

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Avaliação do potencial imunorregulatório do análogo da lidocaína
JMF2-1 em um modelo murino de asma**

PRISCILLA CHRISTINA OLSEN

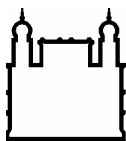
RIO DE JANEIRO

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PRISCILLA CHRISTINA OLSEN

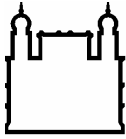
**Avaliação do potencial imunorregulatório do análogo da lidocaína
JMF2-1 em um modelo murino de asma**

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

Orientador: Dr. Marco Aurélio Martins

RIO DE JANEIRO

2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PRISCILLA CHRISTINA OLSEN

**Avaliação do potencial imunorregulatório do composto JMF2-1
em um modelo murino de asma**

ORIENTADOR: Dr. Marco Aurélio Martins

Aprovada em: 12/11/2007

EXAMINADORES:

Dr. Henrique Lenzi - IOC/FIOCRUZ - Presidente

Dr. Marcelo Bozza – IMPPG/UFRJ

Dr. Mauro Teixeira - UFMG

Dr. Luiz Anastácio Alves - IOC/FIOCRUZ

Dr. Vinicius Cotta de Almeida - IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 12 de novembro de 2007.

DEDICATÓRIA

À MINHA FAMÍLIA

À minha mãe Elizabeth Christina Olsen e
À minha irmã Amanda Christina Olsen de Azevedo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe e minha irmã que são meu prumo, meu guia e minhas melhores amigas. Amor, carinho, amizade, gratidão... Nenhuma palavra é grande o suficiente para expressar o meu sentimento por vocês, mas com certeza sou muito grata por tê-las sempre perto. Nos momentos bons e ruins estar com vocês é sempre “the high of the day”. Amo muito vocês e tenham certeza que vocês são grande parte do que sou hoje.

À minha Vó Hyenne, aos meus Tios Yolanda e Maurício e aos meus familiares, que mesmo sem saber exatamente o que eu faço com os “tais camundongos”, se interessam e se gabam pelos resultados do meu trabalho.

Ao meu namorado Ricardo, por ter sido compreensivo e carinhoso nessa fase, me dando muito amor e chocolate, muuuuito chocolate para acalmar as minhas impaciências.

Aos meus amigos do colégio, que mais do que amigos, são Olsens sem saber. Uma família que eu, por sorte, encontrei. Vá, Ju, Thé, Bruninha, Joanna, Fernandinha, Carlinha, Rê, Dudu, Tico, Gui, Poliba... Amo muito vocês!!! Não penso em nenhum momento importante da minha vida sem desejar a presença de vocês. Desde pequenos dividimos momentos especiais e momentos difíceis, sei que estaremos sempre juntos não importa o que ocorra.

A todas as micro-pessoas, que apesar do apelido, de micro nada tem. Obrigada por dividirem tantos momentos felizes!

Aos amigos que fiz na FIOCRUZ ao longo do meu caminho... Todos vindos do timo e migrados para a periferia. Espero que nos encontremos sempre por algum linfonodo! Rs. Agradeço especialmente ao Wallace e a Eliz, pelo carinho, pela amizade e claro... Pelos chopinhos e Cinnamon Oblivion no Outback!

A todos os componentes do Laboratório de Inflamação por conviverem no dia-dia, por estarem sempre dispostos a ajudar, dando conselhos e mostrando caminhos. À Ana Lúcia por zangar e brincar na hora certa, por trás do jeito de durona tem um coração mole sempre disposto a conversar. À Magda, que virginiana como eu, gosta de tudo perfeito e me ensinou os primeiros passos na Inflamação. Obrigada por toda ajuda! Às Adrianas Vieira e Ribeiro e à Sandrinha pela constante disponibilidade para responder as minhas infinitas questões sobre a ciência. Ao Vinícius e a Bia por me ajudarem tanto nos meus momentos de “exclusão digital”. Como estaria a formatação da minha tese sem vocês?! Bia, obrigada pela paciência contagiante nos momentos de stress. À minha amiga Lu, que com certeza faz o laboratório mais divertido todos os dias! Bom humor e pensamento positivo deveriam ser seus sobrenomes, obrigada por compartilhar isso comigo! Às meninas da “Alergia”, Su, Carol e Ju por fazerem da bancada um lugar sempre alegre. À Érika por compartilhar a bancada nas manhãs, ou melhor, madrugadas em experimentos loooongos. À Mi, Tati e Carol pela participação nos experimentos e pelos brilhantes programas da hora do almoço. “Fala que eu te escuto” vai continuar... À Pat Trentin e Paula pelos artigos entregues em domicílio durante o desenvolvimento da tese. À Edna pela reeducação do nosso linguajar carioca. Às meninas do “lero-lero” pela diversão constante. A todo o pessoal da sala de cultura, que além de pessoas fantásticas, são co-workers preciosos! Obrigada por divertirem o turno da noite do laboratório! À Tati baixinha por ser tão prestativa e ávida para ajudar nos experimentos. Ao Chico pela ajuda experimental e debate intelectual. Ao Lobão pelas fotos brilhantes que fazem qualquer um se orgulhar de morar no Rio. E finalmente, a uma pessoa imprescindível dentro do laboratório, a nossa secretária Dadá, que apesar de me deixar congelando no dia-dia é a mão direita de todos os mencionados acima.

À Daniele, secretária da Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, por segurar tantas bombas com bom humor, boa vontade e positividade inabalável.

À Bruna Fonseca, ao Dr. João Viola e a todos os componentes da Divisão de Biologia Molecular do INCA que me ajudaram e acompanharam meus primeiros passos na construção desta dissertação.

Aos meus ex-orientadores que me guiaram e me mostraram um pouco do que é ciência no Brasil, especialmente ao meu ex-orientador Marcelo Bozza, que, mas do que orientador é meu “guia científico” e uma inspiração para os iniciantes.

À Dra. Patrícia Silva que está sempre disposta a responder os milhões de perguntas e dúvidas do dia-dia.

Ao meu orientador Dr. Marco Aurélio Martins, pela sua presença constante na minha vida científica, pela teimosia e pela dedicação! Obrigada pelos puxões de orelha, pelas caras feias quando os experimentos ficavam ruins e pela vibração quando eles davam certo! Sua empolgação com a ciência é um exemplo a se seguir!

Agradeço as instituições de amparo à pesquisa que auxiliaram no nosso trabalho: CNPq, FAPERJ e ao PDTIS.

EPÍGRAFE

“O futuro tem muitos nomes:
para os fracos, ele é o inatingível;
para os temerosos, ele é o desconhecido;
para os corajosos, ele é a chance...”

Victor Hugo

O presente trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Dr. Marco Aurélio Martins, no Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz, na Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro das seguintes entidades de fomento científico:

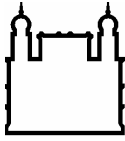
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ.
- PDTIS

Data de ingresso no Programa de Mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: março de 2006.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA.....	II
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Alergia.....	1
1.2 Asma.....	1
1.2.1 Epidemiologia.....	2
1.2.2 Bases genéticas e ambientais da asma.....	3
1.2.3 Bases imunológicas da asma.....	5
1.2.4 Fase imediata e fase tardia da asma.....	6
1.2.5 Fisiopatologia da asma.....	8
1.3 Mediadores da resposta asmática.....	11
1.3.1 Citocinas.....	11
1.3.1.1 Interleucina 4 (IL-4).....	12
1.3.1.2 Interleucina 5 (IL-5).....	12
1.3.1.3 Interleucina 13 (IL-13).....	13
1.3.1.4 Interferon- γ (IFN- γ).....	13
1.3.2 Quimiocinas.....	14
1.3.3 Leucotrienos.....	15
1.3.4 Histamina.....	15
1.4 Estratégias terapêuticas na asma.....	16
1.4.1 Antiinflamatórios.....	16
1.4.1.1 Glicocorticóides.....	16
1.4.1.2 Estabilizadores de mastócitos.....	18
1.4.2 Broncodilatadores.....	18
1.4.2.1 Agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos.....	18
1.4.2.2 Teofilina.....	20
1.4.2.3 Antagonistas do receptor de cisteinil leucotrienos.....	20
1.5 Outras estratégias terapêuticas.....	21
1.5.1 Lidocaína como uma alternativa para o tratamento da asma.....	21
1.5.2 JMF2-1.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
3 METODOLOGIA.....	26

3.1 Animais.....	26
3.2 Protocolo de sensibilização e desafio antigênico.....	26
3.3 Tratamento com lidocaína, JMF2-1 e dexametasona.....	26
3.4 Medida de hiperreatividade brônquica.....	26
3.5 Células inflamatórias no pulmão.....	27
3.6 Lavado broncoalveolar.....	27
3.7 Quantificação de citocina de explante pulmonar.....	28
3.8 Proliferação e produção de citocinas <i>in vitro</i>	29
3.9 Ciclo celular e Apoptose.....	29
3.10 Análise estatística.....	30
4 RESULTADOS.....	31
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÕES.....	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	70



Ministério da Saúde

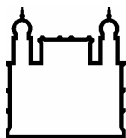
FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESUMO

A asma é caracterizada por uma inflamação crônica nas vias aéreas pulmonares causada por fatores ambientais em indivíduos geneticamente pré-dispostos. Estudos anteriores demonstraram que a aerolização com o análogo estrutural da lidocaína JMF2-1 poderia ser uma forma de atingir os efeitos antiasmáticos da lidocaína, sem apresentar a sua ação anestésico local. Nossos dados prévios apontam para um importante efeito antiinflamatório do JMF2-1 em modelos experimentais de asma, mas o modo de ação desta substância ainda não está elucidado. Nesse trabalho examinamos os efeitos imunorregulatórios do JMF2-1, em comparação com a lidocaína e a dexametasona, em um modelo murino de asma. Camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com ovoalbumina foram tratados com lidocaína e JMF2-1 aerossol, concomitante ao desafio e oito horas após cada desafio. O tratamento intraperitoneal com dexametasona foi realizado uma vez ao dia uma hora antes de cada desafio. Todos os tratamentos ocorreram dos dias 19 ao 21 pós-sensibilização, todas as análises ocorreram 24 horas após o último desafio. Primeiramente, observamos que a inalação da lidocaína e do JMF2-1 reduziu o número de eosinófilos nos pulmões dos animais desafiados com ovoalbumina. Além disso, ambos os fármacos inibiram a hiperreatividade brônquica dos animais desafiados. Os tratamentos *in vivo* com lidocaína e JMF2-1, assim como com dexametasona, inibiram a secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 em culturas de explante pulmonar, obtidos dos camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina. Após um segundo desafio com ovoalbumina, dessa vez *in vitro*, a produção de IL-5 e IL-13 foi inibida quando os explantes eram provenientes de camundongos tratados com dexametasona, mas não lidocaína e JMF2-1. Células obtidas dos linfonodos de camundongos DO11.10 - TCR transgênico foram estimuladas com ovoalbumina e tratadas *in vitro* com JMF2-1, lidocaína ou dexametasona. A produção de citocinas e proliferação das células dos linfonodos, provocadas pela ovoalbumina, foram inibidas pela lidocaína, JMF2-1 e pela dexametasona. Observamos também que o JMF2-1 e a lidocaína induziram a apoptose de células T *in vitro*, detectada através da marcação com iodeto de propídeo e anexina V. Em todos os parâmetros analisados *in vitro* o JMF2-1 foi mais eficiente do que a lidocaína. Os resultados demonstraram que a aerolização do JMF2-1 bloqueia eventos cruciais relacionados à patogênese da asma, provavelmente através da redução da liberação de citocinas Th2 e da inibição das funções celulares e sobrevivência de linfócitos T. Os resultados reforçam a importância de JMF2-1 e análogos não anestésicos de lidocaína como candidatos a medicamentos antiasmáticos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammation of the lung airways caused by environmental factors in genetically predisposed individuals. Our previous study showed that nebulization of the structural analog of lidocaine JMF2-1 might be a way of achieving the anti-asthmatic effects of lidocaine without the anesthetic effect. Since the mode of action of JMF2-1 is still unclear, we examined here its putative immunoregulatory effect in comparison to lidocaine and dexamethasone. Ovalbumin-sensitized BALB/c mice were daily nebulized with ovalbumin and treated with lidocaine or JMF2-1 aerosol concomitantly and eight hours post-challenge, from day 19 to 21 post-sensitization, being all analyses performed 24 h after the last challenge. Dexamethasone intraperitoneal treatment was done one hour before each challenge. We found that both lidocaine and JMF2-1 inhalation inhibited crucial features of asthma including lung eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness. Treatments with inhaled lidocaine or JMF2-1, as well as i.p. dexamethasone, inhibited IL-4, IL-5 and IL-13 secretion by cultures of lung explants obtained from mice sensitized and challenged with ovalbumin. Following a second challenge, now *in vitro*, IL-5 and IL-13 production were inhibited when the explants were from dexamethasone- but not lidocaine- or JMF2-1- treated donors. Ovalbumin-evoked cytokine production by and proliferation of lymph node cells, from DO11.10 TCR transgenic mice, were inhibited by both JMF2-1, lidocaine and dexamethasone applied *in vitro*. Moreover, JMF2-1 and lidocaine induced apoptosis of these T cells *in vitro*, detected by propidium iodide and annexin V. In all parameters assessed *in vitro* JMF2-1 was more efficient than lidocaine. These results show that inhalation of JMF2-1 prevents cardinal features of asthma, probably by reducing T_H2 cytokine generation via inhibition of T cell function and survival. JMF2-1 should be considered as a new prototype in drug discovery for asthma with advantages over local anesthetics.

1. Introdução

1.1 Alergia

Há cerca de 100 anos atrás, von Pirquet introduziu o termo “alergia” para distinguir as respostas imunológicas que eram danosas ao hospedeiro das respostas imunológicas de um estado fisiológico *apud* Larche e cols., 2006. Em 1921, Prausnitz e Küstner demonstraram que a sensibilidade específica a um antígeno poderia ser passivamente transmitida para uma pessoa não-alérgica, através da transferência do soro de um indivíduo alérgico. Alguns anos mais tarde (1966-1967), foi observado que o fator do sangue responsável por essa transferência da resposta alérgica era a Imunoglobulina E (IgE) *apud* Larche e cols., 2006.

Hoje se sabe que a alergia, mediada pela IgE, afeta mais de 25% da população de países industrializados (Floistrup e cols., 2006). As reações alérgicas são classificadas como reações de hipersensibilidade imediata porque têm início em alguns minutos a partir do estímulo do antígeno e trazem conseqüências patológicas significativas.

A resposta alérgica pode ser direcionada contra diversas proteínas ambientais, denominadas de alérgenos, e manifesta-se clinicamente como rinite alérgica (mais conhecida como febre do feno), asma alérgica, alergias alimentares, inflamações alérgicas na pele, alergias oculares e anafilaxia. Com exceção da anafilaxia, todas as manifestações alérgicas mencionadas anteriormente são locais.

Atualmente a alergia é considerada uma disfunção imunológica, que pode causar em indivíduos pré-dispostos (ou atópicos), uma resposta inflamatória. As doenças alérgicas são fenômenos complexos e podem promover diversas manifestações fisiopatológicas como aumento de permeabilidade vascular, vasodilatação, hiperreatividade brônquica e inflamação local.

1.2 Asma

Nos tempos remotos, a asma já era reconhecida em várias culturas, como na civilização chinesa, hebraica, grega e romana. O médico grego Hipócrates (460-377 A.C.) foi o primeiro a descrever a asma, cuja palavra derivou da palavra grega “asthmaino”, que indicava “ofego ou arfada”. A primeira associação etiológica com o broncoespasmo foi feita por Galeno (130-201 D.C.), o qual também descreveu a relação entre as vias aéreas superiores e inferiores (Cserhati, 2004).

Durante a idade média não houve grande interesse no estudo da asma devido à repressão aos estudos científicos promovida pela Igreja Católica, nessa época muitos médicos aceitavam as descrições de Hipócrates e Galeno como um paradigma (Cserhati, 2004).

O médico alemão Georgius Agricola (1494-1555) descreveu, no século 16, a associação entre os fatores ambientais e os sintomas nas vias aéreas. A asma brônquica, nas suas definições modernas data do início do século 19, quando foi reconhecida como uma doença associada unicamente a uma contração exagerada das vias aéreas (broncoespasmo) (Cserhati, 2005). William Osler (1849-1919) foi quem descreveu a hiperreatividade brônquica como uma disfunção da asma e considerou pela primeira vez que esta fosse uma doença inflamatória, baseado em mudanças patológicas nas vias aéreas de asmáticos incluindo edema e aumento da produção de muco. Com o desenvolvimento de técnicas de coloração de cortes de tecido, Paul Ehrlich (1814-1915) identificou eosinófilos e mastócitos nos cortes histológicos de pulmões de pacientes asmáticos (Schwartz, 2004), associando a presença destas células à patologia da asma.

O conceito de que a asma é uma doença inflamatória foi estabelecida fortemente no século 20, o qual também foi marcado pelo advento dos testes randomizados, desenvolvimento de metodologias invasivas e não-invasivas e novas técnicas imunológicas, as quais puderam substituir a experiência pessoal e a observação.

Devido à complexidade da doença, ainda hoje não existe uma definição padrão para a asma, por isso muitos investigadores tentam defini-la através de características quantitativas comumente encontradas nos asmáticos (Wills-Karp and Ewart, 2004). Em indivíduos suscetíveis, a inflamação pulmonar causa episódios recorrentes de falta de ar, dificuldade respiratória, aperto no peito e tosse, particularmente à noite ou ao amanhecer. Esses episódios estão geralmente associados com a obstrução pulmonar, que pode ser reversível tanto espontaneamente quanto por uso de tratamento. A inflamação também pode levar a um aumento da hiperresponsividade brônquica, a uma variedade de estímulos (Clinical practice guidelines. Expert Panel Report 2. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. NIH. National Heart, Lung, and Blood Institute (1997)). Portanto, a descrição atual da asma mais precisa é: uma doença inflamatória crônica caracterizada pela obstrução reversível das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica e denso infiltrado inflamatório pulmonar, constituído principalmente por eosinófilos, mastócitos e linfócitos T, neutrófilos (numa resposta tardia mais exacerbada) e macrófagos (Tattersfield e cols., 2002, Wills-Karp and Ewart, 2004).

1.2.1 Epidemiologia

A asma é diagnosticada clinicamente com base nos sintomas de dispnéia, sibilância, tosse seca, sensação de aperto torácico e pela evidência da obstrução das vias aéreas (Cohn e cols., 2004).

Nos últimos 20 anos, a prevalência da asma quase dobrou, afetando atualmente cerca de 8 a 10% da população norte americana (Cohn e cols., 2004). No Brasil a estimativa de prevalência situa-se em torno de 20% (The international study of asthma and allergy n childhood (ISSAC). (1998)), sendo esta doença responsável por aproximadamente 350.000 internações hospitalares no SUS por ano (Portaria SAS/MS nº 1012, de 20 de dezembro de (2002)).

A primeira manifestação da asma alérgica pode ocorrer em qualquer idade, sendo a incidência mais alta em crianças. Hoje, a asma é a maior causa de hospitalização entre crianças pequenas (Cohn e cols., 2004, Dodge and Burrows, 1980, Saglani and Bush, 2007). A asma apresentada na infância geralmente abranda durante a adolescência e pode voltar na vida adulta (Jenkins e cols., 1994). Quando a doença persiste na vida adulta ela pode ser associada com o declínio acelerado da função pulmonar do paciente (Lange e cols., 1998).

