuito de propor novas alternativas terapêuticas para alergias respiratórias.



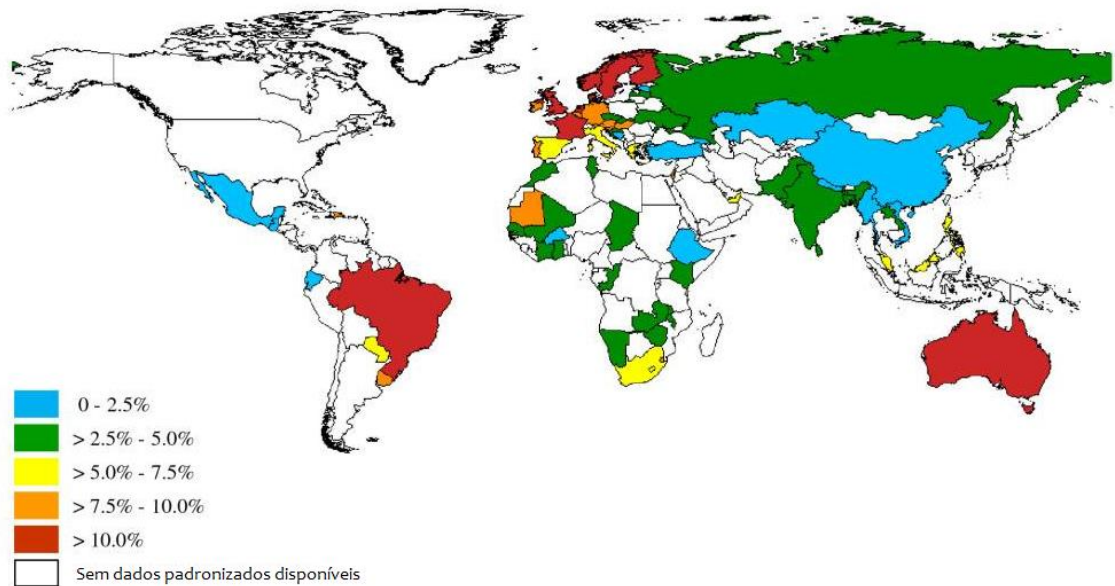
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DEFINIÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ASMA

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, levando a obstrução variável do fluxo aéreo, com tosse, dispneia e sibilância (Silkoff et al., 2015). Com um alto impacto social e econômico, a asma afeta cerca de 335 milhões de pessoas em todo o mundo (Brook et al., 2015; GINA, 2014). A alta prevalência faz com que a asma seja considerada um grave problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de utilização dos recursos de saúde e má qualidade de vida para aqueles que são afetados (To et al., 2014). A doença afeta indivíduos de ambos os sexos em todas as faixas etárias e pode ser fatal, estando mais presente em países desenvolvidos (Lai et al., 2009).

A prevalência clínica de asma, realizada com diagnóstico médico, é de 4,5% para a população mundial, representando cerca de 315 milhões de indivíduos com asma. No entanto, há uma prevalência auto relatada de sintomas de asma que chegam 8,6%, o que leva a um número aproximado de 623 milhões de indivíduos em todo o mundo, que vivem com algum sintoma relacionado à asma (To et al., 2012). Embora alguns países tenham registrado um declínio nas internações e mortes relacionadas com a asma, muitos pacientes apresentam quadros de exacerbações da doença e os sintomas aumentaram quase que 30% nos últimos 20 anos (Reddel et al., 2015).

O estudo internacional de asma e alergias na infância (International Study of Asthma and Allergies in Childhood - ISAAC) mostrou um aumento acentuado da prevalência de asma em todo o mundo ao longo das últimas décadas (Figura 1), sendo que no Brasil, esses números são de aproximadamente 20% entre crianças de 13 a 14 anos (Solé et al., 2014). Esse percentual é um dos mais altos da América Latina, tornando a asma a quarta principal causa de hospitalização através do Sistema Unificado de Saúde (Gazzotti et al., 2013).



**Figura 1: Prevalência mundial de asma clínica**, adaptado de To et al., 2014.

Dentre os diversos fatores de risco associados à morte por asma, destaca-se o tabagismo, cuja prevalência entre os indivíduos com a doença é de 20% a 35%, com predomínio entre as mulheres (Silva e Silva, 2013). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013) a frequência percentual de mulheres que referiram diagnóstico médico de asma foi 30% maior em relação à proporção de homens. De tal modo, a prevalência, gravidade, taxa de exacerbação, hospitalizações e mortalidade por asma são maiores entre as mulheres do que entre os homens em geral (Zein e Erzurum, 2015).

Apesar de a maioria dos casos de asma ser desenvolvido durante a infância, dados mostram que nos Estados Unidos, a asma de início adulto é fenótipo dominante, acometendo mulheres de 40 anos de idade (Ilmarinen et al., 2015). Os fatores que predisõem a asma de início tardio incluem, além do sexo feminino, obesidade, exposição ocupacional, rinite, infecções respiratórias, tabagismo, eventos de vida estressantes e baixo nível de função pulmonar (Jamrozik et al., 2009). Um histórico de doença atópica também está diretamente ligado a asma, sendo comum em indivíduos asmáticos, e está presente em até 80% dos casos. Em crianças, a sensibilização com aeroalérgenos é um fator de risco para desenvolvimento e exacerbações da doença (Darveaux e Lemanske, 2014). Outros estudos mostram que pacientes com algum tipo de alergia alimentar também possuem um risco aumentado de desenvolver asma (Liu et

al., 2010). O que sugere a existência de uma variedade de mecanismos relacionados ao desenvolvimento da asma (Ilmarinen et al., 2015).

Os sintomas respiratórios de asma como: dispnéia, tosse, sibilância e aperto no peito, são utilizados para diagnosticar a doença e monitorar a resposta ao tratamento e controle (Krishnan et al., 2012). Os sintomas podem ser avaliados sozinhos ou em conjunto com outros parâmetros que caracterizam a asma, como limitação na realização de atividade física e função pulmonar (Krishnan et al., 2012). De acordo com a ocorrência e repetição dos sintomas, a asma pode ser classificada como asma leve, sendo representada pela maior parte dos indivíduos afetados, que apresentam um menor número de exacerbações, menor prevalência de características atópicas e função pulmonar preservada; em asma grave, com um número maior de exacerbação, carga atópica muito alta e função pulmonar reduzida.; e em subgrupos com níveis intermediários de gravidade e características clínicas mais heterogêneas (Howrylak et al., 2014). Geralmente, os sintomas e a limitação do fluxo de ar podem ser revertidos espontaneamente ou após a administração de medicamentos, ou simplesmente podem se ausentar por semanas ou meses (GINA, 2014).

Sendo que atopia refere-se a uma tendência hereditária de produzir anticorpos de imunoglobulina E (IgE) em resposta a quantidades pequenas de proteínas comuns do ambiente, como pólen, ácaros da poeira doméstica e alérgenos alimentares (Thomsen, 2015). A presença de atopia em um indivíduo está associada a um risco aumentado de desenvolver uma ou mais das doenças atópicas, como dermatite atópica, asma e rinoconjuntivite alérgica (Thomsen, 2015).

## IMUNOPATOLOGIA DA ASMA

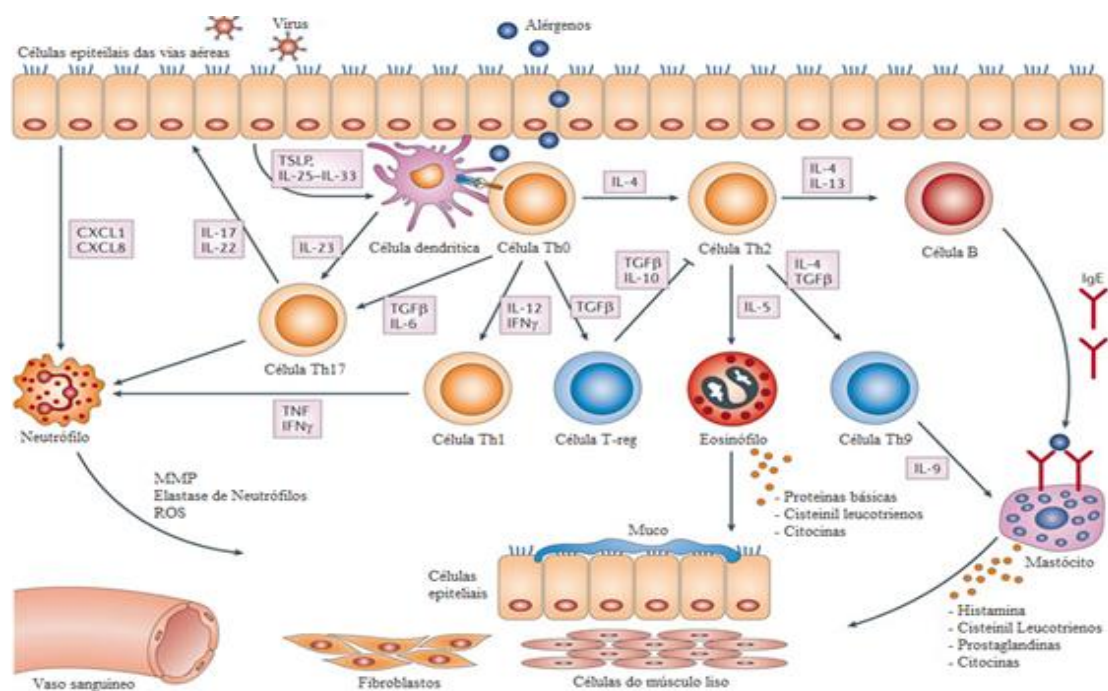
A patogênese da asma é complexa e varia de acordo o fenótipo clínico. As interações complexas entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, predisõem os pacientes a desenvolver um número limitado de padrões imunológicos disfuncionais, definindo a apresentação do quadro clínico (Olin e Wechsler, 2014).

Na asma, uma variedade de células como mastócitos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos T e células dendríticas (CDs) são recrutadas para o tecido pulmonar, promovendo inflamação das vias aéreas e o seu remodelamento, com participação das células endoteliais e do músculo liso (Kumar e Ghosh, 2009). As CDs são células apresentadoras de antígenos (APC – do inglês *antigen presenting cell*) do sistema imunológico, caracterizadas principalmente por sua capacidade de induzir respostas imunes primárias. Fazem parte da imunidade inata e desempenham papel decisivo no início de respostas imunes adaptativas contra antígenos (Merad et al., 2013). Quando as CDs se tornam ativas, há a internalização de proteínas imunogênicas, que são processadas e apresentadas via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II – do inglês *Major histocompatibility complex*) para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens (Th0 CD4<sup>+</sup>), que identificam o alérgeno através de receptores de reconhecimento de células T (TCR) (West et al., 2013). Sabe-se que o número e o estado de maturação das CDs no pulmão estão aumentados quando há um contato secundário com alérgenos e durante a inflamação crônica das vias aéreas (Zeng et al., 2015).

Essa sinalização entre APCs e linfócitos T induz uma resposta imunológica, gerando diferentes subpopulações de células Th, tais como células Th1 Th2 e Th17. As células Th1 secretam interleucina-2 (IL-2), interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e estimulam a resposta imune auxiliar do tipo 1. As células Th2 secretam principalmente as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e estimulam a resposta imune auxiliar do tipo 2, que é caracterizada por altos níveis de anticorpos IgE e eosinofilia (Fahy, 2015). Já as células Th17, produz IL-17 que é importante na regulação da inflamação neutrofílica (Figura 2) (Wang e Wills-Karp, 2011). A forma mais comum de asma alérgica está associada a uma inflamação mediada por células Th2, que inclui a síntese de IgE específica para o alérgeno, induzida por IL-4, recrutamento de eosinófilos mediado por IL-5 e a IL-13 atua na hiperplasia de células caliciformes do epitélio bronquiolar, levando a superprodução de muco, hiperresponsividade das vias aéreas e fibrose (Huber e Lohoff, 2015).

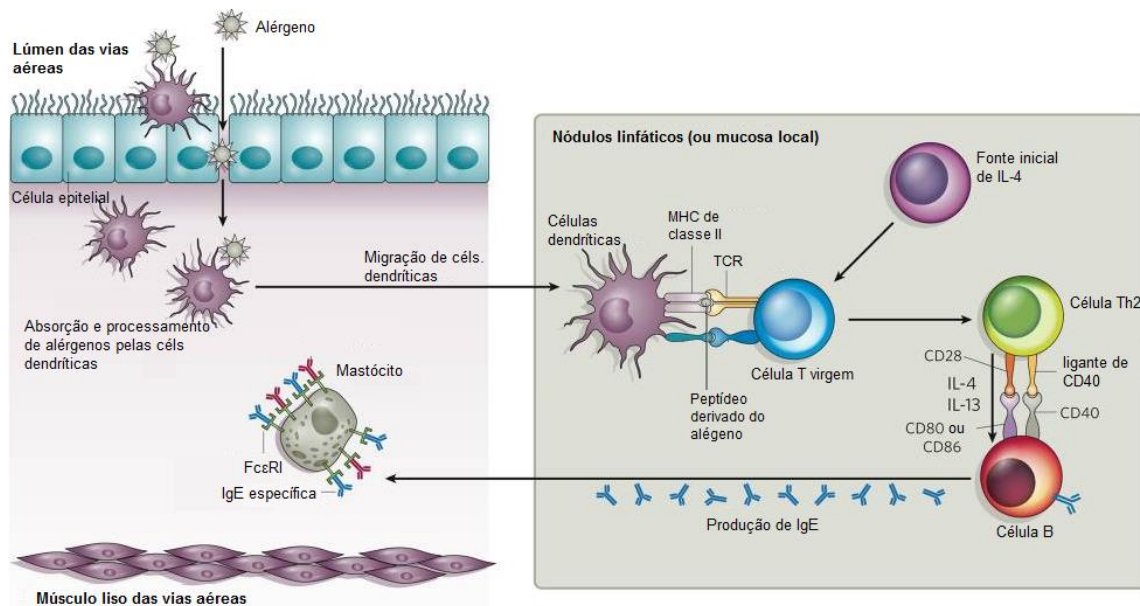
Por mais de 30 anos, anticorpos do isotipo IgE foram reconhecidos por desempenhar um papel fundamental na asma (Duncan e Fahy, 2015). A IgE tem capacidade de aumentar as respostas imunológicas aos antígenos específicos

(Mizutani et al., 2015), e sensibilizam os mastócitos, basófilos e CDs por se ligar aos receptores de IgE de alta afinidade (FcεRI), que estimulam a ativação dessas células durante a exposição ao alérgeno (Dunican e Fahy, 2015) (Figura 3). Acredita-se que a sensibilização antigênica ocorre principalmente em centros germinativos linfáticos, mas as células B produtoras de IgE que sofrem seleção clonal e maturação por afinidade também podem ser geradas na mucosa respiratória (Galli e Tsai, 2012). A participação das células T fornece sinais cruciais que determinam a troca de classe nas células B, tanto através de interações diretas quanto através de citocinas. No caso do IgE, o ligante CD40 (CD40L), expresso em células T ativadas, se liga ao CD40 expresso nas células B, esse estímulo CD40/CD40L é acompanhado por um sinal mediado por IL-4. O processo de mudança de isotipo é então ativado e direcionado para a produção de IgE (Burton e Oettgen, 2011) (Figura 3).



**Figura 2: Perfis de resposta imunológica das vias aéreas.** A asma se origina de interações complexas entre fatores genéticos e agentes ambientais, como aeroalérgenos e vírus respiratórios. Em particular, dentro do lúmen das vias aéreas, os alérgenos podem ser reconhecidos por células dendríticas, que os processam em moléculas antigênicas e apresentam para células Th0. A consequente ativação de

células TH2 específicas a alérgenos é responsável pela produção de citocinas e quimiocinas múltiplas que produzem uma resposta alérgica (Darveaux e Busse, 2015). Adaptado de Pelalia, et al., 2012 *Nature Rev Drug Discov*.



**Figura 3: Sensibilização/reconhecimento do antígeno nas vias aéreas.** O alérgeno é reconhecido por células dendríticas que a partir de então, são ativadas, amadurecem e migram para os gânglios linfáticos ou para na mucosa local, onde apresentam peptídeos derivados do alérgeno via MHC II para células T virgens. Na presença de IL-4 (potencialmente derivada de uma gama de células, incluindo basófilos, mastócitos, eosinófilos, células NK e células T), as células T virgens se diferenciam em células Th2, que produzem IL-4 e IL-13. Na presença destas citocinas, há a ligação de moléculas coestimuladoras (CD40 e CD40L) que vão promover a mudança de classe de imunoglobulina para IgE específica para o antígeno nos linfócitos B. Adaptado de Galli et al. 2008, *Nature*.

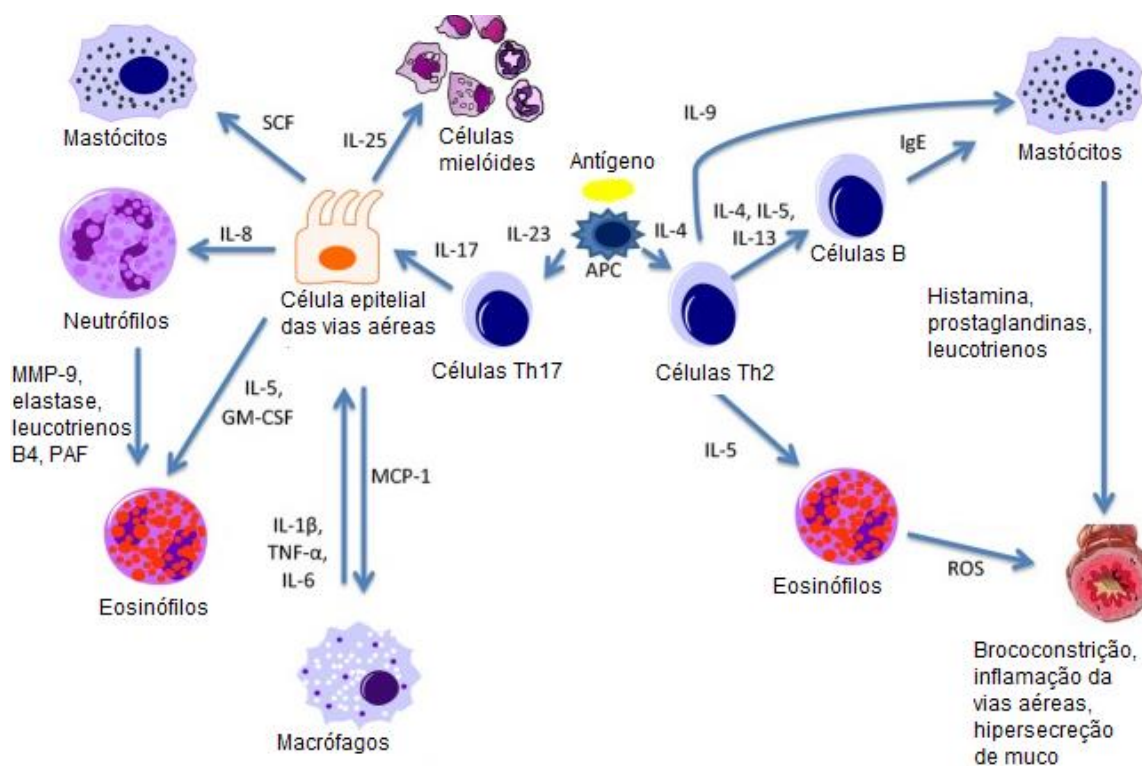
Os eosinófilos constituem as principais células do infiltrado inflamatório pulmonar em indivíduos asmáticos. De fato, a eosinofilia tecidual está presente em 40 a 60% dos pacientes com asma (Patterson et al., 2015). Os eosinófilos auxiliam na resposta imune inata desencadeada por alérgenos ambientais nas vias aéreas, infecções virais e outros estímulos estranhos, e a ativação dessas células pode levar a danos e remodelação dos tecidos (Patterson et al., 2015). A IL-5 é a principal citocina responsável pela produção, sobrevivência e

maturação dos eosinófilos, melhorando a citotoxicidade eosinofílica e a secreção de mediadores químicos. Comumente, é produzida por células Th2, no entanto, IL-5 também foi encontrada sendo produzida por células linfóides inatas do grupo 2 (ILC2 - do inglês *Innate lymphoid cells*) e em quantidades menores por mastócitos e eosinófilos (Cardet e Israel, 2015).

A inflamação alérgica pode ser dividida em duas fases que se diferenciam pela ordem temporal dos eventos. A primeira fase, de reação imediata é induzida segundos ou minutos após o contato com o alérgeno, e as reações de fase tardia ocorrem depois de algumas horas (Galli et al. 2008). As reações de fase imediata refletem principalmente na secreção de mediadores por mastócitos no local afetado. Em indivíduos sensibilizados, esses mastócitos já possuem IgE específica para alérgenos ligados aos receptores FcεRI (Galli et al. 2008). As reações de fase tardia são coordenadas em parte, por efeitos a longo prazo dos mediadores liberados por mastócitos ativados durante as reações de fase inicial e também por células T estimuladas pelo antígeno. As características clínicas das reações de fase tardia refletem nas atividades das células residentes e dos leucócitos circulantes que são recrutados para o local (Galli et al. 2008).

Apesar da asma ser classicamente caracterizada por infiltrado inflamatório de linfócitos Th2, as células Th17 têm demonstrado desempenhar papel significativo na inflamação das vias aéreas (Trevor e Deshane, 2014). Alguns estudos indicam que os níveis de IL-17 são elevados nas vias aéreas de indivíduos com asma grave. A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória, importante para induzir o recrutamento e migração de neutrófilos em locais de inflamação (Morishima et al., 2013). Enquanto as células Th2 se diferenciam na presença de IL-4, as células Th17 precisam de IL-23 para serem ativadas (Figura 4). A IL-17 secretada por células Th17 atuam em células epiteliais das vias aéreas estimulando a liberação de fatores, como a proteína quimiotática de monócitos do tipo 1 (MCP-1 - do inglês *Monocyte chemoattractant protein-1*) que recruta macrófagos; IL-5 e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF - do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) que ativam eosinófilos; IL-8 que mobiliza neutrófilos; fator de células-tronco (SCF - do inglês *Stem cell factor*) que trabalha para promover a sobrevivência dos mastócitos; e IL-25 que induz células mielóides a libertar citocinas de tipo Th2.

Os neutrófilos liberam a metaloproteínase 9 da matriz (MMP9 - do inglês *Matrix Metalloproteinase 9*), a elastase, o leucotrieno B4 e o fator ativador de plaquetas (PAF - do inglês *Platelet activating factor*), que funcionam para aumentar a atividade dos eosinófilos. Os macrófagos ativados liberam IL-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$  - do inglês *The tumor necrosis factor-alpha*) e IL-6 que interagem com outras células inflamatórias e resultam em um circuito de *feedback* positivo com células epiteliais das vias aéreas (Trevor e Deshane, 2014).



**Figura 4: Células Th2, Th17 e moléculas de sinalização que interagem para induzir uma resposta inflamatória.** Adaptado de Trevor e Deshane, *Allergy*, 2014.



### 2.3 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NA ASMA

Apesar do aumento na compreensão dos mecanismos patológicos da asma, as ações práticas para diminuir seus sintomas e efeitos nos indivíduos afetados, estão muito atrás do conhecimento científico. Ainda há relatos sobre o diagnóstico errôneo e o mau tratamento da asma, levando a episódios de exacerbações graves da doença, muitas vezes exigindo cuidados de emergência e hospitalização (Kupczyk et al., 2010).