De acordo com a frequência e intensidade dos sintomas e com os parâmetros da função pulmonar, pode-se classificar a asma em: intermitente, persistente leve, persistente moderada e persistente grave.

No Brasil, estima-se que aproximadamente 60% dos casos de asma sejam intermitentes ou persistentes leves, 25-30% moderados e 5-10% graves, sendo que estes últimos são os responsáveis pela maior mortalidade associada à doença (Portaria SAS/MS nº 1012, de 20 de dezembro de (2002)).

1.2.2 Bases genéticas e ambientais da asma

A asma é uma doença multifatorial, uma vez que suas causas podem ser tanto devido a fatores ambientais quanto a fatores genéticos. Estudos genéticos identificaram mais de 20 regiões cromossômicas diferentes (Doull e cols., 1996, Lonjou e cols., 2000, Wilkinson e cols., 1998) que correlacionam com a manifestação da asma ou com as características relacionadas à ela.

O foco dos estudos tem sido principalmente as áreas do genoma que contenham genes importantes na resposta imunológica: “cluster” de genes que codificam citocinas no cromossomo 5q (genes para as interleucinas 4, 5, 9 e 13, assim como para CD14); o HLA (human leukocyte antigen complex) no cromossomo 6p; a região do cromossomo 11q, que contém genes para a subunidade B do receptor FcE; a região do cromossomo 12q, que possui o gene para IFN- γ ; o locus do cromossomo 14q, aonde se localiza o gene para o receptor da célula T α/β e a região onde se encontra o receptor da IL-4 no cromossomo 16p (Tattersfield e cols., 2002, Wills-Karp and Ewart, 2004). A consistência com que essas regiões têm sido

detectadas relacionadas à doença indica que elas realmente podem conter genes que promovam a susceptibilidade à asma.

Estudos de variação polimórfica (Doull e cols., 1996, Lonjou e cols., 2000, Wilkinson e cols., 1998) nos genes supostamente envolvidos na fisiopatologia da doença também identificaram diversos genes candidatos, que podem aumentar o risco de desenvolver a asma, como o *ADAM33* (Tattersfield e cols., 2002, Wills-Karp and Ewart, 2004), *DPP10* e *PHF11* (Wills-Karp and Ewart, 2004). *ADAM33* é um membro da família de metaloproteases expresso em células musculares e em fibroblastos das vias aéreas, que pode estar envolvido no remodelamento dos tecidos das vias aéreas (Wills-Karp and Ewart, 2004). Especula-se que *DPP10*, uma dipeptidil peptidase, module a ativação de diversas citocinas e quimiocinas envolvidas na inflamação das vias aéreas (Wills-Karp and Ewart, 2004). Já o produto gênico de *PHF11* contém dois “dedos de zinco” que podem ser importantes no remodelamento da cromatina. Apesar de não se saber ao certo o papel desse gene na patogênese da asma, foi demonstrado uma associação entre esse gene e a asma severa (Wills-Karp and Ewart, 2004).

Estudos sobre a asma têm tornado evidente que apenas um gene não pode ser responsável pela herança de uma doença alérgica. O mais provável é que diversas alterações em diferentes genes, os quais interagem com fatores ambientais em diversos momentos do desenvolvimento do indivíduo, podem contribuir para os mecanismos que levam às condições alérgicas. Sendo assim, sabemos hoje que os genes de susceptibilidade à asma interagem com fatores ambientais como poluentes, infecções virais, bacterianas e fúngicas, nutrição e endotoxinas (Saglani and Bush, 2007, von Mutius, 2007, Yang e cols., 2007).

David Strachan foi o primeiro a sugerir, em 1989, que a falta de higiene e, conseqüentemente, o aumento de infecções poderiam conferir proteção contra o desenvolvimento de doenças alérgicas. Strachan observou que a prevalência da febre do feno era reduzida quando a criança estudada tinha irmãos mais velhos. Esse fenômeno estava associado a um aumento da exposição a infecções microbianas na infância (Saglani and Bush, 2007, von Mutius, 2007, Yang e cols., 2007). A partir dessa observação surgiu a “hipótese da higiene”, a qual propõe que a exposição microbiana, durante o desenvolvimento na infância, reduz o desenvolvimento da asma e de doenças alérgicas. Resultados conflitantes foram alcançados no estudo dessa hipótese, no entanto é válido ressaltar que diferenças no genótipo dos indivíduos estudados associados a diferentes fatores ambientais podem ter dificultado a análise dos dados.

1.2.3 Bases imunológicas da asma

Os alérgenos que entram nas vias aéreas podem ultrapassar as barreiras do trato respiratório, e podem ser reconhecidos, fagocitados, processados e apresentados pelas células dendríticas presentes no pulmão, via MHC de classe II. Células T CD4 específicas para este alérgeno que se encontram nas vias aéreas podem reconhecer o antígeno através do TCR (receptor de reconhecimento das células T). Células dendríticas apresentando o alérgeno provém sinais co-estimulatórios, levando a uma rápida indução da ativação desses linfócitos (Cohn e cols., 2004). A ativação dos linfócitos T CD4 promove a diferenciação desta célula em subpopulações T_h1 ou T_h2, além de induzir a proliferação dessas células e a liberação de diversos mediadores inflamatórios. Os subtipos de linfócitos T CD4 são classificados em T_h1 e T_h2 de acordo com o perfil de citocinas liberados por essas células. A inflamação alérgica está fortemente relacionada aos linfócitos T CD4 do subtipo T_h2, uma vez que um padrão de citocinas do tipo T_h2 foi associado à patogênese dessa doença (Renauld, 2001).

Dentre as citocinas T_h2 encontradas associadas à asma pode-se ressaltar a IL-4, IL-5 e IL-13. Essas citocinas são extremamente importantes no recrutamento e ativação das células efetoras relacionadas às respostas alérgicas, como eosinófilos e mastócitos. A IL-13 está associada à hipersecreção de muco das glândulas da submucosa e /ou células caliciformes. A IL-4 e a IL-5 aumentam a adesão de eosinófilos às células endoteliais vasculares, permitindo sua migração para o parênquima pulmonar. A IL-5 está associada também a manutenção da sobrevivência de eosinófilos. A IL-4 é essencial na diferenciação de demais células T CD4 em células com fenótipo T_h2, além de ser caracterizada como indutor da mudança de classe de imunoglobulinas para IgE em linfócitos B (Gould e cols., 2003).

A IgE secretada por linfócitos B ativados pode alcançar a circulação sanguínea e ligar-se a receptores Fc específicos (FcεR) na superfície de mastócitos teciduais ou basófilos sanguíneos. A partir desse momento, estas células estão prontas para serem ativadas pelos alérgenos, tornando o indivíduo sensibilizado para aquele determinado antígeno específico. Uma vez que essas células estejam ativadas elas também liberarão mediadores pró-inflamatórios participantes da patogênese da asma (**Figura 1.1**).

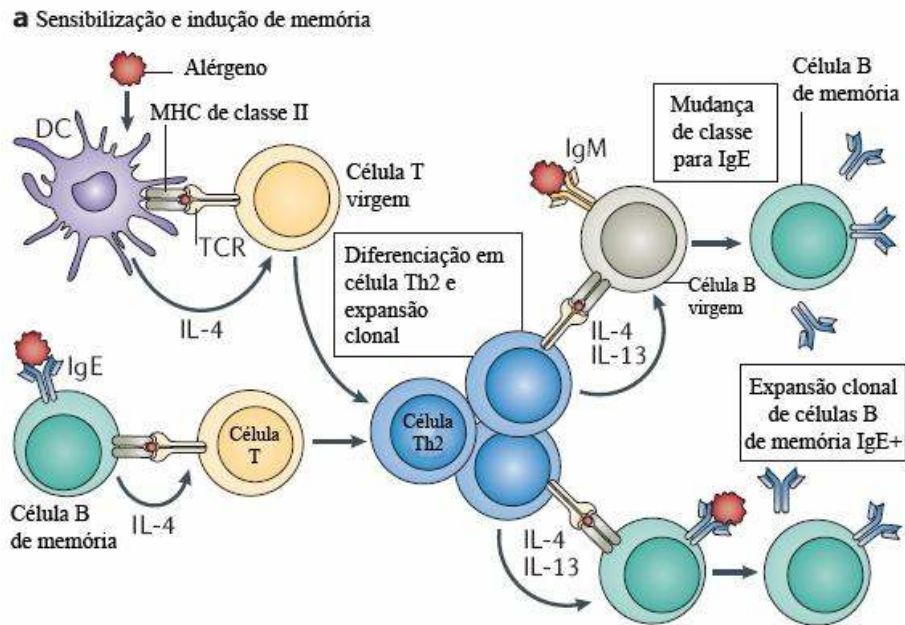


Figura 1.1: Eventos iniciais na imunologia da asma. Entrada do alérgeno e reconhecimento pelas células dendríticas ou linfócitos B, as quais através da apresentação antigênica promovem a ativação dos linfócitos T. Os linfócitos T ativados proliferam e produzem mediadores inflamatórios como as citocinas. Algumas dessas citocinas promovem a mudança de classe da imunoglobulina para IgE específica para o alérgeno. Adaptado de Larché e cols. 2006.

1.2.4 Fase imediata e fase tardia da asma

A resposta asmática pode ser dividida em duas fases que se diferenciam pela ordem temporal e pela qualidade dos eventos. Quando um indivíduo atópico previamente sensibilizado entra em contato com o alérgeno, este antígeno se ligará nas IgEs que se encontram associadas aos receptores específicos de alta afinidade $Fc\epsilon RI$, situado nas membranas de mastócitos e basófilos. A ligação do alérgeno na IgE promove a ativação dessas células com conseqüente desgranulação (Lukacs, 2001). O conteúdo liberado dos grânulos dos basófilos e mastócitos é constituído principalmente por aminas vasoativas (principalmente a histamina), enzimas (proteases neutras e hidrolases ácidas), mediadores lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos), citocinas e quimiocinas (Larche e cols., 2006). A histamina provoca a contração das células do endotélio, levando ao extravazamento do plasma para os tecidos, além de estimular a contração das células da musculatura lisa promovendo uma broncoconstrição. As proteases neutras de serina são os constituintes protéicos mais abundantes dos grânulos dos mastócitos e contribuem para o dano tecidual. Assim como a

histamina, os mediadores lipídicos, em particular leucotrienos e o fator de ativação plaquetária (PAF) induzem a vasodilatação, broncoconstrição, secreção de muco, aumento de permeabilidade vascular, quimiotaxia e ativação de células inflamatórias. As citocinas e quimiocinas liberadas estão associadas ao recrutamento, ativação e proliferação de linfócitos, mastócitos e eosinófilos (Wills-Karp and Ewart, 2004) (**Figura 1.2**).

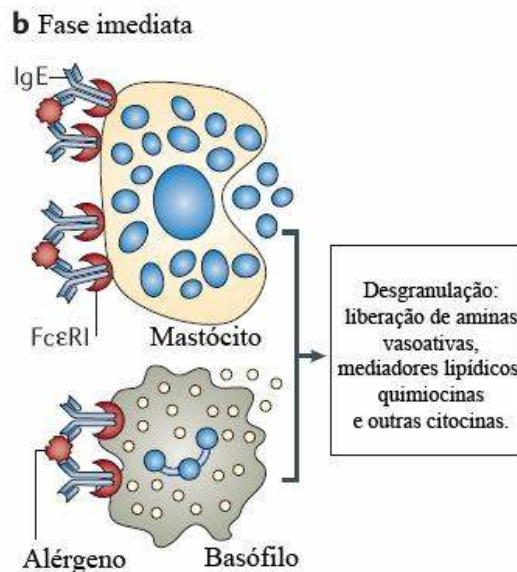


Figura 1.2: Fase imediata da reação. A ligação do antígeno às IgEs ligadas em receptores FcεRI de mastócitos e basófilos promove a desgranulação das células com consequente liberação dos mediadores inflamatórios, que culminam nos sintomas imediatos da asma alérgica. Adaptado de Larché e cols. 2006.

A segunda fase da resposta asmática, denominada fase tardia é seguida cerca de 2 a 4 horas mais tarde e pode ser mais grave (Lukacs, 2001). A resposta tardia consiste no acúmulo de infiltrado inflamatório no pulmão e pode durar longo período. O infiltrado inflamatório característico na asma é constituído principalmente de linfócitos T_h2, eosinófilos, mastócitos, células dendríticas e macrófagos, cuja atração para esse sítio inflamatório ocorre devido ao microambiente de citocinas e quimiocinas estabelecido na fase imediata (Busse e cols., 2000) (**Figura 1.3**).

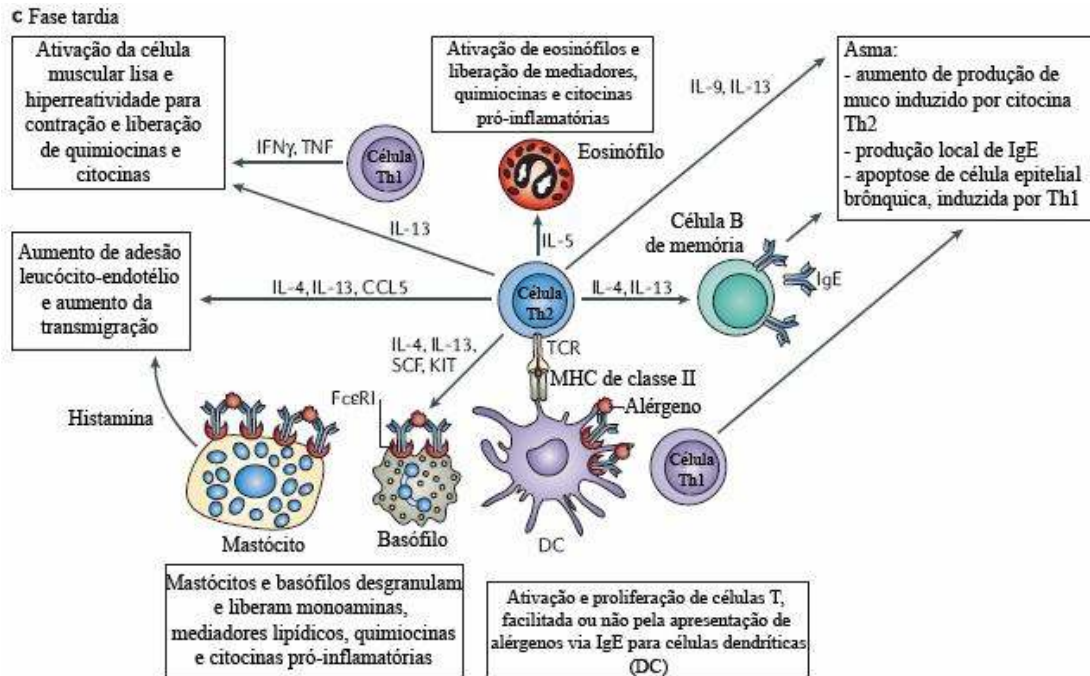


Figura 1.3: Fase tardia da reação. Células inflamatórias migram para o pulmão e são ativadas localmente. Adaptado de Larché e cols. 2006.

Os eosinófilos são os maiores constituintes do infiltrado inflamatório pulmonar de indivíduos asmáticos. Após sua ativação, liberam seus grânulos contendo mediadores inflamatórios e espasmógenos como o leucotrieno C₄ (LTC₄) e o PAF, induzindo a broncoconstrição, e proteínas extremamente tóxicas ao epitélio como MBP (Major Basic Protein) e EPO (Eosinophil Peroxidase), gerando descamação do epitélio das vias aéreas (Corrigan and Kay, 1992). Mais recentemente observou-se que os eosinófilos podem também apresentar antígenos e secretar citocinas do tipo T_H2, podendo agir como amplificadores do processo inflamatório no sítio de inflamação (Shi e cols., 2000).

A constante exposição aos alérgenos acarreta em uma contínua indução da resposta inflamatória e danos graves nas vias aéreas, levando a conseqüências patológicas graves nos pulmões de pacientes com asma crônica (Muro e cols., 2000).

1.2.5 Fisiopatologia da asma

Na asma, a parede das vias aéreas é infiltrada com eosinófilos e células mononucleares, as quais são em sua maioria células T CD4. Mastócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos podem estar aumentados nas vias aéreas de indivíduos asmáticos

comparados aos indivíduos saudáveis. No lúmen das vias aéreas, o muco está repleto de macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células epiteliais que se desprenderam do tecido danificado. Em alguns indivíduos asmáticos, especialmente os casos mais graves, ocorre aumento do número de neutrófilos (Cohn e cols., 2004) (**Figura 1.4**).

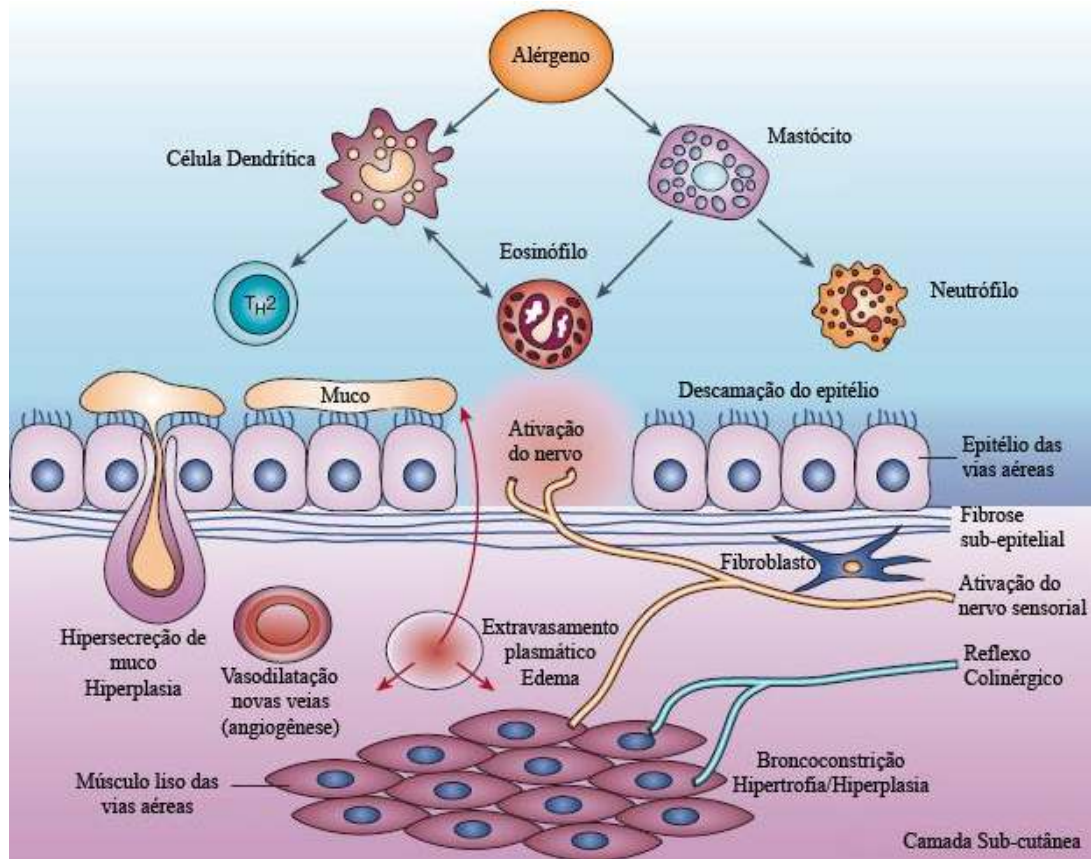


Figura 1.4: Fisiopatologia da asma. Diversas células inflamatórias são recrutadas e posteriormente ativadas nas vias aéreas, liberando uma variedade de mediadores inflamatórios, os quais promovem efeitos agudos nas vias aéreas como: broncoconstrição, extravasamento do plasma, vasodilatação, secreção de muco, ativação de nervos sensoriais e broncoconstrição induzida por reflexos colinérgicos. Além desses efeitos, ocorrem também alterações estruturais (remodelamento) incluindo fibrose sub-epitelial, angiogênese, aumento do número de células secretoras de muco, e espessamento da camada de células musculares lisas das vias aéreas, resultado da hiperplasia e hipertrofia dessas células. Adaptado de Barnes 2004.