A terapia farmacológica é parte integrante, e talvez a mais importante de todas as medidas incluídas, para controlar a asma (Goseva et al., 2015). Os fármacos comumente utilizados no tratamento da doença reduzem a inflamação do trato respiratório e levam ao alívio do broncoespasmo, mas não oferecem uma cura, assim os sintomas tendem a reaparecer quando o tratamento é interrompido (Quirce et al., 2014). Os corticosteroides inalatórios (como budesonida, fluticasona e ciclesonida) são eficazes na supressão da resposta inflamatória e seus benefícios clínicos na terapia da asma são constantemente enfatizados (Loke et al., 2015). No entanto, o seu uso prolongado gera preocupações devido aos seus efeitos adversos, que incluem redução significativa na densidade óssea e redução do crescimento em crianças (Lipworth, 1999; Loke et al., 2015). Já os agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos neutralizam o broncoespasmo. Essas duas classes de fármacos são eficazes quando usados de forma combinada para tratar pacientes com sintomas de asma e exacerbações (Olin e Wechsler, 2014).

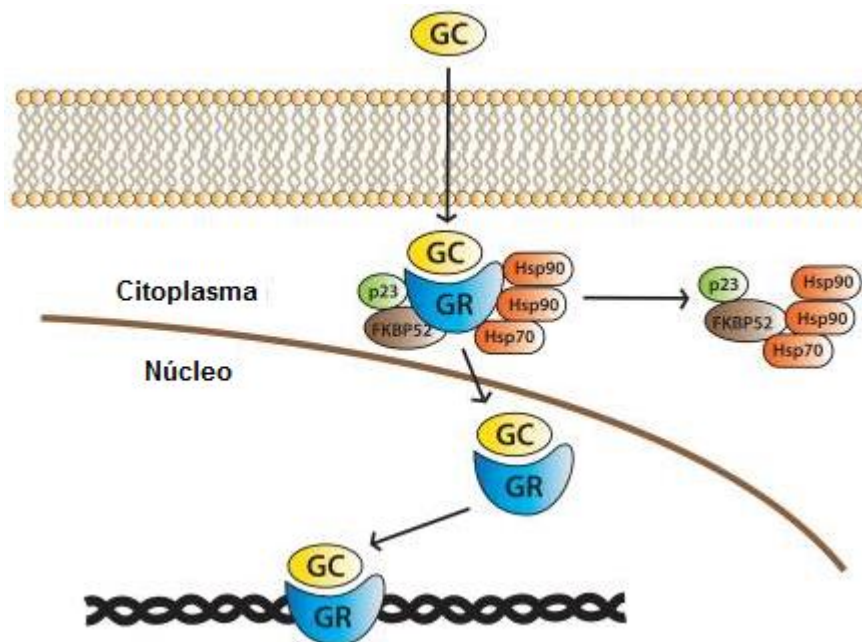
Embora a terapia com agentes glicocorticoides, em geral, apresente êxito no controle da asma, uma proporção considerável de asmáticos não responde ao tratamento. Essa variabilidade na resposta pode ser atribuída a diferentes mecanismos subjacentes a inflamação das vias aéreas (Cowan et al., 2015). Avanços no entendimento da imunopatologia da asma sugerem que terapias biológicas que foquem no bloqueio de citocinas envolvidas no processo de exacerbação, podem ser potencialmente úteis no controle da asma. O principal intuito da terapia deve ser centralizado na redução da inflamação e do

remodelamento tecidual, protegendo os pacientes contra a perda progressiva da função pulmonar (Pelaia et al., 2012).

### 2.3.1 Corticóides (ou corticosteróides)

Os glicocorticóides (GC) pertencem a uma classe de corticoides, e exercem os seus efeitos terapêuticos por ligação e formação de um complexo com o receptor de GC intracelular (Figura 5). Este complexo é ativado e migra para o núcleo, onde altera de forma direta a transcrição de genes envolvidos na inflamação através da sua interação com o DNA, ou de forma indireta pela interação com outros fatores de transcrição (Figura 5) (Tse et al., 2011). Este complexo é capaz de bloquear a atividade do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B - do inglês Nuclear factor- $\kappa$ B), que estimula a transcrição de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e seus respectivos receptores (Beigelman et al., 2015). Powell e colaboradores, em 2001, mostraram que os glicocorticóides inibem expressão gênica de citocinas como IL-5, IL-3 e GM-CSF, que são mediadores envolvidos na proliferação celular inflamatória e na regulação de eosinófilos.

Além de atuarem a nível nuclear, os glicocorticoides também exercem efeitos não genômicos, que incluem sinalização através de receptores associados à membrana e receptores de segundo sinal. No que diz respeito a doenças pulmonares, os efeitos incluem a morte acelerada de eosinófilos (apoptose) e a vida útil prolongada dos neutrófilos pela inibição da apoptose. Os corticosteróides também têm efeito vasoconstritor, resultando em diminuição do edema nas vias aéreas e menor vazamento microvascular. Além disso, reduzem a produção de muco das vias aéreas (Beigelman et al., 2015).



**Figura 5: Mecanismo de ação dos glicocorticóides.** A ligação dos glicocorticóides (GC) ao receptor de glicocorticóide intracelular (GR) resulta na ativação do complexo GC-GR e dissociação de proteínas inibitórias que geralmente mantêm o GR inativo. Estas incluem Hsp90, Hsp70 (proteínas de choque térmico), a fosfoproteína p23 e FKBP52. O complexo GC-GR migra até o núcleo onde altera a transcrição de genes envolvidos na inflamação. Adaptado de Tse et al., 2011, *The Pharmacogenomics Journal*.

### 2.3.1 Agonistas $\beta$ 2-adrenérgicos

A administração de agonistas do receptor  $\beta$ 2-adrenérgicos é a terapia principal durante episódios de broncoespasmos, proporcionando alívio significativo aos asmáticos. No entanto, a terapia crônica com  $\beta$ -agonista também foi associada a falta de controle na asma e piora da doença (Walker e DeFea, 2014). Os receptores  $\beta$ 2 são acoplados a proteína G, e amplamente distribuídos nas vias aéreas, estando presentes em diversos tipos celulares que participam da patogênese da asma (Barnes 2011). Após a ligação aos seus agonistas (por exemplo, epinefrina endógena) os adrenoreceptores  $\beta$ 2, promovem ativação da adenilato ciclase, estimulando a subunidade  $\beta\gamma$  da proteína Gs, que converte a adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3,5'-monofosfato cíclica (AMPC), a qual ativa a proteína quinase A (PKA, do inglês). A ligação do AMPC às subunidades reguladoras da proteína quinase dependente

de AMPc, libera a subunidade catalítica da PKA e a PKA ativada exerce uma série de efeitos nas vias aéreas (Pera e Penn, 2014).

Apesar da sua eficiência como broncodilatadores, os agonistas  $\beta_2$  tem sua utilização limitada devido aos efeitos adversos e também pela dificuldade em se adequar ao tratamento apresentada por alguns pacientes. Os efeitos adversos estão associados a doses altas dos agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos, seja por via oral ou inalatória. Os efeitos mais frequentes são tremores, câimbras musculares, taquicardias e distúrbios metabólicos (Lipworth, 2007).

### 2.3.2 Inibidores de fosfodiesterase (PDE) 4

As fosfodiesterases nucleotídicas cíclicas (PDEs) são conhecidas como uma superfamília de enzimas que hidrolisam nucleotídeos cíclicos e, portanto, desempenham um papel fundamental na regulação dos níveis intracelulares de AMPc e monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e, portanto, na função celular (Boswell-Smith et al., 2006). A família PDE4 foi identificada como a mais diversificada de todas as famílias de PDE (Eskandari et al., 2015). As enzimas desta família são amplamente distribuídas em diferentes tecidos, estando presente em vários órgãos, sendo muito abundantes nas células respiratórias e inflamatórias das vias aéreas de doenças pulmonares como a asma (Eskandari et al., 2015).

Os inibidores de PDE4 bloqueiam a ação de degradação de AMPc por ligação competitiva ao local catalítico de AMPc, resultando em uma redução nas respostas imunes Th1, Th2 e Th17. Como resultado da inibição da PDE4, há um aumento no nível de AMPc intracelular, o que leva a uma redução nos mediadores inflamatórios e ao aumento de mediadores anti-inflamatórios (Gooderham e Papp, 2015). Segundo dados da literatura, é possível observar que pacientes atópicos apresentam um aumento na expressão de PDE4 (Barnes 2004). Deste modo, a família das fosfodiesterases do tipo 4 tem atraído considerável interesse nas últimas décadas como alvo no tratamento.

A teofilina, um importante inibidor não-seletivo fraco das PDE4, relaxa o músculo liso das vias aéreas através da regulação de AMPc. Elas também demonstraram eficácia na atenuação das três características principais da asma

- obstrução do fluxo de ar reversível, hiperresponsividade e inflamação das vias aéreas (Goseva et al., 2015; Margay et al., 2015). O que tornou a teofilina um tratamento de terceira linha como terapia complementar em pacientes com asma mal controlada segundo as diretrizes do GINA (GINA, 2014).

### 2.3.1 Novas terapias: anti-IgE

Já é conhecido o importante papel que os anticorpos IgE desempenham no desenvolvimento da inflamação crônica das vias aéreas. Os níveis elevados de IgE específico para alérgenos ambientais comuns representam um componente chave na patogênese da asma alérgica (D'Amato et al., 2014). Pensando nisso, novas estratégias terapêuticas que visam controlar as respostas mediadas por IgE são importantes para o tratamento de doenças alérgicas.

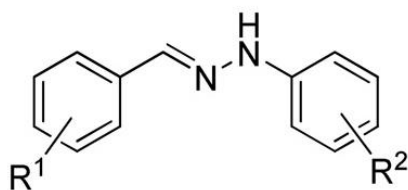
O omalizumabe é um anticorpo monoclonal anti-IgE recombinante humanizado (Yalcin., 2015), aprovado em 2003 nos Estados Unidos pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e em 2005 na União Européia pela Agência Européia de Medicamentos como um tratamento complementar para pacientes com idade superior a 12 anos com asma persistente (Papathanassiou et al., 2016). O potencial de omalizumabe para exercer efeitos anti-inflamatórios em pacientes com asma decorre da sua capacidade de direcionar a interação entre IgE e os seus receptores (FcεRI e FcεRII), evitando assim a ativação inflamatória das células e interrompendo um passo-chave na cascata inflamatória alérgica (Yalcin., 2014). Assim, o anticorpo monoclonal anti-IgE vai se ligar a região Cε3 do fragmento Fc (fragmento constante) de IgE (Holgate, 2014), no mesmo domínio em que a IgE se ligaria ao FcεRI. Consequentemente, as reações desencadeadas por IgE são inibidas, uma vez que a ligação de IgE a receptores de alta afinidade de IgE em células efetoras é bloqueada, bem como a seguinte ativação de mastócitos e basófilos (D'Amato et al., 2014).

No entanto, apesar das terapias atualmente disponíveis, em geral, serem bem-sucedidas no controle da asma, existem várias razões para buscar novos medicamentos. Conforme discutido acima, a prevalência da asma bem como o seu impacto na sociedade continua elevado. Até a presente data, não existe uma

estratégia preventiva eficaz para a asma ou uma cura conhecida. Infelizmente, os efeitos dos corticosteroides inalados na asma desaparecem rapidamente quando o medicamento é descontinuado e apesar do tratamento farmacológico sob acompanhamento médico para controlar a asma, muitos pacientes ainda apresentam sintomas (Olin et al., 2014). A asma permanece descontrolada em cerca de 10% dos pacientes que aderem aos medicamentos prescritos (Wenzel e Busse, 2007).

## 2.4 HIDRAZONAS

As hidrazonas são uma classe especial de compostos orgânicos sintéticos que exibem uma ampla variedade de efeitos biológicos, dentre eles, destaca-se a atividade anti-inflamatória (Bala et al., 2013). Deste modo, constituem um composto versátil, com estrutura básica (Figura 6), na qual os centros ativos, carbono e nitrogênio, são os principais responsáveis pelas propriedades físicas e químicas das hidrazonas e, devido à reatividade para eletrófilos e nucleófilos, as hidrazonas são usadas para a síntese de compostos orgânicos, como compostos heterocíclicos (Kajal et al., 2014).