As mudanças estruturais na parede das vias aéreas, conjuntamente denominadas de remodelamento das vias aéreas, resultam da interação de mediadores inflamatórios com células epiteliais ou do dano tecidual. Fatores locais, incluindo as células estruturais nas vias aéreas e a matriz extracelular, respondem à inflamação de forma característica e coordenada reparando o dano causado pela inflamação local (Cohn e cols., 2004). O espessamento da parede das vias aéreas pode ser de 10 a 300%, comparado às vias aéreas de indivíduos saudáveis, acarretando numa redução do diâmetro do lúmen das vias aéreas (Elias e cols., 1999). As vias aéreas pequenas (2-4 mm) estão normalmente envolvidas na patologia. Na asma grave fatal, todas as vias aéreas, com exceção da maior, são afetadas. Além das células inflamatórias, a maioria dos elementos das vias aéreas contribui para o espessamento (células musculares, fibroblastos, miofibroblastos e miócitos) (Halayko and Amrani, 2003). Ocorre uma hipertrofia das células caliciformes secretoras de muco e metaplasia do epitélio das vias aéreas, que passam a secretar muco também. A camada subepitelial também fica mais espessa, em indivíduos asmáticos devido ao aumento de deposição de matriz extracelular, como colágeno do tipo I, III e V, fibronectina e tenascina abaixo da membrana basal, na “lamina reticularis” (Roche e cols., 1989). Os miofibroblastos, células produtoras de colágeno, também se encontram hiperplásicos. As células musculares das vias aéreas passam a ocupar até três vezes a área que ocupam em indivíduos saudáveis, devido também a hiperplasia (Black, 1997). Além disso, ocorre dilatação dos vasos e angiogênese, aumento da permeabilidade vascular e edema da parede das vias aéreas (Homer and Elias, 2000) **(Figura 1.4)**.

O remodelamento das vias aéreas e a inflamação resultam na hiperresponsividade e obstrução das vias aéreas, as quais causam a falta de ar e aperto no peito. A hiperresponsividade é definida como um aumento na broncoconstrição induzida por estímulo não-específico. Os mecanismos que controlam a hiperresponsividade não são bem entendidos ainda. Fatores como a inflamação, diâmetro reduzido das vias aéreas, aumento da contratilidade das células musculares, dano epitelial, disfunção na regulação neuronal, aumento da permeabilidade microvascular e muitos mediadores inflamatórios espasmógenos estão associados à hiperresponsividade (Cohn e cols., 2004). Quando as vias aéreas estão mais estreitas devido às mudanças estruturais com presença de muco e células inflamatórias no lúmen, estímulos que aumentam a constrição de células musculares culminam na obstrução das vias aéreas (Cohn e cols., 2004) **(Figura 1.4)**.

A inflamação e as mudanças estruturais foram observadas nas vias aéreas de biopsias de crianças anos antes dos sintomas da asma se manifestarem (Pohunek, 2004), portanto é possível que a obstrução das vias aéreas e o aperto no peito ocorram apenas quando um nível

maior de remodelamento do tecido já tenha ocorrido. Mesmo se os sintomas desaparecerem, os indivíduos asmáticos continuam apresentando aumento na responsividade das vias aéreas induzida por metacolina e elevado número de eosinófilos no lavado broncoalveolar (Cohn e cols., 2004). Com o passar do tempo, a função pulmonar dos asmáticos é reduzida, indicando a progressão da doença (Lange e cols., 1998). No momento em que a asma é diagnosticada, a inflamação nas vias aéreas e o remodelamento não podem mais ser distinguidos em causa e efeito, dificultando a determinação de quais são os primeiros passos da fase efetora da doença.

1.3 Mediadores da resposta asmática

1.3.1 Citocinas

Citocinas são proteínas pequenas (aproximadamente 25 kDa) que são liberadas por diversos tipos de células no corpo. Geralmente são liberadas em resposta a um estímulo ativador e induzem resposta através da ligação a um receptor específico na membrana da célula alvo. As citocinas podem agir de forma autócrina, afetando o comportamento da célula que a liberou ou de forma parácrina, afetando o comportamento de células adjacentes. Algumas citocinas podem agir também de forma endócrina, afetando células distantes, porém isso depende da sua meia-vida e da sua produção na circulação.

A ação dessas moléculas é freqüentemente pleiotrópica, ou seja, uma única citocina pode atuar em diferentes células induzindo diferentes efeitos biológicos. Muitas vezes, também observamos que citocinas diferentes podem atuar na mesma célula induzindo o mesmo efeito biológico. Além disso, diferentes citocinas podem atuar em sinergia ou em antagonismo. Portanto, as citocinas são geradas a partir de uma resposta promovendo diversos efeitos biológicos nas células e podem exacerbar a alça de controle positivo ou de controle negativo (Chabalgoity e cols., 2007).

Na fase de ativação das respostas imunológicas as citocinas estimulam o crescimento e a diferenciação das células do sistema imune e na fase efetora elas podem induzir a ativação das células. Por isso as citocinas são consideradas como proteínas reguladoras do sistema imunológico, sendo essenciais na formação das repostas imunológicas inata e adaptativa, assim como no estabelecimento e manutenção da memória imunológica (Chabalgoity e cols., 2007).

Apesar da cadeia de eventos que leva ao desenvolvimento da patologia asmática ser bastante complexa, as citocinas típicas de uma resposta T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) se destacam como importantes participantes tanto no desenvolvimento, quanto no estabelecimento da asma. Os mecanismos exatos pelos quais estas citocinas regulam a inflamação pulmonar e a

conseqüente hiperreatividade das vias aéreas ainda não estão completamente elucidados, mas sabe-se que elas atuam em diferentes tipos celulares envolvidos no desenvolvimento da resposta asmática.

1.3.1.1 Interleucina 4 (IL-4)

A citocina IL-4 possui variadas atividades biológicas. Em termos gerais, pode ser descrita como uma das principais citocinas envolvidas na patogênese das doenças alérgicas. A principal célula produtora de IL-4 é o linfócito T CD4 T_h2, sendo que nessa célula a IL-4 funciona de forma autócrina estimulando o crescimento e o desenvolvimento de linfócitos T CD4 do subtipo T_h2 (Foster e cols., 2002). Outras células como mastócitos e eosinófilos também produzem IL-4.

A atividade biológica de IL-4 é exercida através da ligação da citocina ao seu receptor IL-4R, o qual é expresso em uma variedade de células. O receptor IL-4R é um heterodímero, constituído da cadeia IL-4R α e uma segunda cadeia, podendo essa ser a cadeia γ c ou a cadeia IL-13R α (Kips, 2001). A cadeia IL-13R α também é constituinte do receptor de IL-13, o que pode explicar as semelhanças funcionais entre essas duas citocinas.

As principais características funcionais de IL-4 estão relacionadas ao crescimento e diferenciação das células B e a troca do isotipo de imunoglobulina produzida para IgE. Efeitos adicionais implicados no aumento da produção de IL-4 em indivíduos asmáticos incluem a estimulação das células produtoras de muco e de fibroblastos, efeitos esses que estão relacionados ao processo de remodelamento das vias aéreas (Kips, 2001). Além disso, foi observado que a inalação de IL-4 recombinante humana é capaz de induzir a eosinofilia nas vias aéreas e causar hiperresponsividade brônquica em indivíduos asmáticos (Shi e cols., 1998).

1.3.1.2 Interleucina 5 (IL-5)

Diversos estudos demonstraram que a IL-5 é a principal citocina envolvida na produção, diferenciação, maturação e ativação de eosinófilos, *in vivo* (Foster e cols., 2002, Kips, 2001). Na medula óssea a IL-5 é importante na estimulação da eosinofiloiose e indução da diferenciação terminal de precursores mielóides em eosinófilos. A IL-5 também aumenta a adesão de eosinófilos às células endoteliais vasculares, promove a migração de eosinófilos nos tecidos e aumenta a atividade citotóxica dessas células (Wills-Karp, 1999). De fato, em camundongos deficientes para o gene da IL-5 há um número muito reduzido de eosinófilos detectados no sangue, sugerindo que apesar da importância de IL-5 no desenvolvimento de eosinófilos, outras citocinas, como IL-3 e GM-CSF, constitutivamente

expressas podem contribuir para o desenvolvimento destas células. No entanto, estes animais modificados não desenvolvem eosinofilia pulmonar, hiperresponsividade e danos nas vias aéreas, induzida por aeroalergenos (Foster e cols., 1996). Além disso, parece haver uma correlação positiva entre o aumento da concentração de IL-5 e o aumento do número de eosinófilos no sangue e lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos (Walker e cols., 1991).

1.3.1.3 Interleucina 13 (IL-13)

A IL-13 está associada a diversas características patológicas que definem a asma. Essa citocina é produzida por diversas células inflamatórias como as células T CD4, CD8 e Natural Killer (NK), eosinófilos, mastócitos e basófilos, além de ser sintetizada também por células não-inflamatórias como as células da musculatura lisa das vias aéreas (Wills-Karp, 2004). A produção de IL-13 pode ser induzida pelo estímulo antigênico em indivíduos sensibilizados e, em algumas ocasiões, por outras citocinas como a IL-9 e IL-25 (Temann e cols., 1998) e mediadores inflamatórios como a histamina, adenosina e endotelina-1 (Wills-Karp, 2004).

A IL-13 foi primeiramente descrita por seus efeitos em linfócitos B e monócitos, promovendo mudança de classe de imunoglobulina para IgE e induzindo a expressão de MHC de classe II (Wynn, 2003).

Os efeitos da IL-13 são mediados pela sua ligação no receptor de IL-13, o qual é um complexo multimérico composto das cadeias IL-4R α e IL-13R α 1. A cadeia IL-4R α , da citocina IL-4, também pode se associar a IL-13R α 2, porém não está elucidado qual o papel desse receptor. Após a ligação no receptor IL-4R α /IL-13R α 1 ocorre uma sinalização celular dependente de STAT6 (signal transducers and activators of transcription 6) acarretando na transcrição de diversos genes na célula alvo (Kaplan e cols., 1996). As consequências da ativação induzida por IL-13 incluem alterações nas células epiteliais, hipersecreção de muco, inflamação das vias aéreas, hiperresponsividade das vias aéreas e fibrose tissular (Wills-Karp, 2004).

Através da estimulação da produção de quimiocinas, a IL-13 recruta células inflamatórias para as vias aéreas, como eosinófilos (Wills-Karp, 2004). A hiperresponsividade brônquica pode ser observada com a administração de IL-13 nas vias aéreas, esta citocina age nas células epiteliais e na musculatura lisa das vias aéreas (Wills-Karp, 2004).

1.3.1.4 Interferon- γ (IFN- γ)

Ao avaliar o papel funcional das citocinas na asma, é importante ressaltar que elas constituem uma rede de mediadores inflamatórios que interagem mutuamente. A inflamação

nas vias aéreas pode ser induzida então, pelo aumento da produção das citocinas T_h2 ou pela redução da produção das citocinas T_h1 , que agem regulando as primeiras.

A polarização das células T CD4 para o subtipo T_h1 é induzida principalmente pela citocina IL-12, cujo principal papel é reprimir a produção de IL-4 e estimular a produção de citocinas com perfil T_h1 . A IL-12, junto com a citocina IL-18, age em sinergia induzindo a produção de IFN- γ (Foster e cols., 2002, Kips, 2001). A citocina IFN- γ pode ser produzida por diferentes tipos de células como células T CD4 T_h1 , células T CD8, células NK, macrófagos, células dendríticas, células T CD4 virgens e linfócitos B (Teixeira e cols., 2005).

Em modelos de animais desafiados antígenoicamente, observou-se que IFN- γ previne o desenvolvimento de eosinofilia nas vias aéreas e hiperresponsividade (Li e cols., 1996). No entanto, a administração de IFN- γ recombinante em asmáticos não alterou a mecânica pulmonar desses indivíduos (Boguniewicz e cols., 1995).

1.3.2 Quimiocinas

As quimiocinas são um grupo particular de citocinas quimiotáticas. Dentro do grupo de citocinas humanas e de camundongos foram reconhecidas mais de 30 quimiocinas. Os membros dessa família possuem características semelhantes como o baixo peso molecular, similaridades em suas seqüências iniciais, assim como a presença de uma região contendo dois ou quatro resíduos de cisteína, que formam pontes dissulfídicas na estrutura terciária da proteína. A família das quimiocinas pode ser separada em quatro subfamílias devido a sua composição, são elas as subfamílias C-X-C, C-C, C e CX₃C. Essa divisão é baseada na presença ou ausência de um resíduo de aminoácido localizado entre os dois primeiros dos quatro resíduos conservados de cisteína.

Estudos demonstraram que as quimiocinas podem ter diversas funções durante a inflamação, as quais podem estar relacionadas ao recrutamento celular, ativação e diferenciação das células que participam desta resposta. A expressão de determinadas quimiocinas nas vias aéreas demonstrou que podem existir perfis específicos de quimiocinas que medeiam diferentes estágios do desenvolvimento da patogênese da asma.

As fontes de quimiocinas nas vias aéreas de asmáticos incluem as células epiteliais das vias aéreas e macrófagos alveolares. Sendo estas células residentes do tecido pulmonar, as quimiocinas liberadas por elas têm efeito imediato no ambiente da via aérea e nos tecidos adjacentes (Lukacs, 2001).

Algumas quimiocinas como a CCL-5 (RANTES), CCL7 (MCP-3) e CCL13 (MCP-4) foram identificadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos (Lukacs, 2001). Essas

quimiocinas induzem o recrutamento de eosinófilos, através do seu receptor CCR3, o qual é expresso em grandes quantidades nessa célula. Na asma humana, as quimiocinas CCL5, CCL11 (Eotaxina) e CCL13 são produzidas em altos níveis no epitélio das vias aéreas (Lukacs, 2001). Além de promover o recrutamento e ativação de eosinófilos, essas quimiocinas também podem afetar outras populações leucocitárias relacionadas a asma, como basófilos e linfócitos T_h2.

1.3.3 Leucotrienos

Os leucotrienos são uma classe de mediadores inflamatórios lipídicos derivados do ácido araquidônico, produzidos pela via da lipoxigenase em muitos tipos de células. A enzima 5- lipoxigenase pode na dependência da célula e do seu estado de ativação se localizar no citosol, na membrana perinuclear e nos corpúsculos lipídicos, e sua expressão pode ser observada em mastócitos, eosinófilos, basófilos e macrófagos.

Os cisteinil-leucotrienos (LTC₄, LTD₄, LTE₄ e LTF₄) possuem ações sobre o sistema respiratório, sendo caracterizados como potentes agentes espasmógenos, provocando contração do músculo liso das vias aéreas, em humanos (Dahlen e cols., 1980). Além disso, estes leucotrienos também aumentam a secreção de muco (Marom e cols., 1982) e a permeabilidade vascular (Dahlen e cols., 1981).

Após estimulação antigênica, os cisteinil-leucotrienos são detectados em pulmões de pacientes asmáticos e no lavado broncoalveolar. Há evidências de que contribuem para a hiperreatividade brônquica dos asmáticos e, que estejam envolvidos como mediadores tanto na fase inicial quanto na fase tardia da asma (Samuelsson, 1983).

1.3.4 Histamina

A histamina foi o primeiro mediador implicado na fisiopatologia da asma a ser descrito. Este mediador é sintetizado pelos mastócitos das vias aéreas e pelos basófilos infiltrantes e é armazenado nos grânulos de ambas as células, só sendo liberados frente a um estímulo imunológico (IgE, citocinas) ou não-imunológico (ionóforo de cálcio, substância P) (Barnes, 2001).

A inalação de histamina causa broncoconstrição em pacientes asmáticos (Barnes, 2001). Além da atividade espasmódica da histamina, este mediador também afeta outros aspectos da resposta nas vias aéreas de asmáticos. A histamina induz a proliferação de células da musculatura lisa das vias aéreas, em cultura (Panettieri e cols., 1990), causa a vasodilatação, aumento do extravasamento plasmático e de secreção de muco.

1.4 Estratégias terapêuticas na asma

A asma é uma doença complexa que envolve muitas células inflamatórias, mediadores químicos e células estruturais das vias aéreas, e devido às diferenças de susceptibilidade genética e fatores ambientais diversos fenótipos são manifestados nos indivíduos asmáticos. Sendo assim, tratamentos que visem bloquear apenas uma célula ou um mediador são muitas vezes ineficientes.

Atualmente, a terapia para a asma tem dois objetivos principais: a prevenção e reversão da inflamação e o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas (Barnes, 2004). A terapia convencional baseia-se na utilização de glicocorticóides associados ao uso de broncodilatadores agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos. Alguns fármacos relevantes para o tratamento da asma serão descritos a seguir.

1.4.1 Antiinflamatórios

1.4.1.1 Glicocorticóides

Os glicocorticóides inalados são os antiinflamatórios mais eficientes para o tratamento da asma branda ou moderada (Barnes e cols., 1998).

Os glicocorticóides, após penetrarem nas células por difusão, ligam-se a receptores no citoplasma denominados GR (receptor de glicocorticóide). Após a interação com o glicocorticóide, o receptor é ativado, sofrendo uma modificação conformacional, expondo um domínio ligante de DNA. Os complexos esteróide-receptor formam dímeros que migram para o núcleo e ligam-se em determinadas regiões do DNA suprimindo a expressão de proteínas pró-inflamatórias ou ligando-se a regiões que aumentam a expressão de proteínas antiinflamatórias (Belvisi, 2004). A repressão é obtida através da inibição de diversos fatores de transcrição como o AP-1 e NF- κ B (Tak and Firestein, 2001).

Existem duas isoformas dos receptores de glicocorticóides, resultantes de *splicing* alternativo do RNA mensageiro, o GR α e o GR β (Chikanza e cols., 2003). Ambos são encontrados em praticamente todos os tecidos, no entanto, apenas o GR α é capaz de ligar aos glicocorticóides. O receptor GR β pode agir como um inibidor do GR α , impedindo a ligação deste receptor no DNA (de Castro e cols., 1996).

A utilização dos glicocorticóides em pacientes asmáticos promove uma diminuição da ação das células T CD4 e uma redução da proliferação dessas células, ocasionada principalmente, devido a inibição da transcrição dos genes da IL-2 (citocina que estimula ativação e proliferação de linfócitos T) e de seu receptor (Belvisi, 2004). A produção de prostanóides é reduzida nos asmáticos tratados com glicocorticóides, devido a inibição da

expressão de ciclooxigenase-2 promovida pelo fármaco (Belvisi, 2004). A diminuição da expressão de citocinas T_H2 e de quimiocinas envolvidas na patogênese da asma leva a uma redução no recrutamento, maturação e ativação de eosinófilos e mastócitos (Belvisi, 2004).

Os principais fármacos inalados utilizados para o tratamento de indivíduos asmáticos são o dipropionato de beclometasona, a budesonida e o propionato de fluticasona.

Na asma grave o uso de glicocorticóides inalados muitas vezes tem que ser associado ao glicocorticóide oral para reduzir a constância e a gravidade das crises. Os glicocorticóides orais acarretam um grande número de efeitos colaterais, que muitas vezes limitam o uso do fármaco a longo prazo. Além disso, mesmo glicocorticóides inalados podem ser absorvidos para a circulação sistêmica através dos pulmões ou da ingestão parcial do fármaco, acarretando também em efeitos colaterais sistêmicos (Irwin and Richardson, 2006).

Os efeitos indesejáveis dos glicocorticóides são freqüentemente observados com o uso de grandes doses ou com administração prolongada. Estes efeitos incluem: a supressão da imunidade, reduzindo respostas a infecções microbianas; a insuficiência supra-renal aguda e deficiências no metabolismo, tendo como conseqüência a osteoporose (Chikanza e cols., 2003). Em crianças, os efeitos metabólicos podem resultar em inibição do crescimento (Chikanza e cols., 2003). Outros efeitos tóxicos incluem glaucoma, elevação da pressão intracraniana, hipercoagulabilidade do sangue, febre, distúrbios no ciclo menstrual e incidência aumentada de cataratas (Chikanza e cols., 2003).

Além dos efeitos colaterais acarretados devido ao tratamento a longo prazo, é importante ressaltar que alguns pacientes asmáticos não respondem ao tratamento com glicocorticóides sistêmicos e inalados, independente da dose e do período de tratamento (Sher e cols., 1994). Diversos mecanismos que levam a resistência aos glicocorticóides foram descritos (Chikanza e cols., 2003). O neuropeptídeo pró-inflamatório prolactina, por exemplo, pode agir como um antagonista endógeno dos glicocorticóides. A prolactina age aumentando a expressão e a ativação do fator de transcrição STAT5, o qual pode se ligar ao receptor $GR\alpha$ impedindo sua ligação ao glicocorticóide, reduzindo assim a atividade deste hormônio (Chikanza e cols., 2003).

O microambiente de citocinas também pode induzir a resistência aos glicocorticóides. A citocina MIF (macrophage migration inhibitory factor) contrapõe os efeitos antiinflamatórios e imunossupressores dos glicocorticóides endógenos ou exógenos (Flaster e cols., 2007). O acréscimo das citocinas IL-2 e IL-4 *in vitro*, reduz a inibição da proliferação induzida por dexametasona. Este efeito pode ser mediado por alterações no *splicing* do RNA

mensageiro de GR α e na afinidade deste receptor pelos glicocorticóides, como observado em pacientes asmáticos (Kam e cols., 1993). Além disso, estudos com pacientes asmáticos resistentes aos glicocorticóides demonstraram que estes indivíduos exibem uma super-expressão dos receptores GR β em células mononucleares, quando comparados aos asmáticos sensíveis ao tratamento com glicocorticóide (Chikanza e cols., 2003).

Portanto, indivíduos asmáticos resistentes aos glicocorticóides e asmáticos graves, que precisam fazer uso a longo prazo desse fármaco necessitam de terapias antiinflamatórias alternativas.

1.4.1.2 Estabilizadores de mastócitos

A princípio achava-se que o efeito antiinflamatório do cromoglicato de sódio era devido unicamente a sua ação direta sobre mastócitos, impedindo a liberação de histamina. No entanto observou-se que inibidores da liberação de histamina mais potentes do que o cromoglicato de sódio não produziam efeitos antiasmáticos nos seres humanos (Barnes, 2004). Apesar do cromoglicato de sódio e a substância relacionada, nedocromil sódico, apresentarem ações inibitórias das disfunções características da asma, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido.

O tratamento com cromoglicato de sódio reduz tanto a inflamação das vias aéreas quanto mecanismos neurogênicos associados à hiperreatividade das vias aéreas na asma, provavelmente devido a depressão dos reflexos neuronais (Storms and Kaliner, 2005). Além disso, foi observado que, em pacientes asmáticos, o tratamento com cromoglicato de sódio reduziu a broncoconstrição induzida pelo desafio com carbacol (Storms and Kaliner, 2005).

Os efeitos colaterais do cromoglicato de sódio são reduzidos sendo restritos aos efeitos de irritação das vias aéreas superiores. Contudo, sua eficiência é considerada menor do que baixas doses dos glicocorticóides inalados, provavelmente devido a curta duração da ação deste fármaco (Barnes, 2004). Além disso, devido a sua curta ação, as cromonas inaladas devem ser administradas quatro vezes ao dia, um regime inconveniente para a profilaxia a longo prazo da asma (Barnes, 1997).

1.4.2 Broncodilatadores

1.4.2.1 Agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos

O alvo dos agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos é principalmente a célula da musculatura lisa das vias aéreas, a qual em humanos expressa β_2 -receptores desde a traquéia até os bronquíolos terminais (Hamid e cols., 1991). Os β_2 -agonistas são antagonistas

fisiológicos, que têm como principal ação a broncodilatação, sendo assim, podem prevenir e reverter os efeitos das substâncias broncoconstritoras, incluindo LTD₄, acetilcolina, bradicinina, prostaglandinas, histamina e endotelinas (Barnes, 1997).

Os β_2 -agonistas inibem a neurotransmissão colinérgica nas vias aéreas humanas, o que pode resultar na redução da broncoconstrição, induzida por esta via (Barnes, 1997).

Estes broncodilatadores são os mais utilizados para o tratamento da asma, sendo que os β_2 -agonistas de curta duração, como o albuterol e a terbutalina, provém o alívio dos sintomas rapidamente (Barnes, 1997). Os β_2 -agonistas de longa duração foram desenvolvidos para reduzir o número de administrações necessárias para manter o asmático estável.

Relatos na literatura demonstram que é possível a manutenção da patologia da asma somente com a utilização dos β_2 -agonistas devido ao alívio imediato dos sintomas, porém é controverso o papel desse fármaco como antiinflamatório. O efeito da utilização de β_2 -agonistas como única terapia resultou numa redução da função pulmonar e no agravamento da inflamação (Nelson, 2006). Como resultado da falta de atividade antiinflamatória deste medicamento, o guia para diagnóstico e manutenção da asma do US National Heart, Lung, and Blood Institutes (NHLBI) colocou em 1997 que os β_2 -agonistas inalados de longa duração devem ser usados somente associados ao medicamento antiinflamatório (Nelson, 2006).

A utilização dos β_2 -agonistas combinado com os glicocorticóides inalados parece ser a melhor estratégia terapêutica até hoje, inclusive os efeitos de ambos os medicamentos são melhorados quando administrados em conjunto (Barnes, 1997, Nelson, 2006). Análises *in vitro* demonstraram que a ativação do receptor β_2 -adrenérgico por β_2 -agonistas de longa duração ativam o receptor de glicocorticóides (GR), promovendo a translocação mais rápida do receptor para o núcleo, o que foi associado ao aumento do efeito antiinflamatório (Usmani e cols., 2005). Além disso, experimentos em modelos animais demonstraram que o pré-tratamento com glicocorticóide protege contra a redução da produção de receptores β_2 -adrenérgicos produzida pela longa exposição aos β_2 -agonistas (Mak e cols., 1995).

Embora os agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos sejam a terapia de escolha para controlar a broncoconstrição na asma, eles também promovem efeitos adversos em alguns pacientes. Os efeitos colaterais são pequenos nos pacientes que utilizam baixas doses de β_2 -agonistas inalados. Contudo, pacientes com asma grave, que precisam de altas doses de β_2 -agonista inalado ou oral, podem sofrer alguns efeitos indesejáveis do medicamento como tremores musculares, taquicardias, palpitações e inquietações (Barnes, 1997).

1.4.2.2 Teofilina

A teofilina vem sendo utilizada a mais de 75 anos no tratamento da asma e de doenças pulmonares obstrutivas crônicas (COPD). Os efeitos clínicos eram atribuídos totalmente a broncodilatação provocada por esse fármaco.

O mecanismo de ação pelo qual a teofilina induz a broncodilatação é, predominantemente, a inibição não-seletiva de fosfodiesterases (PDE), com conseqüente aumento de cAMP (Boswell-Smith e cols., 2006). No entanto em pequenas concentrações, o tratamento com teofilina também possui ações antiinflamatórias e imunomoduladoras, as quais podem contribuir para a eficácia desse medicamento no tratamento de pacientes com asma (Sullivan e cols., 1994).

A maior vantagem da teofilina é que sua administração pode ser feita pela via oral, e apesar do broncodilatador convencional na terapia da asma atualmente ser o β_2 -agonista, a teofilina ainda é administrada em pacientes com asma grave que são resistentes ao tratamento com glicocorticóides (Boswell-Smith e cols., 2006). Uma grande razão para a queda da popularidade do uso da teofilina é a freqüência de efeitos colaterais, como náuseas, anorexia e vômitos. A freqüência aumentada de efeitos adversos pode ser originada devido à estreita janela terapêutica da teofilina (Barnes, 1997). Um outro problema deste fármaco é que ele é metabolizado no fígado, pelo sistema do citocromo P450 e, conseqüentemente, é implicado em interações com diversas drogas comumente prescritas. Essas interações podem implicar no aumento ou na diminuição da concentração plasmática da teofilina (Boswell-Smith e cols., 2006).

1.4.2.3 Antagonistas do receptor de cisteinil leucotrienos

O receptor CysLT₁ medeia a contração das células musculares lisas das vias aéreas, extravasamento plasmático e secreção de muco (Scow e cols., 2007). Os antagonistas do receptor CysLT₁, montelukast, pranlukast e zafirlukast, bem como o inibidor da síntese de leucotrienos, zileuton são medicamentos eficazes contra a broncoconstrição (Fernandes and Goldie, 2003). Na asma alérgica, os antagonistas do receptor CysLT₁ foram capazes de atenuar a hiperresponsividade ao desafio alergênico (Fernandes and Goldie, 2003). Estes antagonistas também foram eficazes na inibição do broncoespasmo (Fernandes and Goldie, 2003). A adição dos anti-LTs à terapia com glicocorticóides inalados promove uma melhora dos sintomas dos pacientes asmáticos e reduz a dose de glicocorticóide necessária para a manutenção diária da doença (Fernandes and Goldie, 2003).

Os anti-LTs comerciais estão disponíveis em comprimido facilitando a medicação dos asmáticos. Apesar do anti-LTs terem sido um sucesso clínico na asma, eles ainda são considerados menos eficientes e mais caros do que as terapias convencionais (Barnes, 2004).

1.5 Outras estratégias terapêuticas

1.5.1 Lidocaína como uma alternativa para o tratamento da asma

A lidocaína é um anestésico local, cuja principal ação é o bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependente, causando uma inibição reversível da transmissão nervosa e um bloqueio da função neuronal em uma área circunscrita do corpo (Chernoff and Strichartz, 1990, Hollmann and Durieux, 2000). Além de sua disseminada utilização como anestésico local, a lidocaína também é usada clinicamente como um agente antiarrítmico, já que possui atividade no sistema cardiovascular, resultando principalmente na depressão miocárdica e vasodilatação (Benz and Kohlhardt, 1991). Não obstante, os anestésicos locais do tipo amida, como a lidocaína e a bupivacaína, são capazes de inibir a corrente de cálcio, o que pode estar relacionado aos seus efeitos antiarrítmicos (Benz and Kohlhardt, 1991, Coyle and Sperelakis, 1987).

Os efeitos antiinflamatórios da lidocaína estão associados com a inibição da função de células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos T_{H2} . Este fármaco pode agir destruindo a integridade funcional das estruturas do citoesqueleto, interferindo em processos celulares dependentes de Ca^{2+} , e podem interagir com lipídios membranares afetando a proliferação, ativação e a migração de células polimorfonucleares (Hollmann and Durieux, 2000). De especial interesse para o estudo da asma, foi a descoberta de que a lidocaína usada nas broncoscopias era um fator inibitório da sobrevida e da ativação dos eosinófilos provindos de pacientes asmáticos (Ohnishi e cols., 1996). Mesmo na presença de citocinas T_{H2} estimulantes da sobrevida e da ativação dos eosinófilos, a lidocaína foi capaz de induzir a apoptose celular, efeito este que não pode ser vinculado ao bloqueio dos canais de Na^+ (Ohnishi e cols., 1996, Okada e cols., 1998). A lidocaína *in vitro* também foi capaz de bloquear a liberação de histamina de mastócitos e basófilos estimulados (Yanagi e cols., 1996). Além disso, Tanaka e cols. (2002) demonstraram que o tratamento com lidocaína *in vitro* poderia reduzir a proliferação e ativação de linfócitos T_{H2} humanos, provindos de indivíduos asmáticos (Tanaka e cols., 2002).

A descoberta da inibição da sobrevida dos eosinófilos acarretou uma série de testes clínicos com pacientes asmáticos e/ou indivíduos com disfunções pulmonares que apresentavam hiperreatividade brônquica e faziam uso crônico de glicocorticóides (Decco e cols., 1999, Groeben e cols., 1999, Groeben e cols., 2000, Hunt e cols., 1996, Rosario e cols.,

2000). Nestes ensaios observou-se que a lidocaína era um potente antiinflamatório para o tratamento da asma, promovendo melhora das funções pulmonares e reduzindo a utilização dos glicocorticóides orais e inalados (Decco e cols., 1999, Hunt e cols., 1996, Rosario e cols., 2000).

A ação inibitória das funções das células inflamatórias aumenta a possibilidade promissora da aplicação da lidocaína no tratamento de doenças inflamatórias como a asma. No entanto, os mecanismos de ação pelo qual a lidocaína modula as funções das células inflamatórias permanecem pouco elucidadas (Hollmann and Durieux, 2000, Siqueira e cols., 2005).

Os anestésicos locais, como a lidocaína, são muito utilizados em procedimentos nas vias aéreas como a broncoscopia de pacientes com asma ou indivíduos que possuem hiperreatividade brônquica (Miller and Awe, 1975). Estas instrumentações podem promover broncoespasmos graves, causando risco de vida a estes pacientes (Groeben e cols., 2000). Algumas evidências na literatura demonstravam que a lidocaína administrada nas vias aéreas de pacientes asmáticos, reduzia o fluxo das vias aéreas e aumentava a resistência, sendo então um fator irritante de risco para esses indivíduos (Fish and Peterman, 1979, Miller and Awe, 1975, Weiss and Patwardhan, 1977). No entanto, foi relatado posteriormente que essa broncoconstrição era um efeito inicial, sendo minutos mais tarde observado um efeito protetor da broncoconstrição induzida pela histamina (Bulut e cols., 1996, Groeben e cols., 1999). O efeito protetor da broncoconstrição induzida por histamina foi tal qual o efeito do broncodilatador β_2 -agonista, salbutamol, sendo que os dois fármacos administrados em conjunto agiram em sinergia aumentando a broncodilatação (Groeben e cols., 2000). Os principais efeitos que podem explicar essa ação protetora da lidocaína são a supressão do reflexo neuronal e o relaxamento direto das fibras musculares lisas das vias aéreas (Bulut e cols., 1996, Groeben e cols., 1999, Groeben e cols., 2000). Groeben e Peters (2007) verificaram que o tratamento com lidocaína não prevenia a broncoconstrição induzida por metacolina, na concentração utilizada em seu ensaio. Sabendo que a metacolina promove a broncoconstrição através do estímulo direto das células musculares lisas das vias aéreas, Groeben e Peters (2007) propuseram que a atenuação da broncoconstrição induzida por histamina e por irritação mecânica conseqüentes da inalação de lidocaína, fossem efeitos diretos deste fármaco nas estruturas neuronais, atenuando os reflexos.

Os efeitos adversos do tratamento de pacientes asmáticos com lidocaína estão relacionadas ao seu efeito anestésico, sendo os mais comuns a irritação de vias aéreas, a perda de sensibilidade temporária da orofaringe e o gosto amargo (Decco e cols., 1999, Groeben e

cols., 1999, Groeben e cols., 2000, Hunt e cols., 2004, Hunt e cols., 1996). Entretanto, a alta dosagem de anestésicos locais pode acarretar em efeitos neurotóxicos levando pacientes a convulsões, seguido de coma e depressão respiratória (McCaughey, 1992). Os efeitos sobre o sistema nervoso central geralmente ocorrem quando a lidocaína é administrada sistemicamente e está associada com o bloqueio seletivo das sinapses inibitórias de neurônios corticais (Tanaka and Yamasaki, 1966). Além disso, pode ocorrer a toxicidade cardiovascular, reduzindo a contratilidade e a condução do estímulo (McCaughey, 1992).

1.5.2 JMF2-1

Em 2001, Groeben e cols. demonstraram que o efeito anestésico das vias aéreas, produzido pela lidocaína, não explicava a atenuação do broncoespasmo induzido pela histamina. Sendo assim, a ação espasmolítica da lidocaína não estava associada a sua atividade anestésica (Groeben e cols., 2001).

Com a finalidade de aprofundar o conhecimento do mecanismo de ação dos anestésicos locais na asma, da Costa e cols. (2007) sintetizaram um análogo estrutural da lidocaína, que foi chamado de JMF2-1. Este análogo, que possui uma atividade anestésica extremamente reduzida quando comparada a atividade da lidocaína, foi testado quanto a suas atividades antiinflamatórias e seu efeito espasmolítico (da Costa e cols., 2007). O composto JMF2-1 foi mais eficiente do que a lidocaína em inibir a liberação de histamina induzida por alérgeno e a contração traqueal induzida por antígeno (da Costa e cols., 2007), mesmo possuindo atividade anestésica local significativamente reduzida. O bloqueio da contração traqueal produzido pela lidocaína e pelo JMF2-1 pode estar associado ao bloqueio dos canais de cálcio (da Costa e cols., 2007).

Ratos sensibilizados e desafiados foram tratados com lidocaína ou JMF2-1 nebulizados, e ambos os compostos foram capazes de reduzir o broncoespasmo induzido por metacolina nestes animais (da Costa e cols., 2007). Além disso, da Costa e cols. (2007) demonstraram que o tratamento com JMF2-1 aerossol também produz efeitos inibitórios no infiltrado inflamatório, sendo observados números reduzidos de eosinófilos e neutrófilos em pulmões de ratos tratados.

Tendo em vista os efeitos colaterais promovidos pelas estratégias terapêuticas convencionais como os β_2 -agonistas e os glicocorticóides, a busca por terapias alternativas ainda é necessária. O uso de lidocaína na asma também demonstrou uma série de limitações, já que este fármaco produz uma broncoconstrição inicial em pacientes asmáticos e possui efeitos neurotóxicos associados com o bloqueio dos canais de Na^+ . Sendo assim, o análogo da lidocaína JMF2-1, sintetizado para ter atividade anestésica local reduzida, pode trazer

benefícios clínicos no tratamento da asma, em relação aos anestésicos locais. Apesar dos efeitos antiasmáticos benéficos produzidos pelo JMF2-1, é de extrema importância o estudo do mecanismo através do qual este composto inibe a resposta inflamatória e outros sinais cruciais associados à patogenia da asma.