$R^1 = 4\text{-OH}, 4\text{-F}, 4\text{-Cl}, 4\text{-Br}, \text{NO}_2, \text{etc.}$

$R^2 = \text{H}, 4\text{-NO}_2, 2\text{-CF}_3, 4\text{-CF}_3, 4\text{-OCH}_3 \text{ etc.}$

**Figura 6: Estrutura geral de hidrazonas.** Adaptado de Török et al., *Bioquímica*, 2013.

A formação de uma hidrazona passa pela condensação quimiosseletiva de aldeídos ou cetonas com hidrazinas, seguida por eliminação de uma molécula

de água. Quando essa hidrazina é uma hidrazida, o composto formado é uma acilhidrazona (Figura 7) (Santos, 2017).



**Figura 7: Reação geral de formação de uma hidrazona (1) e reação geral de formação de uma acilhidrazona (2).** Adaptado de Santos, *Instituto de Tecnologia em Fármacos*, 2017.

A *N*-acil-hidrazona (NAH), é considerada uma estrutura privilegiada por servir de base para a concepção de novos compostos analgésicos e anti-inflamatórios. Um exemplo é que a subunidade NAH é um farmacóforo chave para ligação e inibição de ciclooxigenases (COX) (De Melo et al., 2014). Essa inibição está associada com o alívio da dor e inflamação (Grosser et al., 2006), demonstrando potencial anti-inflamatório dessa molécula. Vários mecanismos foram propostos para explicar como ocorre o reconhecimento pela COX: o primeiro mecanismo envolve a acidez relativa da fração hidrogênio amida em NAH; o segundo mecanismo envolve a capacidade da estrutura de estabilizar os radicais livres que estão estruturalmente relacionados com hidrogênio bis-alílicos em ácidos graxos, como o ácido araquidônico (De Melo et al., 2014).

Esta classe de moléculas tem sido reconhecida tanto pela sua variabilidade quanto pela sua associação a metais, isso devido a fatores como o seu alto grau de flexibilidade ao assumir diferentes conformações (Naskaret al., 2007), ou seja, diferirem de maneira temporária sendo interconvertidas sem quebra de ligações. Devido a isso, as hidrazonas apresentam um importante papel na química inorgânica, por formarem facilmente complexos estáveis com a maioria dos íons de metais de transição (Dos Santos, 2014).

Nos últimos anos, tem havido muitos relatos na literatura sobre a síntese dos derivados de hidrazona, tendo em vista que esses compostos possuem propriedades biológicas e farmacológicas diversas (Mu et al., 2016). Esses dados proporcionaram o desenvolvimento de novas moléculas com uma diversidade de efeitos, entre eles: antimicrobiano, anticonvulsivante, antidepressivo, anti-inflamatório, analgésico, antiplaquetária, antimalárico, anticancerígeno, antifúngico, antitubercular e antiviral (Darwish et al., 2014; Chelucciet al., 2014; Altintopet al., 2014; Verma et al., 2014).

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) clássicos, tem como principal mecanismo de ação a inibição não seletiva da COX, que também é responsável pelo principal efeito colateral na mucosa gástrica (Díaz-González Sánchez-Madrid, 2015) e também efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular (Chelucciet al., 2014). Segundo a literatura, substâncias que contêm em suas estruturas uma porção hidrazona, agem como inibidores não apenas da COX, como também da enzima lipoxigenase do tipo 5 (LOX-5). Apresentando, portanto, pronunciada atividade analgésica e anti-inflamatória (Reiset al., 2011).

A LOX-5 é uma enzima envolvida na produção de eicosanóides e leucotrienos que aumentam a expressão da opsonina C3b sendo capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) envolvidas na lesão tecidual. Além disso, esta enzima é responsável pelo início da resposta inflamatória alérgica (Corrêa, Melo e Costa, 2008).

Lacerda e colaboradores (2014) descreveram o desenho e síntese de novos derivados de N-acilhidrazonas, mostrando que essas moléculas possuem efeitos inibitórios da produção de TNF- $\alpha$ , tanto *in vitro* como *in vivo*. No mesmo estudo, foi observado a inibição dos níveis *in vivo* de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , indicando que esses compostos podem atuar como bloqueadores da cascata de fatores de transcrição responsável pela sinalização da biossíntese dessas citocinas próinflamatórias, além de possuírem uma baixa citotoxicidade.

Avanços nos estudos farmacológicos para a elucidação dos mecanismos pelos quais os derivados de hidrazonas e acilhidrazonas modulam o sistema inflamatório ainda precisam ser alcançados, no entanto, eles já se mostram bons



candidatos a fármacos anti-inflamatórios no tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram o potencial efeito modulador de uma série de derivados de *N*-acil-hidrazonas *in vitro* (dados não publicados). Dentre as suas atividades, destaca-se a capacidade de inibir a produção de nitrito em cultura de macrófagos ativados, a supressão de IL-1 $\beta$  também em cultura de macrófagos, além de ser capaz de inibir a proliferação de linfócitos. Frente aos resultados obtidos em laboratório, tivemos o composto HAH2 como o mais ativo, partindo então para estudo *in vivo*. No presente trabalho, investigamos o efeito desse composto em um modelo murinho de alergia inflamatória das vias aéreas.

### 3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESE

O composto HAH2 pode reduzir o direcionamento para uma resposta imune Th2, reduzindo a inflamação alérgica das vias aéreas inferiores em modelo murino de asma.

#### 3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-inflamatória do composto derivado de hidrazona, o HAH2, em modelo experimental de inflamação alérgica das vias aéreas.

#### 3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do HAH2, administrado por via oral, sob a quantidade de células inflamatórias no pulmão dos animais.
- Estimar o efeito do HAH2 sob a presença de muco, bem como a hiperplasia das células caliciformes no epitélio bronquiolar.
- Investigar se o HAH2 é capaz de reduzir o direcionamento da resposta Th2

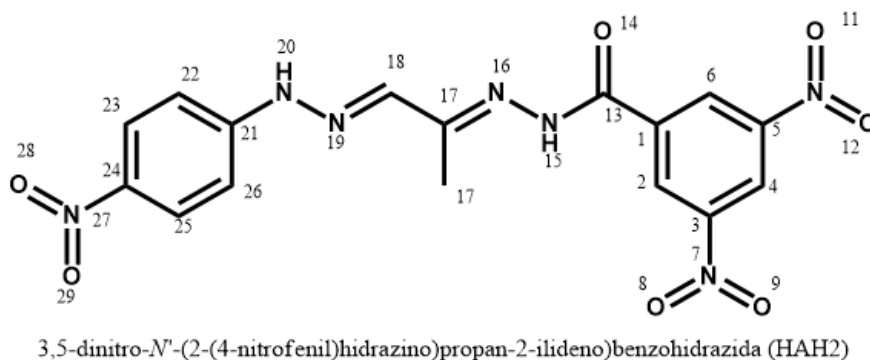
## 4 MATERIAL E METÓDOS

### 4.1 ANIMAIS

Camundongos BALB/c machos, com idade entre 4-6 semanas, foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade ( $60 \pm 5\%$ ) com um ciclo de luz/escuro de 12 horas. Comida e água estavam disponíveis *ad libitum*. Os animais foram tratados de acordo com as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde (NIH) para experimentação animal. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso Animal do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ / BA (005/2015; ID 1032).

### 4.2 COMPOSTO HAH2

O HAH2 (Figura 8) foi fornecido pelo Laboratório de Planejamento e Síntese Aplicados à Química Medicinal - SintMed, da UFPE, Recife, PE, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Maurício dos S. Filho. A dexametasona foi obtida da Sigma®. As soluções foram preparadas antes do uso e não foram armazenadas para uso posterior. Para uma diluição mais homogênea, o composto foi dissolvido numa mistura de 30% sorbitol e 10% tween 80 em salina.

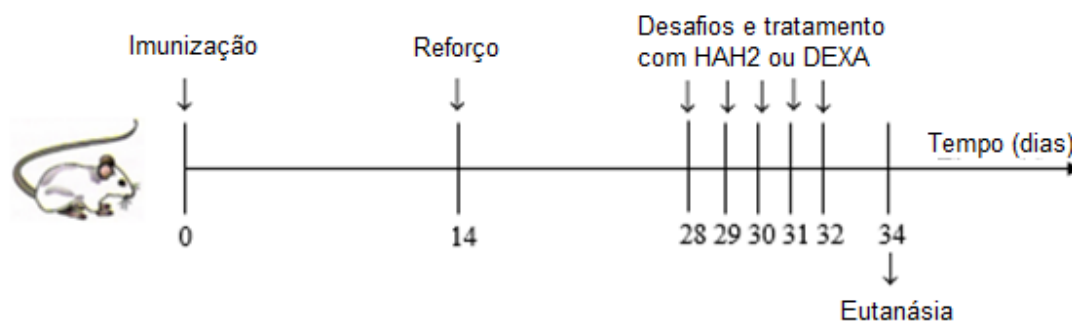


**Figura 8: Estrutura Química do HAH2.**

#### 4.3 MODELO DE INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR

Os camundongos foram organizados em seis grupos experimentais, sendo eles o primeiro grupo a) Naive, representando o controle saudável, o qual não foi manipulado. E os demais grupos que passaram pelo processo de indução da inflamação alérgica das vias inferiores divididos em: b) Veículo, onde administramos no lugar do tratamento apenas o veículo usado para a diluição do composto (sorbitol/tween 80 em solução salina), c) Dexa, tratados com dexametasona (Sigma, 25 mg/kg), d) HAH2 80, tratados com uma dose de 80 mg/Kg e) HAH2 20, tratados com uma dose de 20 mg/Kg e f) 8 HAH2 5, tratados com uma dose de 5 mg/Kg. A inflamação alérgica das vias aéreas foi induzida como descrito anteriormente (Vasconcelos et al., 2008). Resumidamente, os camundongos receberam imunização sistêmica por injeção subcutânea de 10 µg de ovalbumina (Grau V, 98% pura; Sigma, St Louis, MO), adsorvido em 2 mg/ml de hidróxido de alumínio (AlumImject; Pierce, Rockford, IL). No 14º dia, seguiu-se com uma injeção de reforço nas mesmas proporções da anterior (Figura 9). Os desafios nasais foram realizados a partir do dia 28, com os animais em uma caixa de acrílico, por exposição inalatória da ovalbumina em aerossol por 15 min/dia, durante cinco dias consecutivos. Acoplado a caixa de acrílico foi introduzida uma mangueira para introdução de uma solução de 1% de ovalbumina em solução salina aerossolizada com a ajuda de um nebulizador

(RespiraMax, NS, Brasil). Uma hora antes de cada desafio com aerossol, os camundongos foram tratados por via oral com HAH2, dexametasona ou veículo.



**Figura 9: Protocolo experimental para o desenvolvimento de inflamação alérgica das vias aéreas.**

#### 4.4 OBTENÇÃO DO SORO E LAVADO BRONCOALVEOLAR

Quarenta e oito horas após a última exposição a ovalbumina por inalação, os camundongos foram eutanasiados com dose letal de anestésico (300  $\mu$ L de Ketamina/xilazina numa proporção 2:1). O sangue foi obtido através do plexo braquial, centrifugado e as amostras de soro foram separadas para dosar a produção de IgE. O lavado broncoalveolar (BALF) foi realizada duas vezes por instilação intratraqueal de 1 ml de PBS gelado. Os fluidos das lavagens foram centrifugados e apenas o sobrenadante do primeiro fluido foi armazenado a - 80 °C até ser utilizado para quantificação de citocinas. Os dois pellets de células foram ressuspensos num volume final de 1 mL de PBS. O número de leucócitos totais no BALF foi estimado em uma câmara de Neubauer. As contagens diferenciais foram realizadas utilizando preparações de citospin coradas com HE (hematoxilina e eosina). As lâminas foram analisadas sob microscopia óptica, na ampliação de  $\times 100$  por um observador cego às identidades das amostras. As contagens diferenciais foram concluídas em 500 células por lâmina, usando critérios morfológicos padrão.