2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação antiinflamatório e antialérgico do composto JMF2-1, análogo estrutural de lidocaína, visando o melhoramento seletivo de efeitos antiinflamatórios e espasmolíticos, com atenuação da propriedade anestésica local.

2.1 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar o efeito do tratamento com JMF2-1 aerossolizado na inflamação pulmonar e hiperreatividade de vias aéreas de camundongos provocados antigenicamente, comparado aos tratamentos com lidocaína nebulizada e dexametasona sistêmica (i.p.);
- ❖ Caracterizar o efeito do tratamento com JMF2-1 aerossolizado no infiltrado inflamatório pulmonar de células T CD3⁺, em camundongos provocados antigenicamente, comparado aos tratamentos com lidocaína nebulizada e dexametasona sistêmica (i.p.);
- ❖ Investigar o efeito de JMF2-1, lidocaína e dexametasona na produção de citocinas nos pulmões de camundongos provocados antigenicamente *in vivo*;
- ❖ Avaliar o efeito de JMF2-1, lidocaína e dexametasona na sobrevivência, proliferação e produção de citocinas por linfócitos estimulados antigenicamente *in vitro*.

3. Metodologia

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c de 8 semanas, acondicionados em grupos de seis animais por caixa, no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica com temperatura e umidade controladas ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 horas. Os animais foram fornecidos pelo CECAL-FIOCRUZ, sendo que todos os procedimentos foram anteriormente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Licença 0085/2001). Os camundongos DO11.10 (TCR Tg OVA) foram fornecidos pelo Dr. João Viola da Divisão de Biologia Molecular do Instituto Nacional do Câncer (INCA).

3.2 Protocolo de sensibilização e desafio antigênico

A sensibilização ativa foi realizada através da injeção subcutânea dorsal de uma suspensão contendo salina e ovoalbumina (50 μg), emulsificada em 5 mg de gel de hidróxido de alumínio, num volume final de 200 μl . Após 14 dias, os animais receberam um reforço antigênico (Booster) intraperitoneal com a mesma solução usada na sensibilização. Os camundongos foram submetidos ao desafio antigênico aerossol nos dias 19-21 pós-sensibilização. A nebulização com ovalbumina 2% ocorreu durante 30 minutos. As soluções de ovoalbumina foram preparadas utilizando-se salina estéril (NaCl 0,9%), imediatamente antes do uso. O grupo controle foi representado por animais ativamente sensibilizados e desafiados com salina estéril.

3.3 Tratamento com lidocaína, JMF2-1 e dexametasona

A lidocaína e o análogo JMF2-1 foram diluídos em salina estéril e nebulizados por 30 minutos. Os tratamentos foram feitos duas vezes ao dia, uma vez concomitante ao desafio (nos dias 19-21) e outra vez oito horas após cada desafio.

A dexametasona intraperitoneal foi diluída em salina estéril e administrada uma vez ao dia uma hora antes do desafio.

3.4 Medida de hiperreatividade brônquica

A avaliação da hiperreatividade brônquica foi realizada utilizando-se um método não invasivo de monitoramento da função pulmonar, a pletismografia barométrica de corpo inteiro (Buxco, Troy, NY) (Hamelmann e cols., 1997). Os animais foram colocados individual e isoladamente em uma câmara, 24 horas após cada desafio, e aerossolizados por 2,5 minutos com PBS e os valores foram registrados em Penh (índice de obstrução das vias aéreas).

Aerossolizações com metacolina (6; 12 e 25 mg/ml) foram realizadas, logo em seguida, nas mesmas condições, e os valores de Penh também foram registrados. Os cálculos de Penh são realizados como demonstrado a seguir:

$$\text{Penh (Enhanced Pause)} = \frac{\text{PEP}}{\text{PIP}} \times \text{Pause}$$

$$\text{Sendo Pause} = \frac{\text{Te} - \text{Tr}}{\text{Tr}}$$

3.5 Células inflamatórias no pulmão

Os camundongos BALB/c foram eutanasiados (pentobarbital sódico, 500 mg/kg, i.p.) 24 horas após o último desafio antigênico, o pulmão foi perfundido com 20 ml de salina através do coração. O pulmão direito foi retirado, pesado e digerido com 1 ml de colagenase 0,2 %, diluído em RPMI. Para isso o pulmão foi incubado duas vezes por 20 minutos em 37 °C. O homogenato foi centrifugado (1500 rpm por 5 min) e o pellet de células resuspendido com RPMI acrescido de soro bovino fetal (SBF) 10 %. O tecido foi homogenizado e filtrado por uma membrana de nylon com poros de 40 µm para barrar tecidos não digeridos. Leucócitos totais foram contados na câmara de Neubauer por microscopia ótica após a diluição na solução de Türk (ácido acético 0,2 %) e expressos em miligrama de pulmão. Eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares foram diferenciadas através da análise morfológica padrão de preparações de citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa.

3.6 Lavado broncoalveolar

Os camundongos BALB/c foram canulados e seus pulmões foram lavados com um volume de 1 ml de soro fisiológico. As células retiradas do lavado broncoalveolar foram contadas na câmara de Neubauer segundo as descrições acima. 250 µl das amostras foram utilizados para cito-centrifugação (350 RPM). Eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares foram diferenciados através da análise morfológica padrão de preparações de citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa.

A caracterização fenotípica das células do lavado broncoalveolar foi realizada através da marcação com anticorpos monoclonais contra moléculas de superfície específicas para cada subtipo de linfócito, com posterior análise por citometria de fluxo (Papiris e cols., 2005). Os camundongos BALB/c foram canulados e seus pulmões foram lavados com um volume de 1 ml de soro fisiológico, com três lavagens sequenciais. As células recolhidas do lavado broncoalveolar dos dez animais do grupo salina foram analisadas em um único *pool*. Nos

grupos de animais desafiados com OVA e nos desafiados e tratados com dexametasona sistêmica (1 mg/kg), JMF2-1 ou lidocaína aerossol (2 %) foram analisados cinco *pools* de células de cada dois camundongos. As células (10^6) de cada grupo foram plaqueadas e permaneceram incubadas com soro normal de camundongo, a fim de bloquear possíveis ligações inespecíficas. Após o bloqueio, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para os receptores de membrana CD3 (FITC), CD4 (PE) e CD8 (CY) diluídos 1:100 (Pharmlingen) durante 30 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas com 100 μ l de PBS 1 % e centrifugadas (1500 RPM por 10 minutos) para descartar o sobrenadante de PBS com o excesso de anticorpos que não se ligaram. Estas células foram então fixadas com paraformaldeído 1 % e levadas ao citômetro de fluxo FACS Calibur, onde foram analisadas quanto ao seu tamanho, granulosidade e fluorescência (Papiris e cols., 2005). O percentual de células positivas para cada sub-população linfocitária foi analisado no programa WinMDI 2.9. Para análise do número de células $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ encontradas no lavado broncoalveolar dos grupos experimentais a avaliação foi feita na região (gate) de células com tamanho e granulosidade correspondente aos linfócitos. A partir desta região os linfócitos T ($CD3^+$) foram avaliados em um Dotplot, dividindo-se dentro da população $CD3^+$ as células que não eram nem $CD4^+$, nem $CD8^+$, as células somente $CD4^+$ ou somente $CD8^+$ e as células duplo positivas. O programa WinMDI 2.9 forneceu o percentual de células $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ sendo o valor de 100 % correspondente ao número de células adquiridas pelo citômetro (10.000 células). Sendo assim, relacionamos esse total com o número de leucócitos contados na câmara de Neubauer em cada *pool*, chegando ao valor final do número de células $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ encontrados no lavado.

3.7 Quantificação de citocina de explante pulmonar

Pulmões dos camundongos BALB/c foram removidos 24 horas após o último desafio e perfundidos com 20 ml de salina através do coração. O pulmão direito foi cortado em 16 pedaços e cada 4 pedaços foram colocados em um poço, numa placa de 24 poços. Esses pulmões ficaram em cultura por 24 horas a 37 °C e 5 % de CO₂ no meio DMEM (Sigma), sem adição de soro e com adição de penicilina. Os sobrenadantes dos pulmões, somente na presença de meio ou estimulados com 0,5 mg/ml de OVA (Sigma), foram coletados e armazenados a - 20 °C até o uso. A produção espontânea de citocinas foi avaliada adicionando-se somente PBS 1 % estéril. A OVA foi adicionada em alguns poços para induzir a produção de citocina através de uma provocação antigênica *in vitro*.

A produção das citocinas IL-4, IL-13 (BioSource), IFN- γ e IL-5 (R&D) foi detectada com a técnica Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). O anticorpo capturador (100

µl por poço) foi usado para recobrir a placa, a qual permaneceu incubada em temperatura ambiente por 18 horas. A placa foi lavada e bloqueada para ligações inespecíficas com PBS – BSA 1 % (250 µl por poço), o qual permaneceu em contato com o anticorpo capturador durante 1 hora. Após esta incubação ocorreu outra lavagem, seguida das amostras e dos padrões com diluição seriada nas concentrações indicadas nos kits. Essa incubação permaneceu durante 18 horas na temperatura de 4° C. A placa foi então lavada para adição do anticorpo de detecção conjugado com streptavidina –HRP, permanecendo incubado por 1 hora. Após esse tempo, a placa foi lavada novamente e adicionou-se a enzima (1 hora). O substrato (K-Blue) foi adicionado e a reação foi interrompida com H₂SO₄ nas concentrações indicadas nos kits. Os resultados obtidos foram expressos por mg de tecido pulmonar, sendo que os explantes foram pesados após a retirada do sobrenadante.

3.8 Proliferação e produção de citocinas *in vitro*

Os linfonodos cervicais, axilares e inguinais foram retirados dos camundongos TCR Tg OVA (DO11.10) e foram macerados em DMEM com soro bovino fetal (SBF) 10%. As células (5 x 10⁴) foram plaqueadas e os estímulos foram adicionados concomitantes aos tratamentos. Como estímulo antigênico, foi utilizado a ovoalbumina 0,5 mg/ml em cada poço e três concentrações diferentes de dexametasona (5, 50 e 500 µg/ml), lidocaína e JMF2-1 (100, 300 e 600 µM) foram analisadas. Nas células não estimuladas foi adicionado PBS 1 %, sendo este o veículo usado para diluir os compostos JMF2-1, lidocaína e dexametasona. Após 72 horas na estufa à 37⁰C - 5% CO₂ a placa foi retirada e 1 µCi de timidina tritiada (Amersham Corp, Arlington Heights, Ill) foi adicionado por poço, permanecendo durante 8 horas. Após o pulso, a placa foi retirada da estufa e congelada. Para realizar a leitura da proliferação, as células foram recolhidas no *Cell Harvester* para um papel onde o DNA da célula permanece. Este papel permaneceu secando durante 24 horas e então recebeu 2 ml do líquido de cintilação. Estes tubos contendo o papel com o DNA das células e o líquido de cintilação foram analisados no cintilador (Beckmand LS 6500).

O sobrenadante destas células foi recolhido 72 horas após a estimulação para análise de secreção de citocinas, como descrito anteriormente. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de citocina (pg) por volume de sobrenadante recolhido.

3.9 Ciclo celular e Apoptose

As células obtidas dos linfonodos dos camundongos TCR Tg OVA (D011.10) estimuladas com ovoalbumina 0,5 mg/ml e tratadas com dexametasona, lidocaína e JMF2-1 foram recolhidas 72 horas após o estímulo e o tratamento. Estas células foram

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

Para avaliar a apoptose inicial, estas células foram marcadas com Anexina V e iodeto de propídeo (PI) (Biosource), nos tempos de 3, 6, 24 e 48 horas após o estímulo e tratamento, e em seguida analisadas no citômetro de fluxo (FACS Calibur).

3.10 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. As análises estatísticas envolvendo todos os grupos foram realizadas com o teste Newman-Keuls-Student. Os valores de P de 0,05 ou menores foram considerados significantes (teste bicaudal).

4. Resultados

4.1 Efeito do tratamento com o composto JMF2-1, lidocaína ou dexametasona na hiperreatividade das vias aéreas

A hiperreatividade é uma das principais características que definem a asma (Cohn e cols., 2004), sendo assim, investigamos no modelo experimental murino (Figura 4.1) a resposta ao desafio antigênico com ovoalbumina e o efeito dos tratamentos com dexametasona, lidocaína e JMF2-1 sobre a hiperresponsividade gerada.

Antes de promover a broncoconstrição com metacolina as vias aéreas dos animais dos diferentes grupos experimentais foram avaliadas e não foi observada obstrução destas vias no tempo analisado, de 24 horas após o último desafio antigênico (Figura 4.2). O desafio com aerossol de ovoalbumina (OVA) levou a um quadro de hiperreatividade das vias aéreas, em camundongos previamente sensibilizados (Figura 4.2) após o estímulo broncoconstritor da metacolina. A hiperreatividade dos animais desafiados com OVA foi observada em resposta à provocação com metacolina aerossolizada nas concentrações de 6, 12 e 25 mg/ml (Figura 4.2). Observamos, na mesma figura, que os tratamentos com o composto JMF2-1 (0,5 – 2 %), lidocaína (2 %) ou dexametasona (1 mg/kg i.p.) não alteraram os valores basais de Penh, os quais são utilizados neste bioensaio como um índice de obstrução das vias aéreas. Entretanto, todos estes tratamentos inibiram a hiperreatividade nas três concentrações de metacolina utilizadas (Figura 4.2).

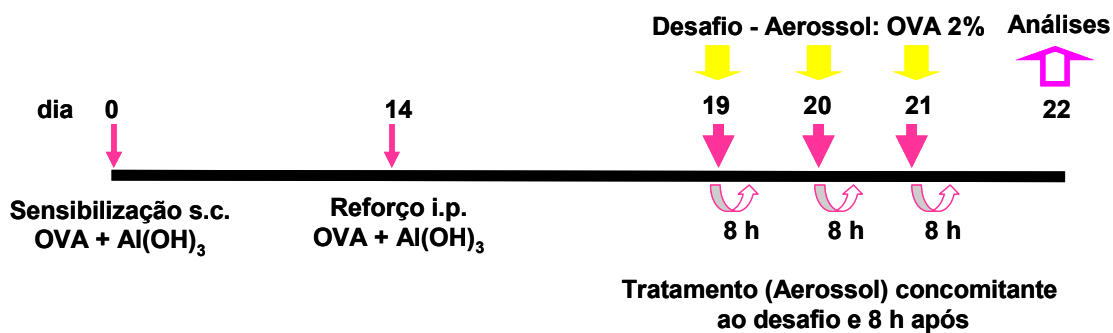


Figura 4.1: Esquema do modelo de asma aguda em camundongos BALB/c. Os animais foram sensibilizados subcutaneamente no dia 0 com ovoalbumina e hidróxido de alumínio. Quatorze dias depois, os animais receberam um reforço da sensibilização com ovoalbumina e hidróxido de alumínio intraperitoneal. Nos dias 19, 20 e 21 os camundongos foram desafiados com ovoalbumina aerossol. Os animais controles foram desafiados com salina. Os camundongos tratados com lidocaína ou JMF2-1 aerossol receberam o tratamento duas vezes ao dia, nos dias 19 a 21, durante 30 minutos com um intervalo de oito horas. Os animais tratados com dexametasona receberam tratamento intraperitoneal apenas uma vez ao dia.

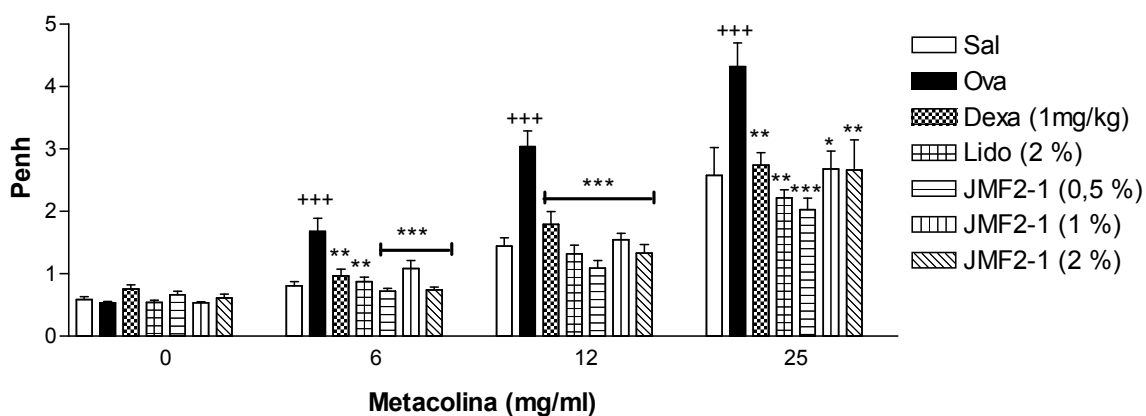


Figura 4.2: Efeito da nebulização de 30 minutos com JMF2-1 (0,5-2 %), ou lidocaína (2 %) e da administração intraperitoneal de dexametasona (1 mg/kg) em camundongos desafiados com OVA 2 %, sobre a hiperreatividade das vias aéreas, medido em Penh após aerosolização com metacolina (6,12 e 25 mg/ml), 24 horas após o último desafio antigênico. Os resultados representam média \pm erro padrão (n=7). ⁺⁺⁺ $P < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com salina. ^{*} $P < 0,05$; ^{**} $P < 0,01$; ^{***} $P < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com OVA.

4.2 Efeito do tratamento com JMF2-1, lidocaína ou dexametasona no infiltrado inflamatório pulmonar

Fatores como a inflamação, diâmetro reduzido das vias aéreas, aumento da contratilidade das células musculares, dano epitelial, disfunção na regulação neuronal, aumento da permeabilidade microvascular e mediadores inflamatórios espasmógenos estão associados à hiperresponsividade (Cohn e cols., 2004). Sabendo da importância do quadro inflamatório na evolução da patologia da asma, avaliamos o infiltrado inflamatório pulmonar no modelo murino experimental e analisamos o efeito dos tratamentos nestas células.

O animais do grupo salina apresentaram aproximadamente 5×10^4 leucócitos totais indicado por contagens das amostras dos tecidos digeridos (Figura 4.3). A provocação antigênica com ovoalbumina promoveu um maciço infiltrado leucocitário pulmonar (Figura 4.3). Os tratamentos com dexametasona sistêmica (1 mg/kg) e JMF2-1 aerossol (0,5 – 2 %) reduziram o número de leucócitos totais infiltrantes nos pulmões dos camundongos, sendo comparado aos valores encontrados nos camundongos desafiados com salina (Figura 4.3). O tratamento com lidocaína não promoveu redução significativa dos leucócitos totais (Figura 4.3).

Grande parte dos leucócitos totais encontrados nos grupos experimentais eram células mononucleares, no entanto não foi observada diferença significativa entre o número de células mononucleares nos pulmões dos camundongos desafiados com salina e dos camundongos desafiados com OVA (Figura 4.3).