#### 4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a coleta do BALF, o lóbulo direito dos pulmões de cada animal foi removido para análise histológica. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina para quantificação de células inflamatórias por microscopia óptica. Para cada pulmão foram analisados 25 campos (40x) por seção e os dados foram utilizados para calcular o número médio de células por mm<sup>2</sup>. A presença de muco foi analisada em secções coradas com ácido periódico-Schiff (PAS). Todas as imagens foram digitalizadas usando uma câmera de vídeo digital a cores (CoolSnap cf) adaptada a um microscópio BX41 (Olympus, Tóquio, Japão) e foram analisados usando o programa de imagem ImagePro (versão 6.1; Media Cybernetics, San Diego, CA, EUA)

#### 4.5 MENSURAÇÃO DE IgE NO PLASMA

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1200 g, por 10 min, a 4 °C. O soro foi transferido para um tubo de microcentrífuga e armazenado a -20 °C até análise subsequente. Os níveis de anticorpos IgE para ovalbumina foram utilizados como marcador de sensibilização alérgica e medidos utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA). Resumidamente, os poços de microplacas foram sensibilizados com 100 µg/ml de ovalbumina durante duas horas, seguindo-se o bloqueio da reação com PBS contendo 10% de SBF por mais duas horas. As amostras testes foram diluídas em PBS contendo 5% de SBF e incubadas durante a noite. A detecção de IgE específica para ovalbumina foi realizada por incubação sequencial de anticorpo anti-IgE biotilado. Após a incubação com o conjugado de estreptavidina-peroxidase, a reação foi desenvolvida utilizando o substrato de peroxidase de 3,3', 5,5' de tetrametilbenzidina (TMB) e lida a 450 nm.

#### 4.6 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS

As concentrações de interleucina (IL) -4, IL-5, IL-13 no BALF também foram determinadas por ELISA usando kits de anticorpos específicos (R&D System, Minnesota, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

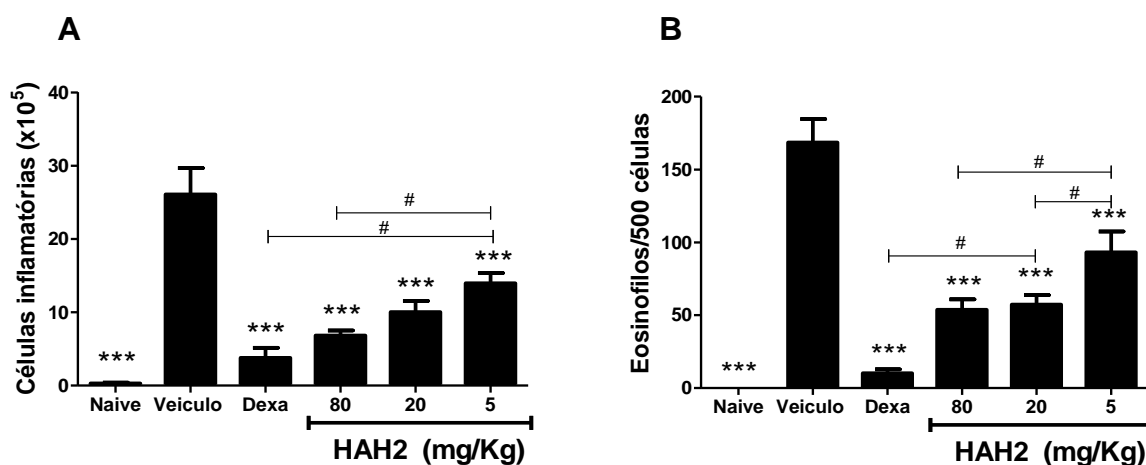
#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  SEM de 7 camundongos por grupo. As comparações estatísticas entre grupos foram realizadas por análise de variância unidirecional e testes de comparação múltipla de Newman-Keuls usando Graph Pad Prism versão 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA). As diferenças foram consideradas significativas quando os valores de P foram  $<0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DO HAH2 SOBRE A INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS INDUZIDA POR OVA

Para examinar o possível efeito anti-inflamatório do HAH2 na inflamação alérgica das vias aéreas, tratamos os camundongos com diferentes doses de HAH2 por via oral, durante cinco dias consecutivos, uma hora antes do desafio com aerossóis de OVA. O BALF foi coletado 48 horas após o último desafio com OVA e, em seguida, as contagens de células totais e diferenciais foram realizadas. A inalação de OVA aumentou significativamente a contagem total de células e eosinófilos em camundongos asmáticos em comparação com os animais não imunizados (*naive*). O tratamento com HAH2, nas três doses, reduziu a contagem total de células e o número de eosinófilos, em comparação com o grupo tratado com veículo (Figura 10).



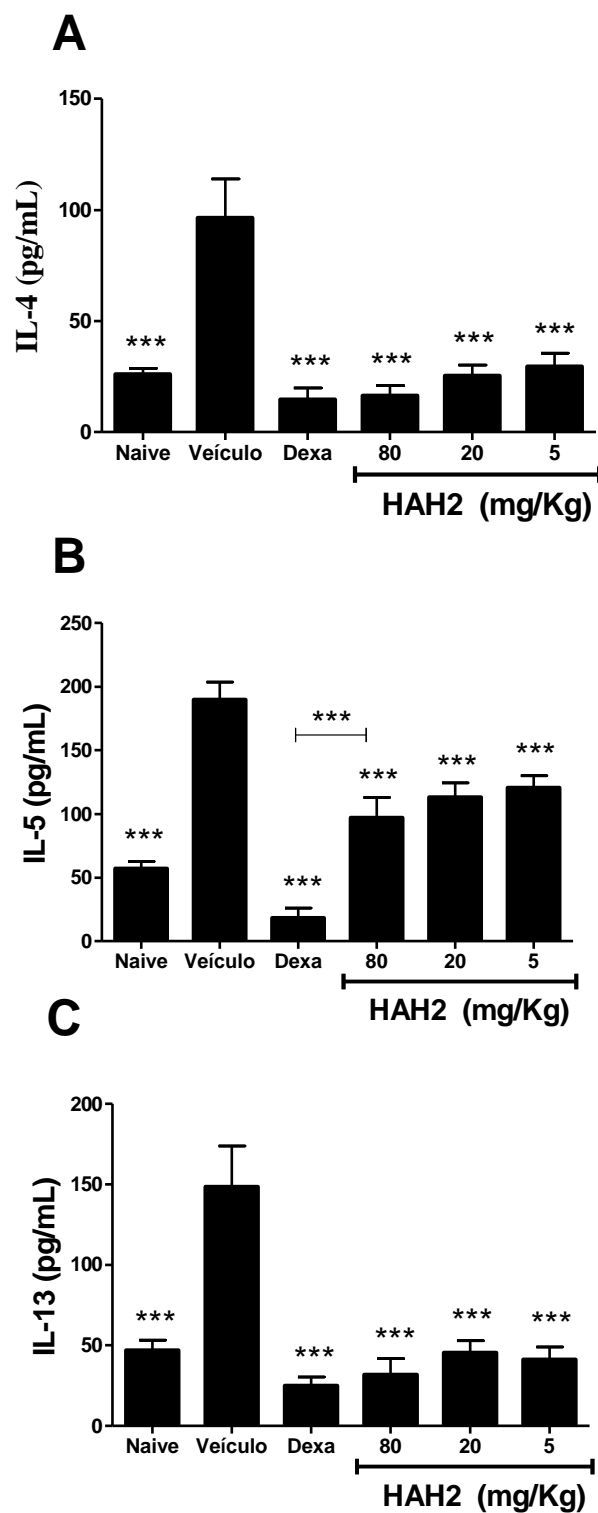
**Figura 10: Contagem de células totais e quantificação de eosinófilos em amostras do BALF obtidas de camundongos submetidos a diferentes tratamentos.** Os camundongos foram sacrificados 48 h após o último desafio com ovalbumina. Foi avaliada a celularidade no BALF de camundongos *naive*, tratados com veículo, dexametasona (Dexa) ou HAH2. A) Contagem total de células. B) Número de eosinófilos em 500 células. Os valores são expressos como média  $\pm$  S.E.M. De 6-8 camundongos por grupo. #  $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com o veículo.

## 5.2 EXPRESSÃO DE CITOCINAS TH2 INDUZIDA POR OVA E PRODUÇÃO DE IgE

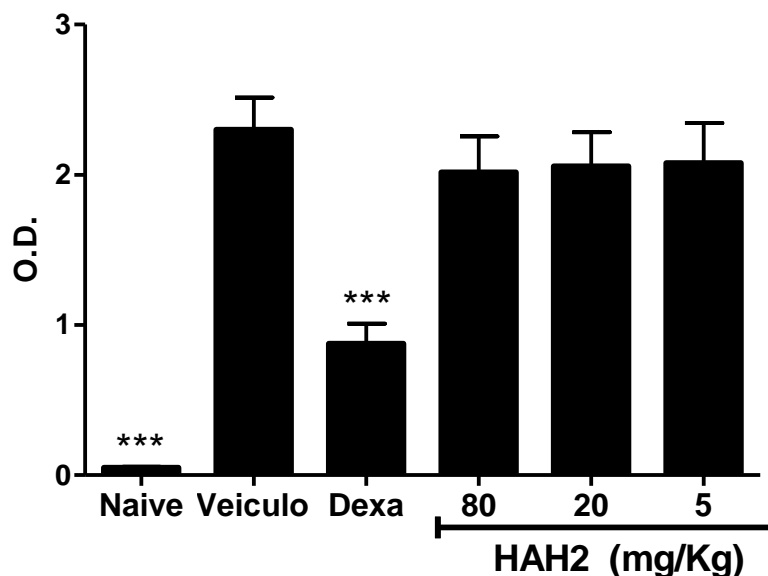
Para investigar se o composto HAH2 poderia modificar uma resposta Th2 específica para OVA, os níveis de citocinas Th2 no BALF foram medidos por ELISA. A inalação de OVA em camundongos sensibilizados (grupo veículo) causou um aumento notável na produção de IL-4, IL-5 e IL-13, em comparação com o grupo *naive* (Figura 11). O tratamento com HAH2 diminuiu os níveis de citocinas associadas a resposta Th2 em comparação com o grupo que recebeu apenas veículo. Além disso, a redução de IL-4 e de IL-5 em camundongos asmáticos apresentou uma tendência a dose resposta, tendo o leve aumento à medida que reduzimos a dose do tratamento (Figura 11A e 11B). Os níveis de citocinas IL-4 e IL-13, em animais tratados com a maior dose de HAH2 (80 mg/kg) foram semelhantes aos dos camundongos tratados com dexametasona. Estes resultados mostram que HAH2 suprimiu a resposta imune Th2 em modelo experimental de asma induzida por OVA, de forma semelhante ao tratamento com corticosteroide.

Para avaliar se o composto HAH2 poderia modificar os níveis de anticorpos IgE específicos para OVA, determinamos níveis séricos de IgE usando a técnica de ELISA. Os animais que receberam apenas o veículo, apresentaram níveis elevados de anticorpos IgE anti-ovalbumina no soro em comparação com os *naive* (Figura 12). Observamos uma redução significativa dos anticorpos IgE específicos para OVA em camundongos tratados com dexametasona. No entanto, não foi encontrada diferença entre os camundongos tratados com HAH2 e os controles desafiados e tratados com veículo (Figura 12).





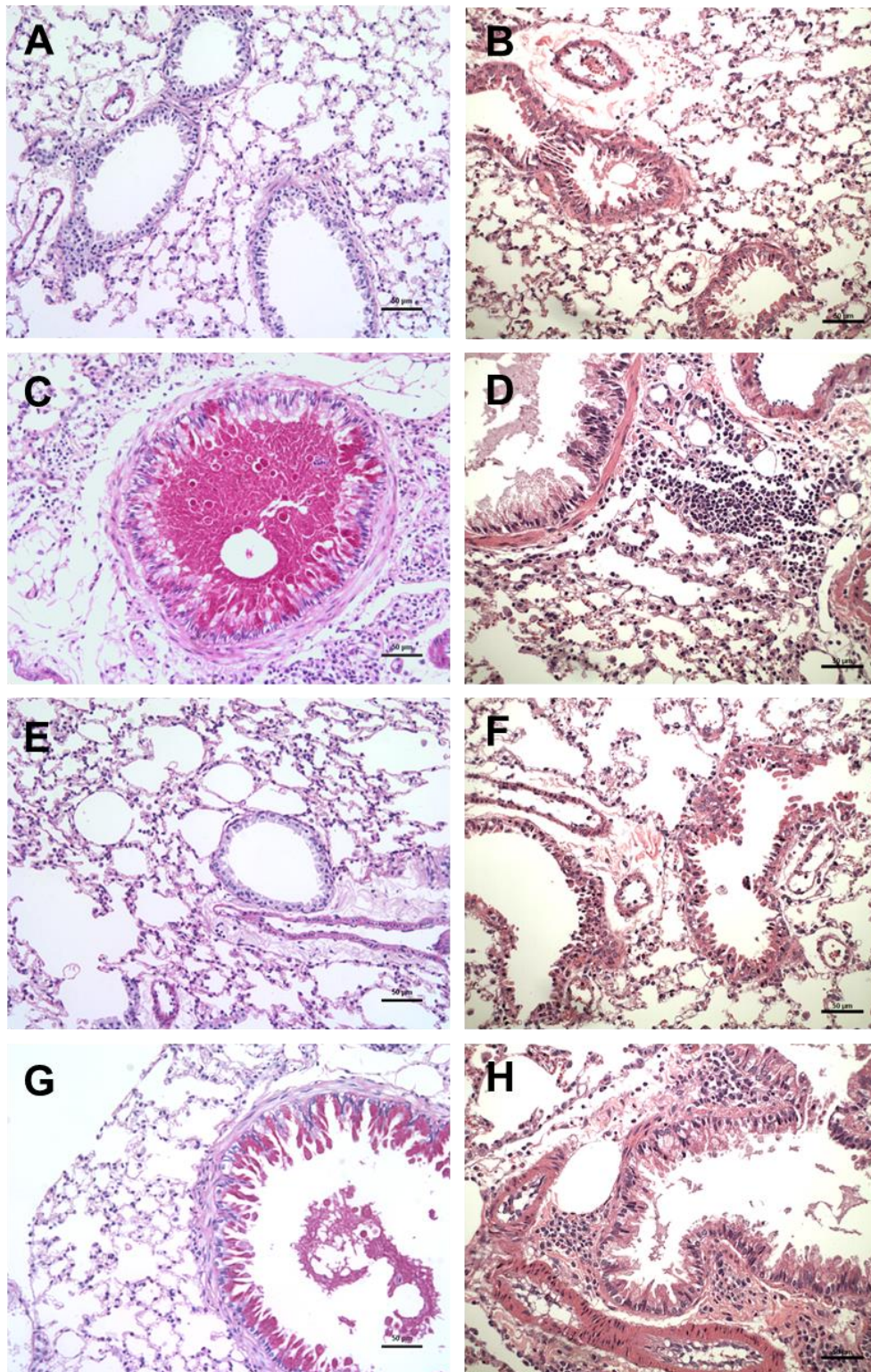
**Figura 11: Produção de citocinas em camundongos tratados com HAH2.** Os níveis de citocinas em camundongos de cada grupo experimental foi determinado em amostras de BALF por ELISA. A, IL-4. B, IL-5. C, IL-13. Os dados são expressos como médias  $\pm$  S.E.M. de 6-8 camundongos por grupo. \*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com camundongos tratados com veículo.



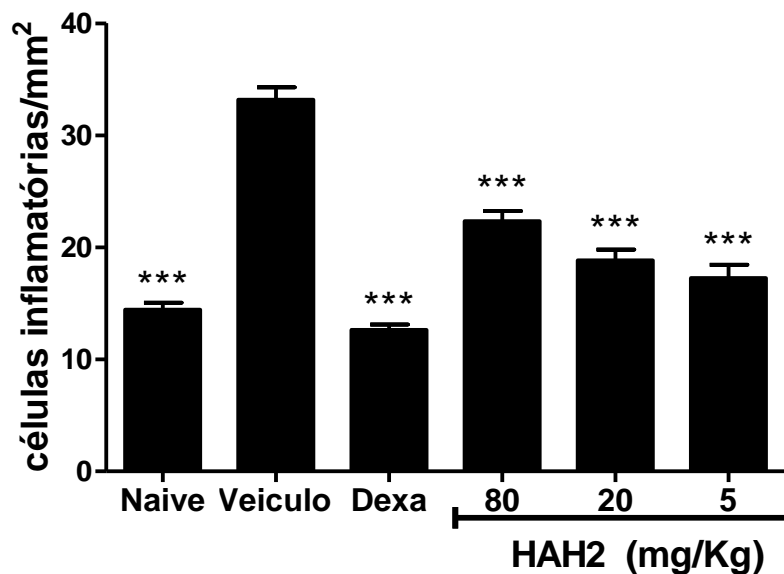
**Figura 12: Anticorpos de IgE específicos para ovalbumina em camundongos com inflamação alérgica de vias aéreas inferiores.** Os níveis de anticorpos IgE anti-OVA foram determinados nos soros dos animais por ELISA. Os dados são expressos como médias  $\pm$  S.E.M. De 6-8 camundongos por grupo. \*\*\*p <0,0001 em comparação com camundongos tratados com veículo.

### 5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE PULMÕES DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM HAH2

Em uma melhor caracterização das alterações patológicas nos pulmões dos animais imunizados, causadas pelo desafio com OVA, examinamos as seções pulmonares coradas com H&E. O desafio induziu um infiltrado de células inflamatórias contendo linfócitos, macrófagos e eosinófilos (dados não mostrados), quando comparados ao grupo *naive* (Figura 13B). Os animais tratados com dexametasona apresentaram um pequeno infiltrado inflamatório, assim como os tratados com HAH2 (Figura 13F e 13H). Todos os tratamentos diferiram estatisticamente do grupo que recebeu apenas veículo (Figura 14).

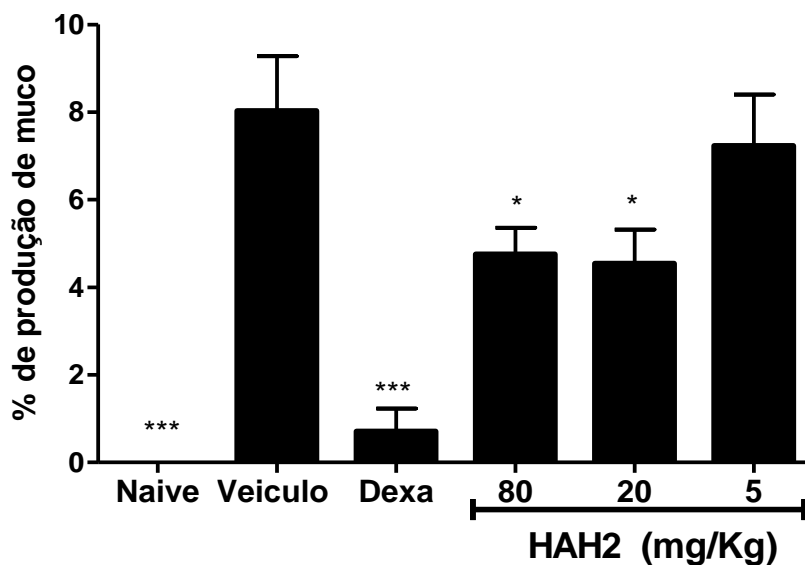


**Figura 13: Histologia dos pulmões de camundongos *naive* e asmáticos.** Fotomicrografias de tecido pulmonar de camundongos *naives* (A e B) e camundongos asmáticos tratados com veículo (C e D), dexametasona (E e F) ou HAH2 80 mg/mL (G e H). A, C, E e G mostram coloração com reagente de Schiff (PAS) e B, D, F e H com HE.



**Figura 14: Quantificação da inflamação nos pulmões dos camundongos.** O gráfico representa animais tratados com dexametasona ou HAH2 (5, 20 e 80 mg/ml) em comparação com animais *naive* e os que receberam apenas veículo. O número de células inflamatórias foi avaliado em cortes corados com H&E. Os dados são expressos como médias  $\pm$  S.E.M. De 6-8 camundongos por grupo. \*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com camundongos tratados com veículo.

Para analisar a presença ou não de muco nos pulmões dos animais, as seções pulmonares foram coradas com PAS e analisadas. Os pulmões dos camundongos *naive* apresentaram bronquíolos sem presença de muco e, por conseguinte, sem coloração. Enquanto que o grupo veículo uma marcada presença de muco (Figura 13A e 13C). A dexametasona causou uma grande inibição na presença de muco no tecido, como já era esperado, e o tratamento com HAH2 nas doses de 20 e 80 mg/ml também foi capaz de reduzir a presença de muco (Figura 13E e 13G), de forma significativa quando comparados com o grupo veículo (Figura 15).



**Figura 15: Análise da produção de muco em seções pulmonares coradas com PAS.** A área de coloração PAS foi estimada por análise morfométrica. Os dados são expressos como médias  $\pm$  S.E.M. De 6-8 camundongos por grupo. \*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com camundongos tratados com veículo.

## 6 DISCUSSÃO

O processo inflamatório no pulmão de indivíduos asmáticos ocorre em resposta a alérgenos, e é um processo altamente orquestrado, acarretando num infiltrado de células inflamatórias, especialmente eosinófilos (Lee et al, 2010). Associado ao recrutamento de células, há um aumento na produção de vários mediadores inflamatórios no tecido pulmonar, incluindo citocinas, como a IL-4, IL-5 e IL-13 (Lucas et al., 2015). O controle da inflamação alérgica requer a remoção ou o afastamento dos alérgenos, que muitas vezes se torna difícil, ou até mesmo impraticável, e não há terapia curativa para o retorno à homeostase do indivíduo em condições de inflamação alérgica persistente (Karra et al., 2015).

O composto HAH2, avaliado neste estudo, é um derivado NAH e por isso apresenta características químicas semelhantes à de outros compostos já utilizados como base para a concepção de novos analgésicos e anti-inflamatórios (Melo et al., 2014; Lacerda et al., 2012). Evidências crescentes argumentam que os derivados de hidrazona apresentam atividade antimicrobiana (Altintop et al., 2014), atividade anti-inflamatória e analgésica (Kajal et al., 2014; Silva et al., 2014; Lacerda et al., 2014; Hamdy, 2013).

Nós demonstramos, pela primeira vez, a atividade anti-inflamatória de HAH2 em um modelo experimental de inflamação alérgica das vias aéreas inferiores induzido por OVA. Após a sensibilização e desafio com OVA em camundongos, observamos sinais clássicos de inflamação alérgica das vias aéreas, incluindo aumento do número de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, e aumento da IL-4, IL-5 e IL-13 no BALF, assim como evidências histológicas da inflamação pulmonar. Sendo que no BALF podemos encontrar diferentes células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, que em números alterados, contribuem para a inflamação na asma (Nadeem et al., 2014).

O tratamento com o composto HAH2 levou a uma melhora significativa na exacerbação da resposta inflamatória, controlando os níveis de citocinas do perfil Th2. O composto também foi capaz de diminuir significativamente o número total de células e os eosinófilos no BALF. Esses achados indicam que esta hidrazona inibiu o recrutamento de eosinófilos e células mononucleares para a via aérea, bem como a presença de muco no tecido pulmonar. Podemos relacionar essa redução de muco com os baixos níveis de citocinas Th2 encontrados nos camundongos tratados, uma vez que IL-13 estimula a produção de muco, além de promover a remodelação significativa das vias aéreas na asma, favorecendo a hiperplasia de células caliciformes (Vatrella et al., 2014). E a IL-4 desempenha um papel fundamental na produção de muco através do recrutamento de células Th2 para os pulmões e a indução da inflamação (Lee et al., 2010). Esses dados são consistentes com outros estudos que utilizaram compostos com atividade anti-inflamatória como tratamento em modelo murino de inflamação das vias aéreas inferiores (Cho et al., 2014; Vasconcelos et al., 2009; Shen et al., 2015). O HAH2 também atenua a inflamação, principalmente no infiltrado eosinofílico.