O aumento do número de leucócitos totais dos animais desafiados com ovoalbumina foi marcado pelo aumento significativo do número de eosinófilos (Figura 4.3). Os tratamentos com JMF2-1 nebulizado (0,5 – 2 %), lidocaína aerossol (2 %) e dexametasona sistêmica (1 mg/kg) foram igualmente eficazes em promover a inibição total do influxo de eosinófilos para os pulmões (Figura 4.3). A inibição do influxo de eosinófilos induzido pelo composto JMF2-1 não foi dependente da dose na faixa de doses empregada, já que as três doses demonstraram o mesmo percentual de inibição.

O infiltrado de neutrófilos no pulmão não aumentou 24 h após a aplicação do estímulo antigênico (Figura 4.3), sendo observado um aumento do número destas células em camundongos tratados com dexametasona.

Nossos achados demonstraram também significativo aumento de células leucocitárias recuperadas no lavado broncoalveolar dos animais sensibilizados e provocados antígenicamente, com um importante predomínio do infiltrado eosinofílico (Figura 4.4). Apenas o tratamento com JMF2-1 (2 %) reduziu o número de leucócitos totais no lavado

broncoalveolar de camundongos desafiados com antígeno (Figura 4.4). O número de eosinófilos encontrados nas vias aéreas dos camundongos desafiados com OVA foi aproximadamente 500 vezes maior do que o número de eosinófilos encontrados em camundongos desafiados com salina (Figura 4.4). O tratamento com o composto JMF2-1 inibiu este fenômeno de forma dose-resposta dependente (Figura 4.4), sendo que o tratamento com JMF2-1 (2 %) promoveu uma redução de aproximadamente 75 % dos eosinófilos encontrados no BAL.

Dentre as células mononucleares encontradas nos pulmões de camundongos desafiados com OVA, os linfócitos T são de extrema importância no desenvolvimento da resposta asmática. Os linfócitos T CD4 diferenciados no subtipo T_H2 são células centrais na patogênese da asma, já que produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias responsáveis pela migração e ativação de demais células inflamatórias, como eosinófilos (Renauld, 2001).

Sabendo do importante papel dos linfócitos T na asma investigamos a quantidade de linfócitos T CD4 auxiliares e linfócitos T CD8 citotóxicos no lavado broncoalveolar de camundongos desafiados. Os animais que foram desafiados com ovoalbumina apresentaram grande número de linfócitos nas vias aéreas, quando comparados aos animais desafiados com salina (Figura 4.5). Apesar de observarmos aumento nas duas subpopulações de linfócitos T, nos animais desafiados com OVA, o número de linfócitos T CD4 encontrados foi aproximadamente sete vezes maior do que o número de linfócitos T CD8. Os tratamentos com dexametasona sistêmica (1 mg/kg), lidocaína (2 %) e JMF2-1 (2 %) nebulizados foram capazes de reduzir o influxo de linfócitos T CD4 e CD8 para as vias aéreas dos camundongos desafiados com OVA (Figura 4.5).

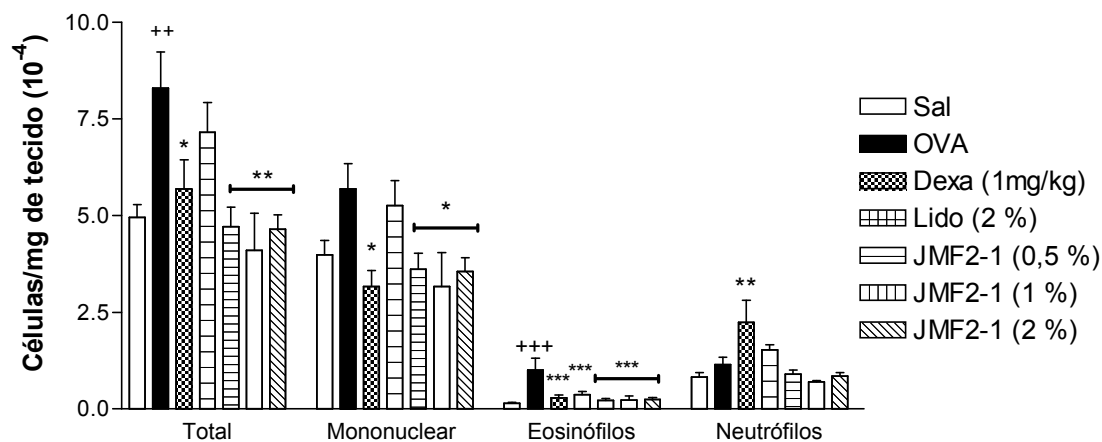


Figura 4.3: Efeito da nebulização de 30 minutos com JMF2-1 (0,5-2 %), ou lidocaína (2 %) e da administração intraperitoneal de dexametasona (1 mg/kg), em camundongos desafiados com OVA 2%, sobre o infiltrado de leucócitos totais, células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar digerido 24 horas após o último desafio. Os resultados representam média \pm erro padrão (n= 6). ⁺⁺ $P < 0,01$; ⁺⁺⁺ $P < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com salina. ^{*} $P < 0,05$; ^{**} $P < 0,01$; ^{***} $P < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com OVA.

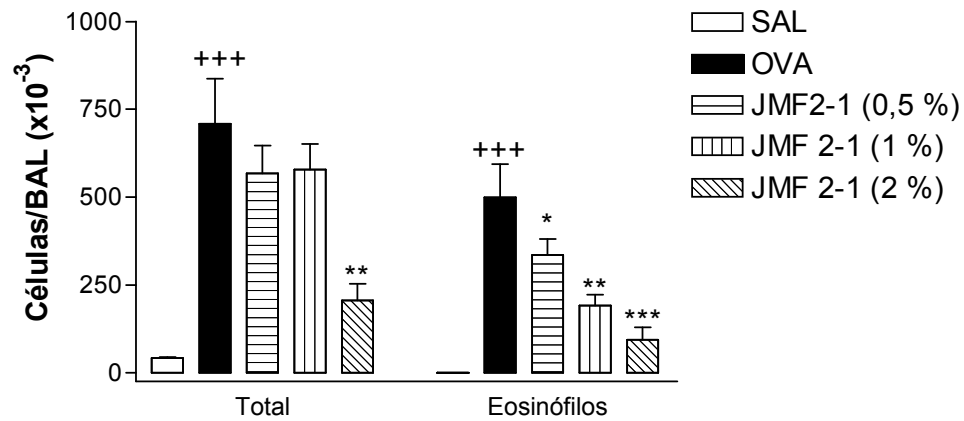


Figura 4.4: Efeito da nebulização de 30 minutos com JMF2-1 (0,5-2 %) no acúmulo de leucócitos totais e eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos desafiados com OVA 2 %, avaliado 24 horas após o último desafio. Os resultados representam média \pm erro padrão (n= 6). ⁺⁺ $P < 0,01$; ⁺⁺⁺ $P < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com salina. $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com OVA.

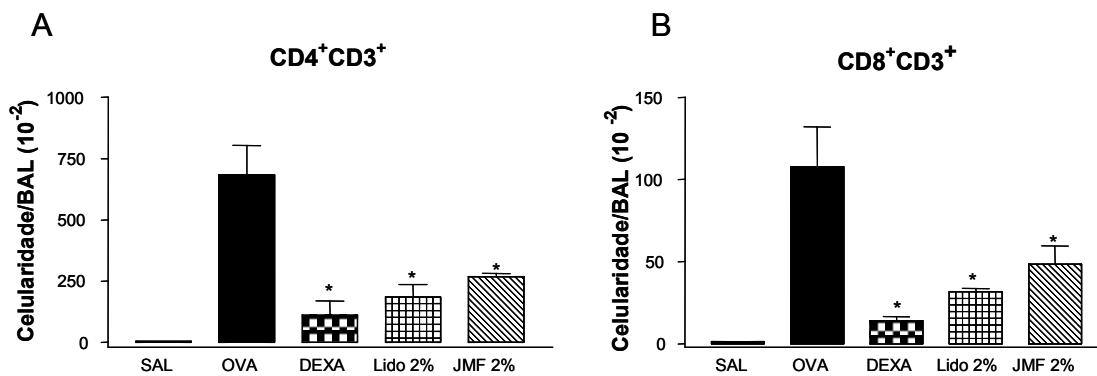


Figura 4.5: Efeito da nebulização de 30 minutos com JMF2-1 (0,5-2 %), ou lidocaína (2 %) e da administração intraperitoneal de dexametasona (1 mg/kg) sobre o infiltrado linfocitário no lavado broncoalveolar (BAL), das vias aéreas de camundongos desafiados, 24 horas após o último desafio. Os resultados representam média \pm erro padrão (grupo salina $n=1$ pool de 10 camundongos, demais grupos experimentais $n=5$ pools de 2 camundongos cada). * $P<0,05$ comparado ao grupo desafiado com OVA.

4.3 Efeito do tratamento com o composto JMF2-1, lidocaína ou dexametasona na produção de citocinas por explantes pulmonares provenientes de animais asmáticos

Os linfócitos T CD4 T_h2 participam ativamente da resposta asmática, sendo que seu principal papel está associado ao aumento da produção de mediadores inflamatórios como as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Este aumento de citocinas T_h2 já foi descrito em células isoladas (Webb e cols., 2000) e no BAL (Tomkinson e cols., 2001), após uma estimulação antigênica. Uma forma de avaliar-se a produção de citocinas pelas células dos pulmões de animais desafiados antígenicamente é através da técnica de explantes pulmonares mantidos em cultura (Proust e cols., 2003).

Observamos na figura 4.6 que a produção espontânea de IL-4 (A), IL-5 (C) e IL-13 (E) apresentou-se aumentada nos camundongos desafiados durante três dias consecutivos com OVA 2 %, comparada com a produção destas citocinas pelos pulmões dos camundongos desafiados com salina. Os tratamentos com JMF2-1 (0,5 – 2 %), lidocaína (2 %) ou dexametasona (1 mg/kg) inibiram a produção espontânea das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, detectadas no sobrenadante das culturas de explante pulmonar, 24 horas após a incubação (Figura 4.6 A, C e E, respectivamente). Após um desafio antigênico *in vitro* (OVA 0,5 mg/ml) com duração de 24 horas, a liberação de citocinas pelos explantes pulmonares de todos os grupos experimentais aumentou com relação à produção espontânea observada anteriormente (Figura 4.6 B, D e F). Este aumento foi observado principalmente nos grupos experimentais dos camundongos desafiados com OVA. Somente a produção de IL-4 foi inibida por todos os tratamentos após este desafio antigênico *in vitro* (Figura 4.6 B). O tratamento *in vivo* com dexametasona não reduziu a produção de IL-5 após o desafio antigênico *in vitro*, no entanto observamos uma tendência em reduzir a liberação desta citocina (Figura 4.6 D). A liberação de IL-13, após o desafio antigênico *in vitro*, foi inibida apenas naqueles animais previamente tratados com dexametasona (Figura 4.6 F).

Não houve aumento significativo na produção espontânea da citocina IFN- γ nos camundongos desafiados com OVA, quando comparados aos controles desafiados com salina (Figura 4.6 G). Após o estímulo *in vitro* com OVA (0,5 mg/ml) não observamos diferenças entre os grupos controles de animais desafiados com salina ou com OVA (Figura 4.6 H).

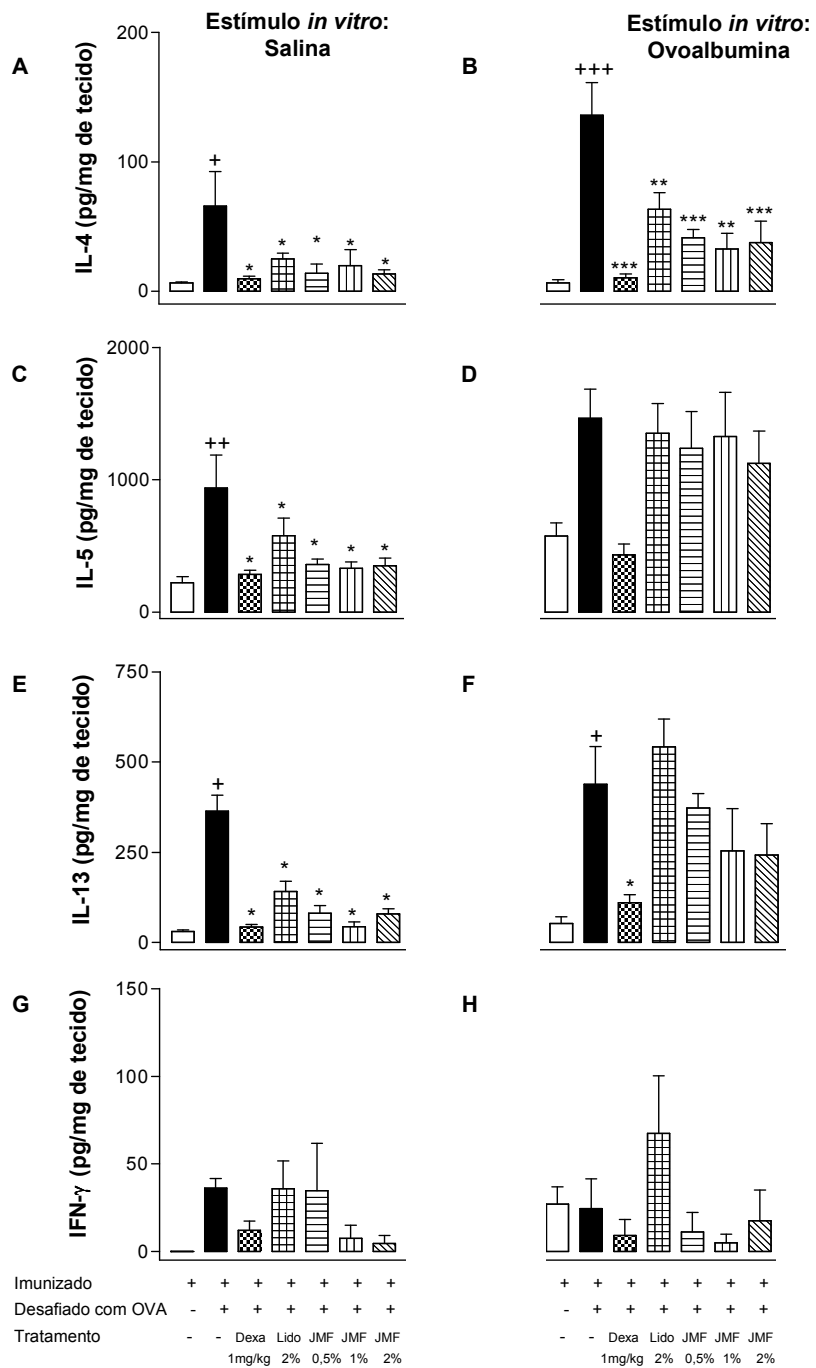


Figura 4.6: Efeito da nebulização de 30 minutos com JMF2-1 (0,5-2 %), ou lidocaína (2 %) e da administração intraperitoneal de dexametasona (1 mg/kg) sobre a produção de citocinas liberadas pelos explantes pulmonares dos camundongos desafiados com OVA 2 %. Os explantes dos pulmões retirados 24 horas após o último desafio antigênico permanecem 24 horas em cultura, sendo estimulados com salina ou com 0,5 mg/ml de OVA *in vitro*. Os resultados representam média \pm erro padrão (n= 4). $^+P<0,05$; $^{+++}P<0,001$ comparado ao grupo desafiado com salina. $*P<0,05$; $**P<0,01$; $***P<0,001$ comparado ao grupo desafiado com OVA.

4.4 Efeito do tratamento com o composto JMF2-1, lidocaína e dexametasona sobre a produção de citocinas por células dos linfonodos estimuladas antigenicamente *in vitro*

A fim de caracterizar o efeito direto do composto JMF2-1 sobre linfócitos T_h2, células dos linfonodos dos camundongos DO11.10 (TCR Tg) foram utilizadas em cultura. Os camundongos DO11.10 carregam um transgene, o qual codifica um TCR específico para o peptídeo OVA₃₂₃₋₃₃₉ de galinha, em mais de 97% dos seus linfócitos T periféricos (Murphy e cols., 1990). O desafio com OVA (0,5 mg/ml) e os tratamentos com lidocaína (100, 300 e 600 µM), JMF2-1 (100, 300 e 600 µM) ou dexametasona (100 µM) foram realizados concomitantes ao desafio. As células permaneceram em cultura por 72 horas. O estímulo com OVA induziu a liberação das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IFN-γ, sendo que a produção de IL-13 e IFN-γ foi 10 vezes maior do que a produção de IL-4 e IL-5 (Figura 4.7 A, B, C e D). O tratamento com dexametasona (100 µM) aboliu a produção de IL-5 e IFN-γ, além de reduzir de forma significativa a produção de IL-4 e IL-13 (Figura 4.7 A, B, C e D). A lidocaína (600 µM) inibiu apenas a liberação de IL-13, sendo que todas as concentrações de lidocaína utilizadas aboliram a produção de IFN-γ (Figura 4.7 C e D). O tratamento com JMF2-1 em cultura, assim como a dexametasona, provocou uma marcada redução na liberação de todas as citocinas avaliadas, sendo que apenas estes tratamentos inibiram a produção de IL-4 e IL-5 (Figura 4.7 A e B). Os tratamentos com JMF2-1 (300 e 600 µM) reduziram a liberação de IL-5 e IL-13, e a produção de IFN-γ foi totalmente inibida por todas as concentrações desse composto. A maior concentração do composto JMF2-1 inibiu drasticamente a produção de IL-4.