A eosinofilia é uma característica patológica significativa das doenças alérgicas, possivelmente contribui para o dano das vias aéreas através da liberação de mediadores e citocinas. A infiltração de eosinófilos nas vias aéreas está ligada à produção de IL-5, que é importante para a proliferação de eosinófilos e ativação (Lee et al., 2010). A IL-5 também é essencial para a migração de eosinófilos da medula óssea para o sangue, auxiliando na diferenciação e proliferação terminal de precursores de eosinófilos, bem como a ativação de eosinófilos maduros (De Freitas Alves et al., 2013).

Evidências consideráveis apoiam a teoria de que a redução do infiltrado de eosinófilos também está relacionada com a diminuição dos níveis de IL-4 e IL-13, que estão envolvidas no recrutamento de eosinófilos para a via aérea, induzindo a síntese da eotaxina e a regulação positiva das moléculas de adesão endotelial (Wu et al., 2014; Vatrella et al., 2014).

O tratamento oral com HAH2 reduziu os níveis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, sendo que os resultados alcançados para IL-4 e IL-13 tiveram eficácia semelhante ao grupo tratado com dexametasona, um glicocorticoide sintético comumente usado como fármaco anti-inflamatório. Pode-se dizer que o tratamento com HAH2 foi capaz de reduzir a resposta de fase tardia, já que suprimiu a secreção de citocinas no local da inflamação (Galli, Tsai e Piliponsky, 2008). No entanto, são necessários mais estudos para entender o mecanismo de ação pelo qual o HAH2 inibe a síntese dessas citocinas.

No tratamento com HAH2 não observamos redução significativa da produção de anticorpo IgE específica para ovalbumina. Em contraste, a dexametasona provocou uma diminuição considerável nos níveis de IgE. A produção de IgE está associada as reações alérgicas, desempenhando um papel essencial na hipersensibilidade do tipo I, incluindo asma alérgica, rinite alérgica e sinusite, por exemplo (Samitas et al., 2015). A presença de doença alérgica ou infecção parasitária pode causar um aumento de IgE específica. Esse anticorpo IgE específico se liga aos seus receptores nos basófilos e mastócitos, levando a liberação de diferentes mediadores inflamatórios que resultam nos sintomas de infecção e asma (Wang et al., 2015; Galli, Tsai e Piliponsky, 2008). Manise e colaboradores, em 2013, avaliaram o perfil de citocinas em indivíduos asmáticos e não asmáticos. Eles relacionaram os altos níveis de IgE aos níveis

elevados de citocinas IL-5, IL-6 e TNF- $\alpha$ , mostrando que a IL-5 juntamente com IL-6 podem promover a síntese de IgE e aumentar a síntese de IgE dependente de IL-4 (Manise et al., 2013). O que justifica nossos resultados, já que dentre as citocinas dosadas, a IL-5 foi a que observamos menor redução e não fizemos dosagem de IL-6.

No contexto da inflamação alérgica induzida por OVA, observamos que o composto HAH2 foi capaz de reduzir a celularidade nas vias aéreas inferiores, por inibição das citocinas Th2. O que sugere um potencial terapêutico do HAH2 para o tratamento de doenças alérgicas. Além disso, demonstra ter efeitos anti-inflamatórios, minimizando a produção de citocinas e muco, bem como a inflamação no tecido pulmonar.

## **7 CONCLUSÃO**

Nossos resultados demonstraram que o composto HAH2 atenua a inflamação das vias aéreas em modelo em camundongos, reduzindo a migração de células inflamatórias induzidas por OVA, bem como o número de eosinófilos em BALF. Observamos um possível potencial para controlar a inflamação alérgica inibindo células e produção de citocinas TH2, como IL-4, IL-5 e IL-13. O tratamento com HAH2 não reduziu a sensibilização sistêmica de IgE. Em contrapartida os resultados foram promissores mostrando uma redução de infiltrado inflamatório e muco no tecido pulmonar. Nossas descobertas sugerem que o composto HAH2 tem potencial terapêutico para um futuro medicamento no tratamento de pacientes com inflamação alérgica das vias aéreas.



## REFERÊNCIAS

Alizadeh Z., Mortaz E., Adcock I., Moin M. Role of Epigenetics in the Pathogenesis of Asthma. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**. 2017. 16(2):82-91.

AL-Kouba J., Wilkinson A.N., Starkey M.R., et al. Allergen-encoding bone marrow transfer inactivates allergic T cell responses, alleviating airway inflammation. **JCI Insight**. 2017. 2(11):e85742.

Allergies in Childhood (ISAAC). **São Paulo Pediatrics Journal**. 2014. 32(1). 114-25.

Altıntop M. D., Özdemir A., Turan-Zitouni G., et al. Synthesis and in Vitro Evaluation of New Nitro-Substituted Thiazolyl Hydrazone Derivatives as Anticandidal and Anticancer Agents. **Molecules**. 2014. 19 (9), 14809-14820.

Antwi, A. O., Obiri, D. D., Osafo, N. Stigmasterol Modulates Allergic Airway Inflammation in Guinea Pig Model of Ovalbumin-Induced Asthma. **Mediators of Inflammation**. 2017. 2953930.

Bala, S. et al. Bioactivity-therapeutic Potential in Present Scenario. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. 2013. 18(1). 65–74.

Bao, Z., Zhang, P., Yao, Y., Lu, G., Tong, Z., et al. Deguelin Attenuates Allergic Airway Inflammation via Inhibition of NF- $\kappa$ b Pathway in Mice. **International Journal of Biological Sciences**. 2017. 13(4), 492–504.

Barnes P. J. New drugs for asthma. *Nature Reviews Drug Discovery*. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2004. 3, 831-844.

Barnes, P. J. Biochemical basis of asthma therapy. **Journal of Biological Chemistry**. 2011. 286(38):32899-32905.

Barnes, P. J. Glucocorticosteroids: current and future directions. **British Journal of Pharmacology**. 2011. 163(1), 29–43.

Beigelman, A., Chipps, B. E., & Bacharier, L. B. Update on the utility of corticosteroids in acute pediatric respiratory disorders. **Allergy and Asthma Proceedings**. 2015. 36(5), 332–338.

Boswell-Smith, V., Spina, D., & Page, C. P. Phosphodiesterase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**. 2006. 147(1), 252–S257.

Brook PO, Perry MM, Adcock IM, Durham AL. Epigenome-modifying tools in asthma. **Epigenomics**. 2015;7(6):1017-1032.

Burton, O. T., & Oettgen, H. C. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. **Immunological Reviews**. 2011. 242(1), 128–143.

Calciano, L., Corsico, A. G., Pirina, P., Trucco, G., Jarvis, D., Janson, C., & Accordini, S. Assessment of asthma severity in adults with ever asthma: A continuous score. **Plos One**. 2017. 12(5), e0177538.

Cardet, J. C., & Israel, E. Update on reslizumab for eosinophilic asthma. **Expert Opinion on Biological Therapy**. 2015. 15(10), 1531–1539.

Chelucci R. C., Dutra L. A., Pires M. E. L., et al. Man Chin Chung and Jean Leandro dos Santos Antiplatelet and Antithrombotic Activities of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Containing an N-Acyl Hydrazone Subunit. **Molecules**. 2014. 19 (2), 2089-2099.

Corrêa M. F. P., Melo G. O., Costa S. S. Natural products from plant origin potentially useful in the asthma therapy Brazilian. **Journal of Pharmacognosy**. 2008 18: 785-797.

Cowan, D. C., Taylor, D. R., Peterson, L. E., Cowan, J. O., Palmay, R., Williamson, A., ... Comhair, S. Biomarker-based Asthma Phenotypes of Corticosteroid Response. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2015. 135(4), 877–883.e1.

D'Amato, G., Stanziola, A., Sanduzzi, A., Liccardi, G., Salzillo, A., Vitale, C., ... D'Amato, M. Treating severe allergic asthma with anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab): a review. **Multidisciplinary Respiratory Medicine**. 2014. 9(1), 23.

Darveaux, J. I., & Lemanske, R. F. Infection Related Asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2014. 2(6), 658–663.

Darveaux, J., & Busse, W. W. Biologics in Asthma – The Next Step Towards Personalized Treatment. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2015, 3(2), 152–161.

Darwish E. S., Abdel Fattah A. M., Attaby F. A., Al-Shayea O. N. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some Novel Thiazole, Pyridone, Pyrazole, Chromene, Hydrazone Derivatives Bearing a Biologically Active Sulfonamide Moiety. **International Journal of Molecular Sciences**. 2014. 15 (1), 1237-1254.

De Freitas Alves C, Angeli GN, Favarin DC, et al. The Effects of Proresolotion of Ellagic Acid in an Experimental Model of Allergic Airway Inflammation. **Mediators of Inflammation**. 2013;2013:863198.

Dunican, E. M., & Fahy, J. V. The Role of Type 2 Inflammation in the Pathogenesis of Asthma Exacerbations. **Annals of the American Thoracic Society**. 2015. 12(2), 144–S149.

Eskandari, N., Mirmbosayyeb, O., Bordbari, G., Bastan, R., Yousefi, Z., & Andalib, A. A short review on structure and role of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase 4 as a treatment tool. **Journal of Research in Pharmacy Practice**. 2015 4(4), 175–181.

Fahy, J. V. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. **Nature Reviews Immunology**. 2015. 15(1), 57–65.

Galli, S. J., & Tsai, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**. 2012. 18(5), 693–704.

Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**. 2008. 454(7203), 445–454.

Gazzotti, M. R., Nascimento, O. A., Montealegre, F., Fish, J., & Jardim, J. R. Level of asthma control and its impact on activities of daily living in asthma patients in Brazil . **Jornal Brasileiro de Pneumologia: Publicação Oficial Da Sociedade Brasileira de Pneumologia E Tisiologia**. 2013. 39(5), 532–538.

GINA (2014). "**GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA**."

González F. D., Sánchez-Madrid F. NSAIDs: Learning new tricks from old drugs. **European Journal of Immunology**. 2015. 45 (3), 679-686.

Gooderham, M., & Papp, K. Selective Phosphodiesterase Inhibitors for Psoriasis: Focus on Apremilast. **Biodrugs**. 2015. 29(5), 327–339.

Goseva, Z., Gjorcev, A., Kaeva, B. J., Janeva, E. J., & Angelovska, I. Analysis of Plasma Concentrations of Theophylline in Smoking and Nonsmoking Patients with Asthma. **Journal of Medical Sciences**. 2015 3(4), 672–675.

Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **Journal of Clinical Investigation**. 2006;116(1):4-15.

Hamdy NA, Abdel-Aziz HA, Kamel GM, Fakhr IM. Convenient synthesis, anti-inflammatory, analgesic and ulcerogenic activities of some new bis-hydrazones and pyrazole derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. 2013 May-Jun 70(3): 469-80.

Holgate, S. T. New strategies with anti-IgE in allergic diseases. **The World Allergy Organization Journal** 2014. 7(1), 17.

Howrylak, J. A., Fuhlbrigge, A. L., Strunk, R. C., Zeiger, R. S., Weiss, S. T., & Raby, B. A. Classification of childhood asthma phenotypes and long-term clinical responses to inhaled anti-inflammatory medications. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2014. 133(5), 1289–130112.

Huber, M., & Lohoff, M. Change of paradigm: CD8+ T cells as important helper for CD4+ T cells during asthma and autoimmune encephalomyelitis. **Allergo Journal International**. 2015. 24(1), 8–15.

Ilmarinen, P., Tuomisto, L. E., & Kankaanranta, H. Phenotypes, Risk Factors, and Mechanisms of Adult-Onset Asthma. **Mediators of Inflammation**. 2015. (2015). 514868.

Jamrozik E1, Knuiaman MW, James A, Divitini M, Musk AW. Risk factors for adult-onset asthma: a 14-year longitudinal study. **Respirology**. 2009. 14(6):814-21.

Jenkins, C. R., Eriksson, G., Bateman, E. D., Reddel, H. K., Sears, M. R., Lindberg, M., & O'Byrne, P. M. Efficacy of budesonide/formoterol maintenance and reliever therapy compared with higher-dose budesonide as step-up from low-dose inhaled corticosteroid treatment. **BMC Pulmonary Medicine**. 2017. 17(1):65.