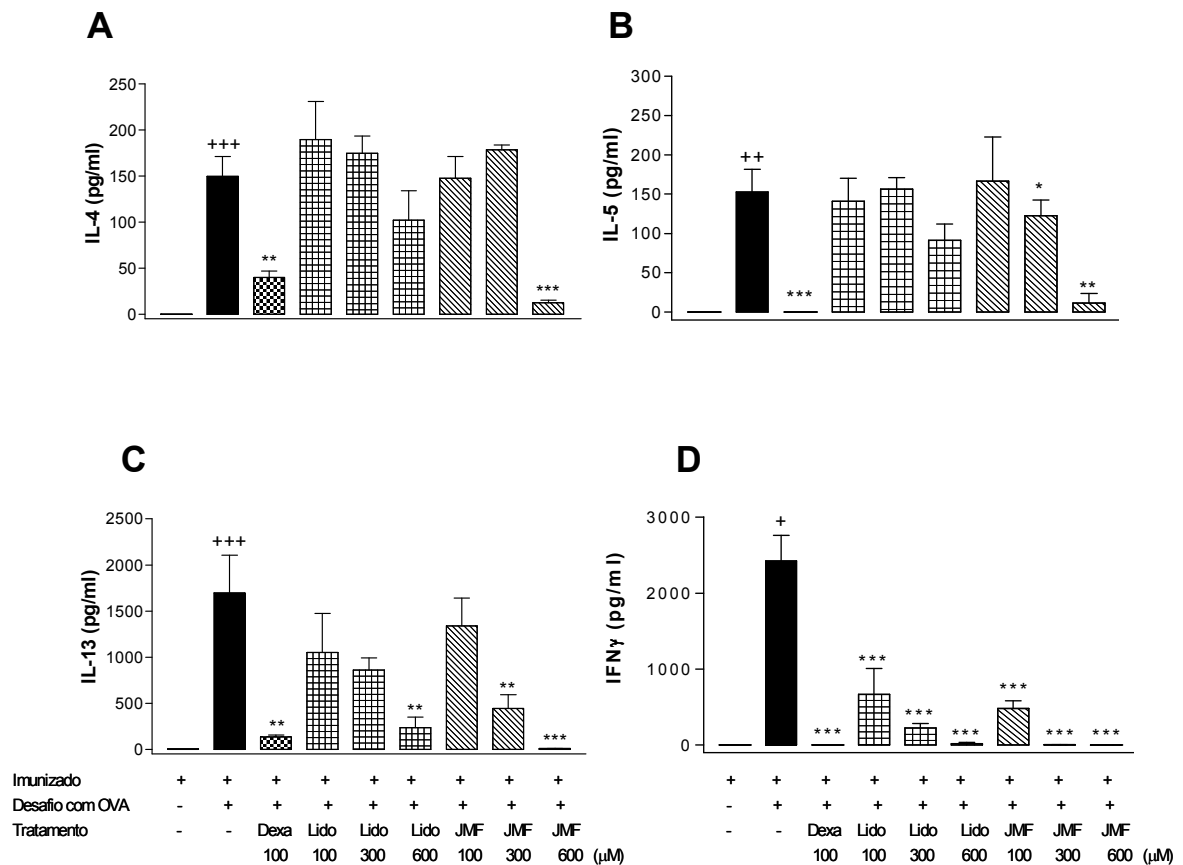


Figura 4.7: Efeito do tratamento *in vitro* com JMF2-1 (100, 300 e 600 μ M), lidocaína (100, 300 e 600 μ M) ou dexametasona (100 μ M), por 72 horas, sobre a secreção de citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ , liberadas por uma cultura de linfócitos estimulados com OVA 0,5 mg/ml. Os dados representam média \pm erro padrão de 2 experimentos separados (n=3). ⁺ $P < 0,05$; ⁺⁺ $P < 0,01$; ⁺⁺⁺ $P < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com salina. ^{*} $P < 0,05$; ^{**} $P < 0,01$; ^{***} $P < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com OVA.

4.5 Efeito do tratamento com o composto JMF2-1, lidocaína e dexametasona sobre a resposta proliferativa e sobrevivência de células dos linfonodos estimuladas antigenicamente *in vitro*

Como mostrado na figura 4.5, o tratamento com o composto JMF2-1 reduziu o infiltrado linfocitário nas vias aéreas dos camundongos desafiados antigenicamente. A fim de elucidar qual o mecanismo pelo qual o composto JMF2-1 reduz o número de linfócitos observados no BAL de camundongos desafiados com OVA, utilizamos as células dos linfonodos dos camundongos DO11.10 (TCR Tg) avaliando sua capacidade proliferativa. Quando comparado às células não estimuladas, o desafio *in vitro* com ovoalbumina (0,5 mg/ml) promoveu um aumento significativo da proliferação (Figura 4.8). Esta proliferação foi observada tanto pela aquisição e incorporação da timidina tritiada no DNA da nova célula formada (Figura 4.8), quanto pelo aumento da marcação do DNA com iodeto de propídeo (PI) nas fases S e G2, as quais representam as fases de síntese e de duplicação de DNA, respectivamente (Figura 4.9). Os tratamentos com dexametasona (100 μ M), lidocaína (600 μ M) ou JMF2-1 (300 e 600 μ M) reduziram a proliferação das células desafiadas com OVA (Figura 4.8), sendo que a maior concentração utilizada de JMF2-1 bloqueou totalmente a proliferação celular (Figura 4.8). Observamos uma parada do ciclo celular principalmente nas células estimuladas com OVA e tratadas com dexametasona (300 μ M) ou JMF2-1 (300 μ M) reduzindo a entrada das células na fase de síntese e duplicação de DNA (Figura 4.9). O tratamento com dexametasona reduziu em torno de 13,7 % a entrada das células nas fases de síntese e duplicação de DNA, já os tratamentos com lidocaína e JMF2-1 reduziram 2,9 e 12,8 %, respectivamente.

Tanaka e cols. (2002) demonstraram que o tratamento *in vitro* com lidocaína é capaz de inibir a proliferação de linfócitos humanos estimulados com o antígeno, sem afetar a viabilidade das células. Sendo assim, decidimos avaliar o efeito do composto JMF2-1 (300 μ M) na viabilidade das células dos linfonodos dos camundongos DO11.10 estimuladas com OVA, comparando ao efeito do tratamento com dexametasona (100 μ M) e lidocaína (300 μ M). Após 72 horas do desafio antigênico e dos tratamentos as células foram permeabilizadas e marcadas com iodeto de propídeo. A ausência de estímulo nas células desafiadas com salina promoveu a morte de 70,2% das células (Figura 4.10). O desafio antigênico reduziu essa marcação e aumentou a porcentagem de células viáveis, na fase G2 de proliferação (Figura 4.10). O tratamento com dexametasona induziu 86,5% de apoptose, retirando quase todas as células das fases G1 e G2 do ciclo celular (Figura 4.10). A lidocaína induziu apenas 34,0% de

apoptose, enquanto que o tratamento com JMF2-1 provocou a apoptose de 72,2% e, assim como a dexametasona, reduziu a entrada das células na fase G2 do ciclo celular (Figura 4.10).

A fim de avaliar a apoptose inicial das células estimuladas com OVA 0,5 mg/ml e tratadas com JMF2-1 (300 mM), lidocaína (300 mM) ou dexametasona (100 mM) marcamos estas células com anexina V e iodeto de propídeo. Realizamos uma análise temporal onde as células foram tratadas por 3, 6, 24 ou 48 horas com dexametasona, lidocaína ou JMF2-1. Observamos um aumento da apoptose inicial, quando comparadas às células estimuladas antígenicamente, a partir de 3 horas pós-tratamento (Figura 4.11). Com seis e com vinte e quatro horas de tratamento observamos um aumento de apoptose tardia (Figuras 4.12 e 4.13). Após quarenta e oito horas de tratamento, ocorre uma grande redução do percentual de células viáveis com conseqüente aumento no percentual de células apoptóticas na fase tardia promovida pelos tratamentos com JMF2-1 (300 mM), lidocaína (300 mM) e dexametasona (100 mM) (Figura 4.14).

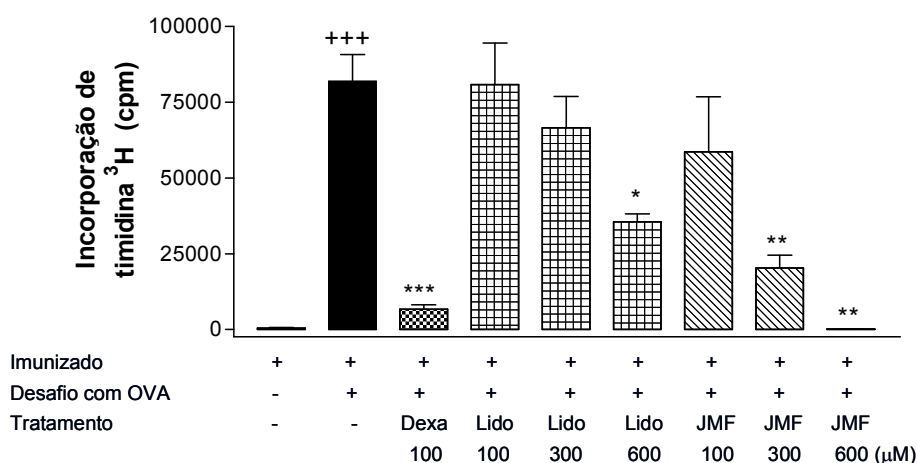


Figura 4.8: Efeito do tratamento *in vitro* com JMF2-1 (100, 300 e 600 μM), lidocaína (100, 300 e 600 μM) ou dexametasona (100 μM), por 72 horas, sobre a proliferação de uma cultura de linfócitos estimulados com OVA 0,5 mg/ml. O tempo de contato com a timidina tritiada foi de 8 horas. Os dados representam a média ± o erro padrão de 3 experimentos separados (n=4). ⁺⁺⁺ $P < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com salina. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo desafiado com OVA.

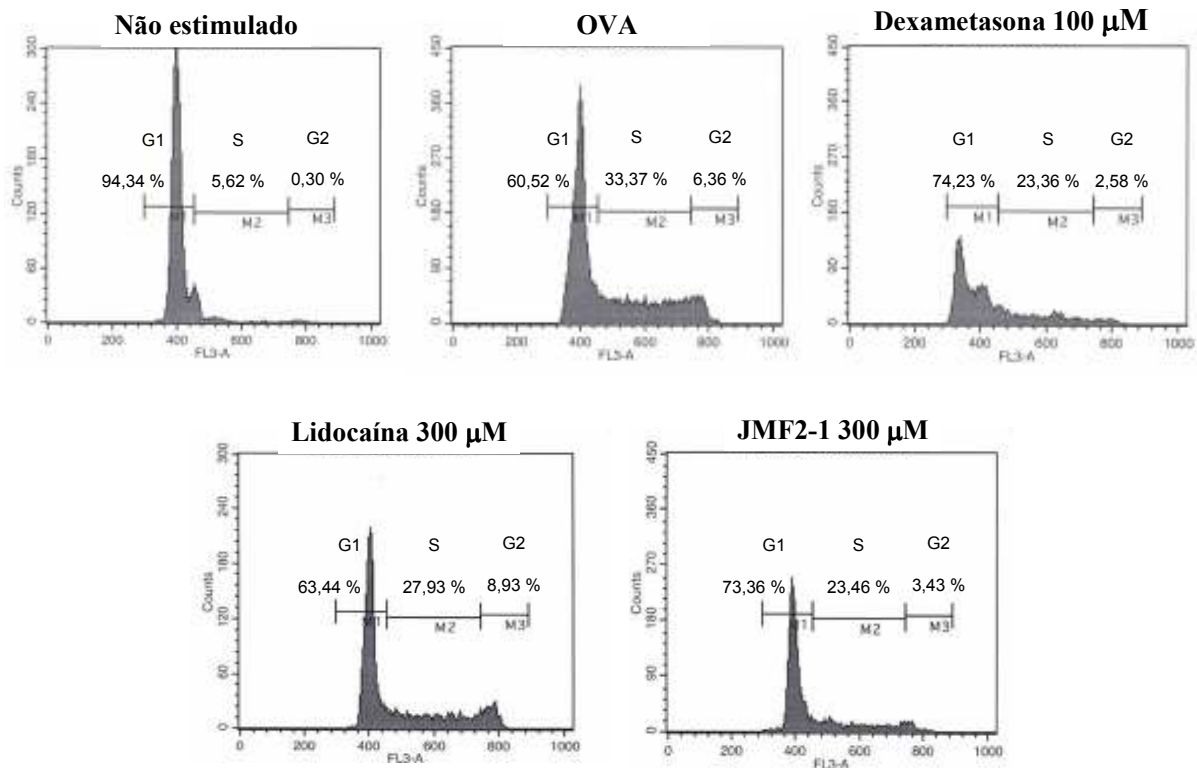


Figura 4.9: Efeito do tratamento *in vitro* com JMF2-1 (300 µM), lidocaína (300 µM) ou dexametasona (100 µM), por 72 horas, sobre o ciclo celular de uma cultura de linfócitos estimulados com OVA 0,5 mg/ml. Os dados apresentados são um experimento representativo de 2 ensaios distintos onde um *pool* de células de 3 camundongos foi analisado por citometria de fluxo.

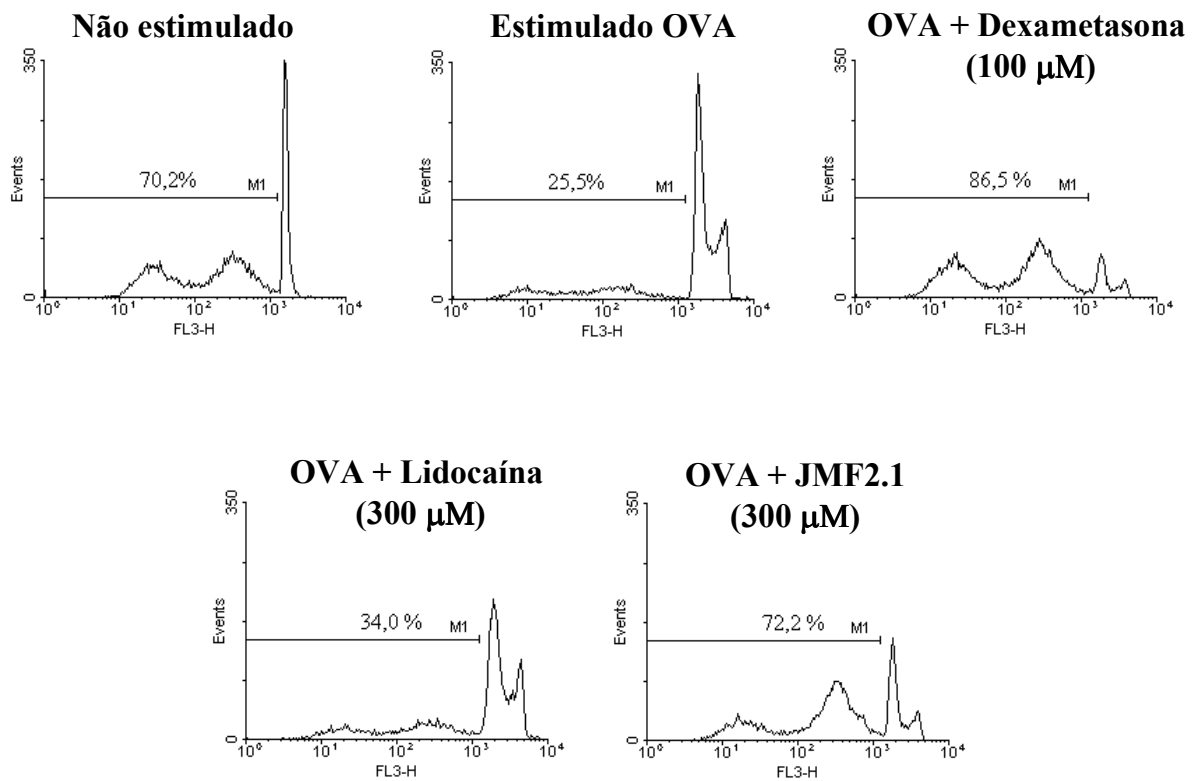


Figura 4.10: Efeito do tratamento *in vitro* com JMF2-1 (300 μ M), lidocaína (300 μ M) ou dexametasona (100 μ M), por 72 horas, sobre a sobrevivência de uma cultura de linfócitos estimulados com OVA 0,5 mg/ml. Os dados apresentados são um experimento representativo de 2 ensaios distintos onde um *pool* de células de 3 camundongos foi analisado por citometria de fluxo.

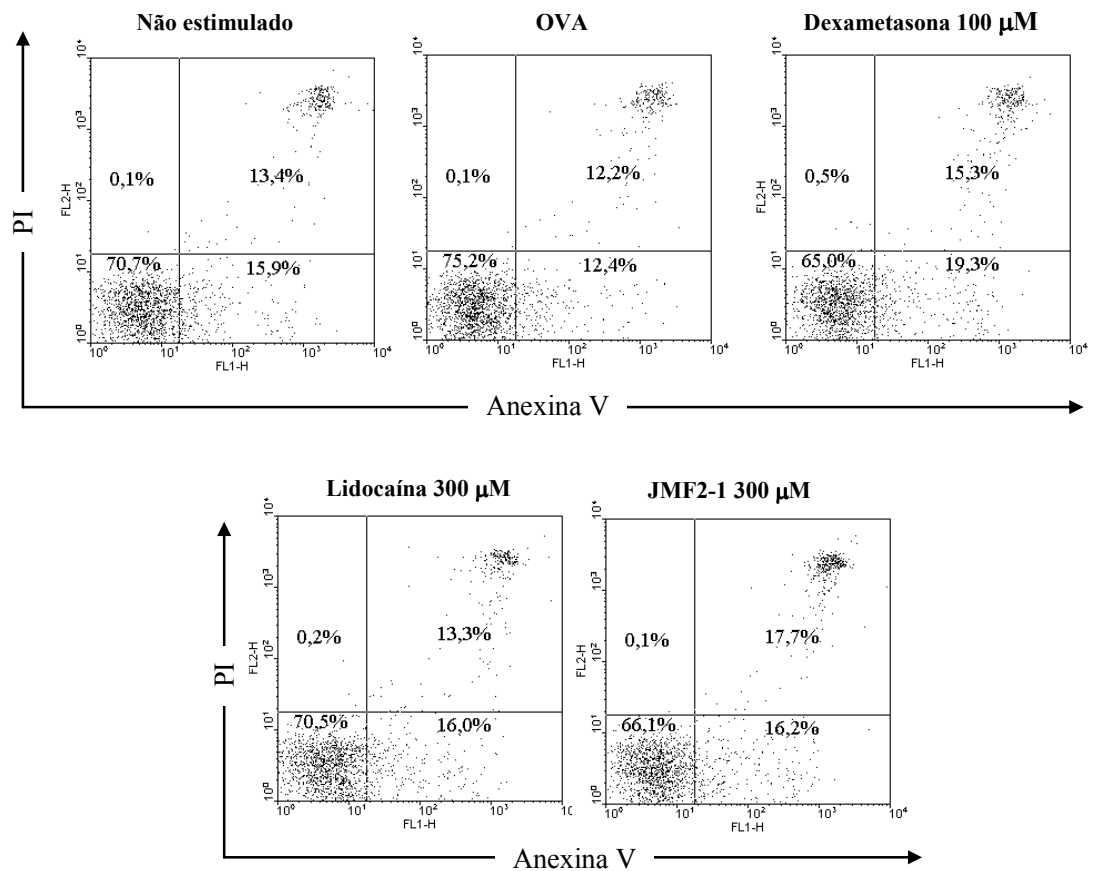


Figura 4.11: JMF2-1 (300 µM), lidocaína (300 µM) nebulizados e dexametasona intraperitoneal (1 mg/kg) induzem apoptose de células obtidas de linfonodos estimuladas com OVA 0,5 mg/ml *in vitro*, analisadas três horas após a incubação. No eixo “x” observamos a marcação com anexina V e no eixo “y” a marcação com iodeto de propídeo. O quadrante inferior da esquerda representa as células viáveis, o quadrante inferior da direita representa as células que estão em apoptose inicial, o quadrante superior da esquerda representa as células mortas por necrose e o quadrante superior da direita representa as células em apoptose tardia. Os dados apresentados são um experimento representativo de 2 ensaios distintos onde um *pool* de células de 3 camundongos foi analisado por citometria de fluxo.