Kajal, A., Bala, S., Sharma, N., Kamboj, S., Saini, V. Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. **International Journal of Medicinal Chemistry**. 2014. 2014. 761030;1-11.

Karra L, Haworth O, Priluck R, Levy BD, Levi-Schaffer F. Lipoxin B4 promotes the resolution of allergic inflammation in the upper and lower airways of mice. **Mucosal immunology**. 2015;8(4):852-862.

Kong L., Qin Z., Shen H., Jin H., Wang W., Wang Z. Association of Obstructive Sleep Apnea with Asthma: A MetaAnalysis. **Scientific Reports**. 2017. 7: 4088.

Krishnan, J. A., Lemanske, R. F., Canino, G. J., Elward, K. S., Kattan, M., Matsui, E. C., ... Minnicozzi, M. Asthma Outcomes: Asthma Symptoms. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2012. 129(3 0), S124–S135.

Kupczyk M., Haahtela T., Cruz A. A., Kuna P. Reduction of asthma burden is possible through National Asthma Plans. **Allergy**. 2010. 65(4):415-9

Lacerda R. B., Sales N. M., da Silva L. L., et al. Novel potent imidazo[1,2-a]pyridine-N-Glyciny-hydrazone inhibitors of TNF- $\alpha$  production: in vitro and in vivo studies. **Plos ONE**. 2014. 9(3), e91660.

Lacerda RB., Silva LL., Lima CKF., Miguez E., et al. Discovery of Novel Orally Active Anti-Inflammatory N-Phenylpyrazolyl-N-Glyciny-Hydrazone Derivatives That Inhibit TNF- $\alpha$  Production. **PLoS One**, vol. 7, issue 10 (2012) p. e46925.

Lee MY, Lee NH, Jung D, Lee JA, Seo CS, Lee H, Kim JH, Shin H. Protective effects of allantoin against ovalbumin (OVA)-induced lung inflammation in a murine model of asthma. **Int Immunopharmacol**. 2010; 10(4): 474-80.

Leval X., Delarge J., Somers F., De Tullio P., Henrotin Y., Pirotte B., Dogné J. M. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. **Current Medicinal Chemistry**. 2000. 7(10):1041-62.

Lipworth B J. Systemic adverse effects of inhaled corticosteroid therapy: A systematic review and meta-analysis. **Archives of Internal Medicine**. 1999. 10; 159 (9): 941-55.

Lipworth, B. J. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**. 2005. 14;365(9454):167-75

Liu, A. H., Jaramillo, R., Sicherer, et al. National Prevalence and Risk Factors for Food Allergy and Relationship to Asthma: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2010. 126(4), 798–806.e13.

Loke, Y. K., Blanco, P., Thavarajah, M., & Wilson, A. M. Impact of Inhaled Corticosteroids on Growth in Children with Asthma: Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos ONE**. 2015. 10(7), e0133428.

Lucas CD, Dorward DA, Sharma S, et al. Wogonin Induces Eosinophil Apoptosis and Attenuates Allergic Airway Inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 2015;191(6):626-636.

Manise M, Holtappels G, Van Crombruggen K, Schleich F, Bachert C, Louis R. Sputum IgE and Cytokines in Asthma: Relationship with Sputum Cellular Profile. De Re V, ed. **PLoS ONE**. 2013;8(3):e58388.

Margay, S. M., Farhat, S., Kaur, S., & Teli, H. A. To Study the Efficacy and Safety of Doxophylline and Theophylline in Bronchial Asthma. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. 2015. 9(4), 05–08.

Melo T. R. F., Chelucci R. C., Pires M. E. L., et al. Pharmacological Evaluation and Preparation of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Containing an N-Acyl Hydrazone Subunit. **International Journal of Molecular Sciences**. 2014. 15 (4), 5821-5837.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. **Annual Review of Immunology**. 2013. 31:563-604

Miyasaka T., Dobashi-Okuyama K., Takahashi T., Takayanagi M., Ohno I., 2017. The interplay between neuroendocrine activity and psychological stress-induced exacerbation of allergic asthma. **Allergology International**. 2017. 1-11.

Mizutani, N., Nabe, T., & Yoshino, S. IgE/antigen-mediated enhancement of IgE production is a mechanism underlying the exacerbation of airway inflammation and remodelling in mice. **Immunology**. 2015. 144(1), 107–115.

Morishima, Y., Ano, S., Ishii, Y., Ohtsuka, S., Matsuyama, M., Kawaguchi, M., & Hizawa, N. Th17-Associated Cytokines as a Therapeutic Target for Steroid-Insensitive Asthma. **Clinical and Developmental Immunology**. 2013. (2013). 609395.

Mu J. X., Shi Y. X., Wu H. K., Sun Z. H., Yang M. Y., Liu X. H., Li B. J. Microwave assisted synthesis, antifungal activity, DFT and SAR study of 1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridine derivatives containing hydrazone moieties. **Chemistry Central Journal**. 2016. 10. 50(1-9).

Naskar, S., Corbella M., Blakec A. J., Chattopadhyya S. K. Versatility of 2,6-diacetylpyridine (dap) hydrazones in generating varied molecular architectures: Synthesis and structural characterization of a binuclear double helical Zn(ii) complex and a Mn(ii) coordination polymer. **Dalton Transactions**. 2007. 11. 1150-1159.

Olin J T., Wechsler M. E. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2014. 349:g5517.

Papathanassiou, E., Loukides, S., & Bakakos, P. (2016). Severe asthma: anti-IgE or anti-IL-5? **European Clinical Respiratory Journal**. 2016. 3. 10.3402/31813.

Patterson, M. F., Borish, L., & Kennedy, J. L. The past, present, and future of monoclonal antibodies to IL-5 and eosinophilic asthma: a review. **Journal of Asthma and Allergy**. 2015. 8, 125–134.

Pearce, N., Ait-Khaled, N., Beasley, R., et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Thorax**. 2007;62(9):758-766.

Pelaia G, Vatrella A, Maselli R. The potential of biologics for the treatment of asthma. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2012 11(12):958–972.

Pelaia, G., Vatrella, A., Busceti, M. T., et al. Role of biologics in severe eosinophilic asthma – focus on reslizumab. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. 2016. 12, 1075–1082.

Pera, T., & Penn, R. B. Crosstalk between beta-2-adrenoceptor and muscarinic acetylcholine receptors in the airway. **Current Opinion in Pharmacology**. 2014. 0, 72–81.

Powell N1, Till SJ, Kay AB, Corrigan CJ. The topical glucocorticoids beclomethasone dipropionate and fluticasone propionate inhibit human T-cell allergen-induced production of IL-5, IL-3 and GM-CSF mRNA and protein. **Clinical & Experimental Allergy**. 2001. 31(1):69-76.

Quirce S. Bobolea I., Domínguez-Ortega J., Barranco P. Future Biologic Therapies in Asthma. **Arch Bronconeumol**. 2014. 50:355-61.

Reis S. J. G. B., Almeida V. M., Almeida G. C, et al. Synthesis and preliminary evaluation of antinociceptive activity of novel isoxazolyl-aryl-hydrazones **Quimica Nova**. 2011. 34(1), 76-81.

Reis S. L. G. B., Almeida V. M., Almeida G. C., Boaviagem K. M., Mendes C. C. D. B., DE Faria A. R. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolilaril-hidrazonas. **Quimica Nova**. 2011. 34(1). 76-81.

Rolph M. S., Sisavanh M., Liu S. M., Mackay C. R. Clues to asthma pathogenesis from microarray expression studies. **Pharmacology & Therapeutics**. 2006. 109. 284-294.

Santos, L. A. Síntese de N-Acilhidrazonas baseados no fármaco isoniazida. [TCC - Especialização]. **Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos**, Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Silva E. M., Silva G. A. Asthma-related mortality in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 2000-2009: a multicausal analysis. **Cadernos de Saúde Pública**. 2013. 29(4):667-80.

Silva YK, Reyes CT, Rivera G, Alves MA, Barreiro EJ, Moreira MS, Lima LM 3-Aminothiophene-2-acylhydrazones: non-toxic, analgesic and anti-inflammatory lead-candidates. **Molecules**. 2014 Jun 20;19(6):8456-71.

Solé D., Camelo-NuneS I. C., Wandalsen G. F., Mallozi M. C., Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and obstructive pulmonary disease. **Lancet**. 2014. 365(9454): 167-175.

Solé, D. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): o que nos ensinou?. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 2005. 31(2). 93-94.

Sullivan P.W., Ghushchyan V.H., Globe G., Schatz M. Oral corticosteroid exposure and adverse effects in asthmatic patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2017. 04.009.

Thomsen SF. Epidemiology and natural history of atopic diseases. **European Clinical Respiratory Journal**. 2015;2:10.3402/ecrj.v2.24642.

To, T., Stanojevic, S., Moores, G., Gershon, A. S., Bateman, E. D., Cruz, A. A., & Boulet, L.-P.. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC Public Health**. 2012. 12, 204.

Török, B., Sood, A., Bag, S., Tulsan, R., et al. Diaryl Hydrazones as Multifunctional Inhibitors of Amyloid Self-Assembly. **Biochemistry**. 2013. 52 (7), 1137-1148.

Trevor, J. L., & Deshane, J. S. Refractory asthma: mechanisms, targets, and therapy. **Allergy**. 2014. 69(7), 817–827.

Tse, S. M., Tantisira, K., & Weiss, S. T. The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics of Asthma Therapy. **The Pharmacogenomics Journal**. 2011. 11(6), 383–392.

Vasconcelos, J.F. Teixeira, M.M. Barbosa-Filho, J.M. Agra, M.F. Nunes, X.P. . Giulietti, A.M et al. Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, 2009. 126-131.

Vasconcelos, J.F., Teixeira, M.M., Barbosa-Filho, J.M., Lúcio, A.S.S.C., Almeida, J.R.G.S., de Queiroz, L.P., Ribeiro-dos-Santos, R. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. **International Immunopharmacology**. 2008. 8, 1216–1221.

Vatrella, A., Fabozzi, I., Calabrese, C., Maselli, R., & Pelaia, G. Dupilumab: a novel treatment for asthma. **Journal of Asthma and Allergy**. 2014. 7;123–130.

Verma, G., Marella, A., Shaquiquzzaman, M., Akhtar, M., Ali, MR e Alam, MM. A review exploring biological activities of hydrazones. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**. 2014. 6 (2), 69-80.

Walker, J. K. L., & DeFea, K. A. Role for  $\beta$ -arrestin in mediating paradoxical  $\beta$ 2AR and PAR2 signaling in asthma. **Current Opinion in Pharmacology**. 2014. 0;142–147.

Wang L, Chen Q, Shi C, Lv H, Xu X, Yu L. Changes of serum TNF- $\alpha$ , IL-5 and IgE levels in the patients of mycoplasma pneumonia infection with or without bronchial asthma. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**. 2015;8(3):3901-3906.

Wang, Y.-H., & Wills-Karp, M. The Potential Role of IL-17 in Severe Asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**. 2011. 11(5), 388–394.

Wenzel SE, Busse WW. Severe asthma: lessons from the severe asthma research program. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2007;119:14-21; 22-3

West, L. C., Grotzke, J. E., & Cresswell, P. MHC Class II-Restricted Presentation of the Major House Dust Mite Allergen Der p 1 Is GILT-Dependent: Implications for Allergic Asthma. **Plos ONE**. 2013. 8(1), e51343.

World Health Organization (WHO). Bronchial Asthma. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs206/en/>. Acessado em: 27/05/2017.

Wu W, Chen H, Li Y-M, Wang S-Y, Diao X, Liu K-G. Intranasal sirna targeting c-kit reduces airway inflammation in experimental allergic asthma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. 2014;7(9):5505-5514.

Yalcin, A. D. (2015). Advances in Anti-IgE Therapy. **BioMed Research International**. 2015, 317465.



Yalcin, A. D. An Overview of the Effects of anti-IgE Therapies. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**. 2014. 20, 1691–1699.

Zeng, S.-L., Wang, L.-H., Li, P., Wang, W., & Yang, J. Mesenchymal stem cells abrogate experimental asthma by altering dendritic cell function. **Molecular Medicine Reports**. 2015. 12(2), 2511–2520.