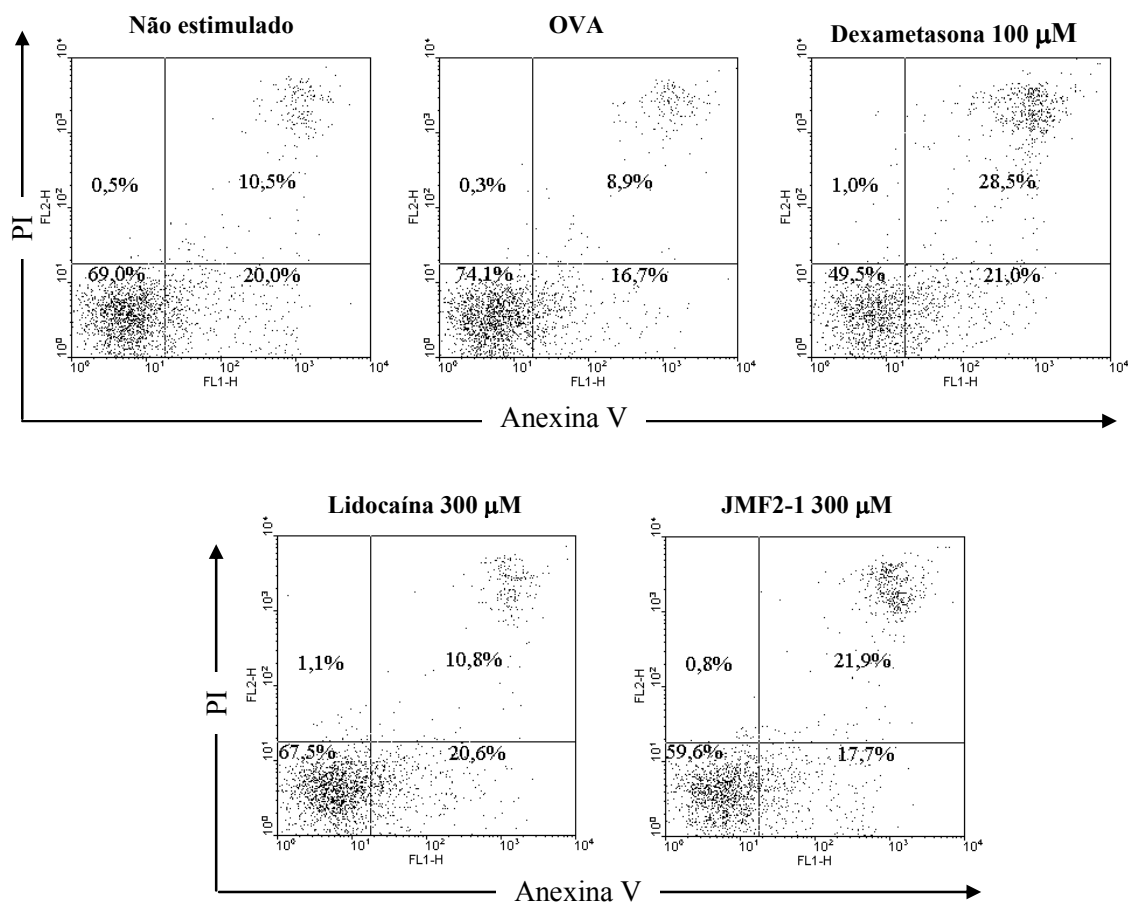


Figura 4.12: JMF2-1 (300 µM), lidocaína (300 µM) nebulizados e dexametasona intraperitoneal (1 mg/kg) induzem apoptose de células obtidas de linfonodos estimuladas com OVA 0,5 mg/ml *in vitro*, analisadas seis horas após a incubação. No eixo “x” observamos a marcação com anexina V e no eixo “y” a marcação com iodeto de propídeo. O quadrante inferior da esquerda representa as células viáveis, o quadrante inferior da direita representa as células que estão em apoptose inicial, o quadrante superior da esquerda representa as células mortas por necrose e o quadrante superior da direita representa as células em apoptose tardia. Os dados apresentados são um experimento representativo de 2 ensaios distintos onde um *pool* de células de 3 camundongos foi analisado por citometria de fluxo.

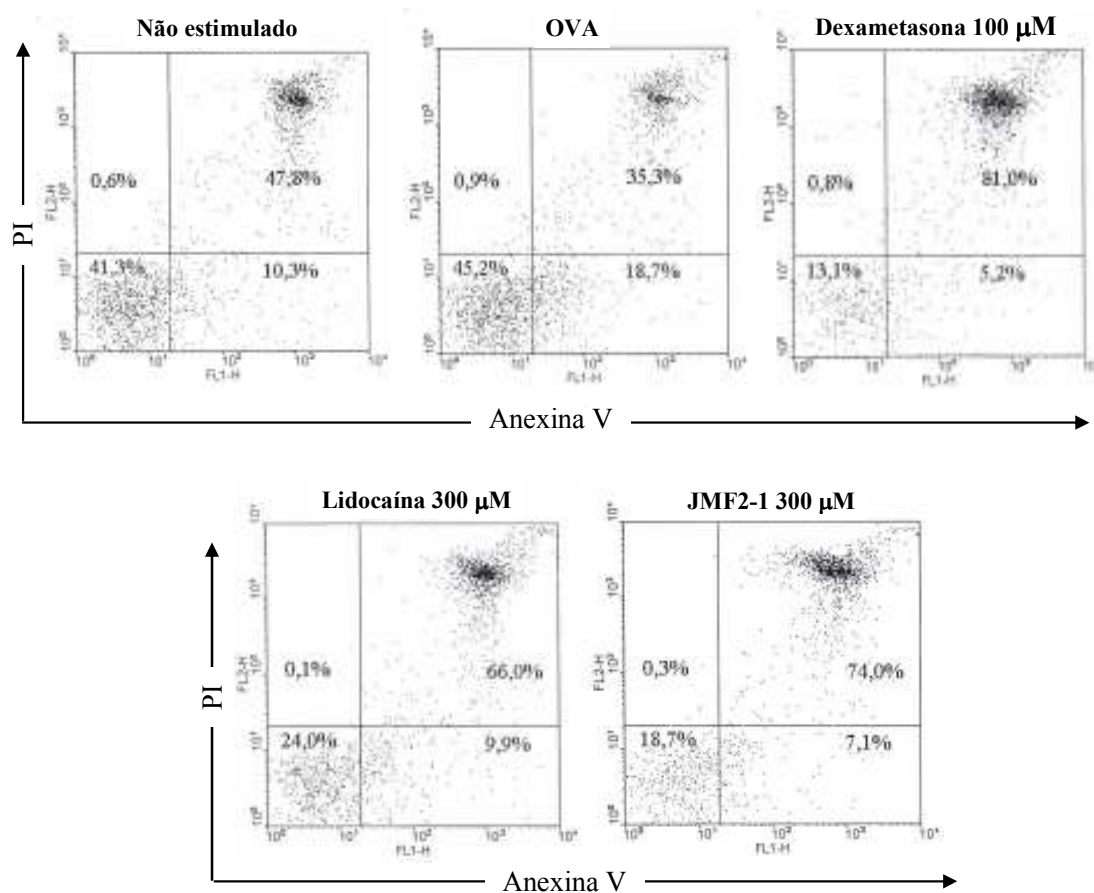


Figura 4.13: JMF2-1 (300 µM), lidocaína (300 µM) nebulizados e dexametasona intraperitoneal (1 mg/kg) induzem apoptose de células obtidas de linfonodos estimuladas com OVA 0,5 mg/ml *in vitro*, analisadas vinte e quatro horas após a incubação. No eixo “x” observamos a marcação com anexina V e no eixo “y” a marcação com iodeto de propídeo. O quadrante inferior da esquerda representa as células viáveis, o quadrante inferior da direita representa as células que estão em apoptose inicial, o quadrante superior da esquerda representa as células mortas por necrose e o quadrante superior da direita representa as células em apoptose tardia. Os dados apresentados são um experimento representativo de 2 ensaios distintos onde um *pool* de células de 3 camundongos foi analisado por citometria de fluxo.

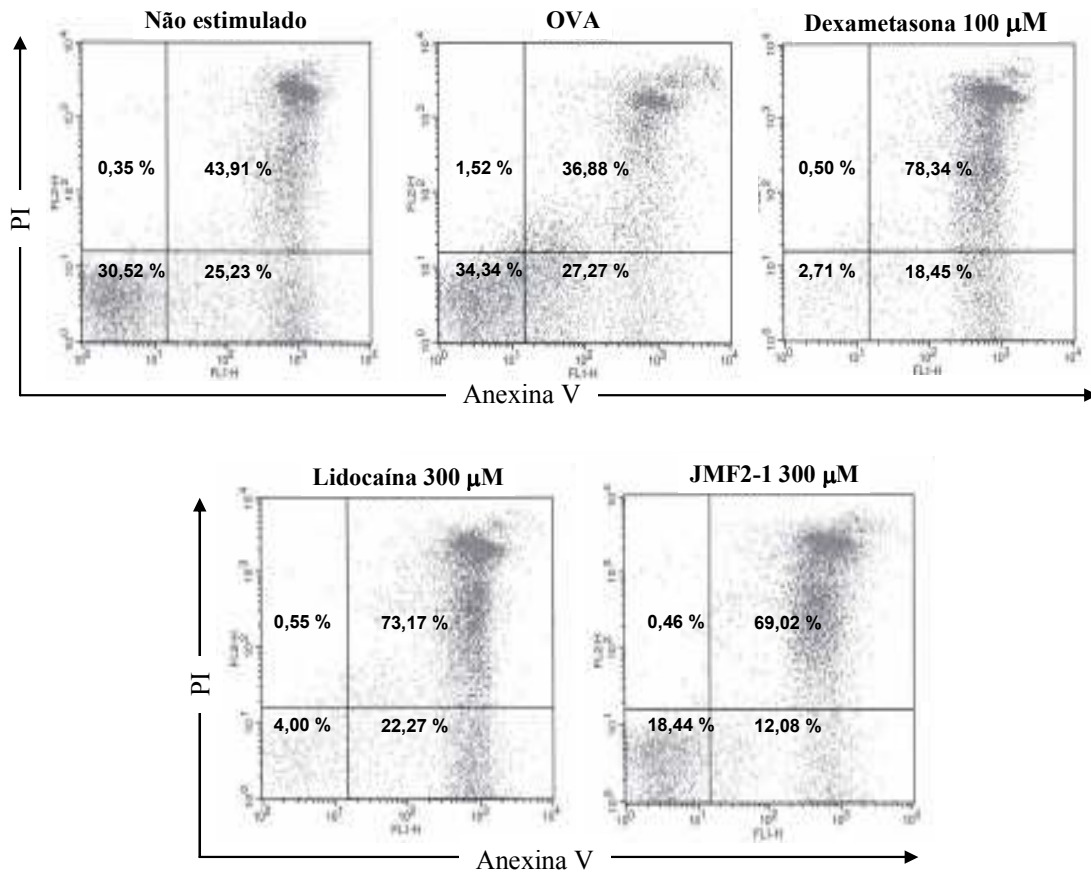


Figura 4.14: JMF2-1 (300 µM), lidocaína (300 µM) nebulizados e dexametasona intraperitoneal (1 mg/kg) induzem apoptose de células obtidas de linfonodos estimuladas com OVA 0,5 mg/ml *in vitro*, analisadas quarenta e oito horas após a incubação. No eixo “x” observamos a marcação com anexina V e no eixo “y” a marcação com iodeto de propídeo. O quadrante inferior da esquerda representa as células viáveis, o quadrante inferior da direita representa as células que estão em apoptose inicial, o quadrante superior da esquerda representa as células mortas por necrose e o quadrante superior da direita representa as células em apoptose tardia. Os dados apresentados são um experimento representativo de 2 ensaios distintos onde um *pool* de células de 3 camundongos foi analisado por citometria de fluxo.

5. Discussão

A asma é definida como uma inflamação crônica nas vias aéreas pulmonares causada por fatores ambientais em indivíduos geneticamente pré-dispostos. Obstrução das vias aéreas e hiperreatividade brônquica devido a irritantes não-específicos são os maiores sintomas da doença, que vem crescendo em muitos países e pode ser fatal (Barnes, 2004, Busse and Rosenwasser, 2003). A inflamação é uma característica central na patogênese da asma. O padrão específico de inflamação nas vias aéreas inclui um denso infiltrado eosinofílico, números aumentados de células T_H2 e mastócitos ativados (Tattersfield AE 2002). Os antígenos ativam mastócitos e linfócitos T_H2 nas vias aéreas, os quais liberam mediadores inflamatórios pré-formados e recém sintetizados, incluindo aminas vasoativas, mediadores lipídicos e citocinas, como a IL-4, IL-5 e IL-13 (Barnes, 2004, Busse and Rosenwasser, 2003, Wills-Karp, 2004).

As estratégias terapêuticas convencionais consistem na utilização combinada de broncodilatadores e agentes antiinflamatórios, dentre eles os mais utilizados são os β_2 -agonistas e os glicocorticóides, respectivamente (Barnes, 2004). Apesar da asma alérgica moderada ser bem controlada com glicocorticóides inalados, alguns pacientes com quadros de asma grave necessitam freqüentemente de glicocorticóides orais. No entanto, a utilização destes glicocorticóides a longo prazo pode levar a diversos efeitos colaterais (Barnes, 2004, Kamada e cols., 1996). Sendo assim, a busca de terapias alternativas ao uso dos glicocorticóides ainda é necessária.

A lidocaína tem despertado grande interesse como um possível agente farmacológico no tratamento da asma, porém sabe-se que a anestesia tópica nas vias aéreas causa desconforto e efeitos colaterais (Decco e cols., 1999, Hunt e cols., 2004, Hunt e cols., 1996, Rosario e cols., 2000). Dados prévios demonstraram que o análogo da lidocaína, JMF2-1, sintetizado para ter uma atividade anestésica local extremamente reduzida, foi mais potente do que a lidocaína em inibir tanto o espasmo traqueal quanto em bloquear a liberação da histamina (da Costa e cols., 2007). Além disso, JMF2-1 e lidocaína reduziram o acúmulo de eosinófilos no lavado broncoalveolar de ratos desafiados antigenicamente e inibiram a obstrução das vias aéreas provocada por metacolina *in vivo*. Esses resultados indicaram que a substituição dos radicais 2,6-dimetil por um grupo 2-trifluometil no anel benzênico da lidocaína preservou a habilidade de prevenir aspectos chaves da resposta inflamatória alérgica nos pulmões (da Costa e cols., 2007). No presente estudo, investigamos os mecanismos imunoregulatórios do composto JMF2-1, comparado à lidocaína e à dexametasona. No modelo murino de asma utilizado, o tratamento com JMF2-1 levou a uma redução dos

principais padrões característicos da resposta inflamatória na asma. Observamos que o tratamento com o composto JMF2-1 aerossolizado, bem como com lidocaína nebulizada e dexametasona intraperitoneal, preveniu o infiltrado eosinofílico e linfocitário nos pulmões de camundongos estimulados por desafio antigênico. O tratamento com JMF2-1 também foi tão eficiente quanto o tratamento com lidocaína e dexametasona na redução da hiperreatividade induzida pela metacolina e na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, demonstramos que os tratamentos *in vitro* com os compostos JMF2-1, lidocaína e dexametasona inibiram a função e sobrevivência das células T. Os dados obtidos sugerem que a inibição do infiltrado inflamatório e da hiperreatividade, provocada pelo tratamento com JMF2-1 aerossolizado, pode estar associada à redução da produção de citocinas T_H2 por linfócitos e ao aumento de apoptose linfocitária.

A inflamação, hiperreatividade e obstrução reversível das vias aéreas são características marcantes na asma e parecem estar associadas. A hiperreatividade pode ser definida como uma broncoconstrição excessiva das vias aéreas em resposta a uma variedade de estímulos. Estudos anteriores relataram evidências conflitantes sobre as ações do tratamento com lidocaína nas vias aéreas de asmáticos, descrevendo uma broncoconstrição inicial seguida de um efeito protetor da constrição (Groeben e cols., 2001, Groeben e cols., 2002, Hunt e cols., 2004). Costa e cols. (2007) relataram que a constrição das vias aéreas de ratos foi atenuada tanto pelo tratamento com lidocaína quanto pelo tratamento com JMF2-1. Os resultados obtidos em meu trabalho de tese revelaram que os tratamentos com lidocaína ou JMF2-1, assim como com dexametasona, atenuam significativamente a hiperreatividade induzida por metacolina, em camundongos desafiados com OVA. Estes resultados estão de acordo com a interpretação de que o composto JMF2-1 tem propriedades espasmolíticas relevantes e pode aliviar a falta de ar, exercendo efeitos anti-asmáticos.

Na asma, a parede das vias aéreas é infiltrada com eosinófilos e células mononucleares, as quais são em sua maioria células T CD4. Mastócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos podem estar aumentados nas vias aéreas de indivíduos asmáticos comparados aos indivíduos saudáveis. No lúmen das vias aéreas, o muco está repleto de macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células epiteliais que se desprenderam do tecido danificado. Em alguns indivíduos asmáticos, especialmente nos casos mais graves, ocorre aumento do número de neutrófilos (Cohn e cols., 2004). As células inflamatórias são responsáveis pela liberação de mediadores químicos que podem promover uma retroalimentação positiva da resposta inflamatória, como as citocinas e quimiocinas, e podem resultar em danos teciduais, como os conteúdos granulares eosinofílicos (Cohn e cols., 2004,

Tattersfield e cols., 2002). Evidências na literatura demonstram que a lidocaína possui efeitos imunoregatórios sobre os mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (Kanbara e cols., 1993, Ohnishi e cols., 1996, Okada e cols., 1998, Yanagi e cols., 1996). Nossos dados também mostraram que o tratamento com lidocaína ou JMF2-1 aerossol reduziu o infiltrado eosinofílico nos pulmões dos camundongos desafiados. Esses resultados, obtidos no modelo murino de asma, confirmam as propriedades antiinflamatórias do composto JMF2-1, observados anteriormente em ratos (da Costa e cols., 2007). Além disso, comprovam a eficiência do tratamento com JMF2-1 frente aos tratamentos com lidocaína e dexametasona.

Após o desafio antigênico, o número de neutrófilos não aumentou quando comparado ao controle desafiado com salina, porém observamos um aumento na contagem de neutrófilos nos camundongos tratados com dexametasona sistêmica. Este aumento está de acordo com dados na literatura, que demonstram uma prolongação na sobrevivência de neutrófilos induzida por glicocorticóides (Cox and Austin, 1997, Strickland e cols., 2001).

Como um orquestrador principal da resposta imune específica, os linfócitos T têm sido implicados na patogênese da asma. As células T CD4, especialmente as células que produzem um padrão de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) possuem um papel principal na patogênese desta doença (Wills-Karp, 1999, Wills-Karp, 2004). Diversos estudos estabeleceram que as células T provindas dos pulmões dos pacientes asmáticos expressam, majoritariamente, um padrão de citocinas T_H2 . Dentre as citocinas T_H2 encontradas associadas à asma pode-se ressaltar a IL-4, IL-5 e IL-13. Essas citocinas são extremamente importantes no recrutamento e ativação das células efetoras relacionadas às respostas alérgicas, como eosinófilos e mastócitos. A IL-13 está associada à hipersecreção de muco das glândulas da submucosa e/ou células caliciformes. A IL-4 e a IL-5 aumentam a adesão de eosinófilos às células endoteliais vasculares, permitindo sua migração para o parênquima pulmonar. A IL-5 está associada também a manutenção da sobrevivência de eosinófilos. A citocina IL-4 é essencial na diferenciação de demais células T CD4 em células com fenótipo T_H2 , além de ser caracterizada como indutor da mudança de classe de imunoglobulinas para IgE em linfócitos B (Gould e cols., 2003). Tratamentos terapêuticos bem sucedidos para asma estão associados com a mudança do fenótipo do padrão de citocinas T_H2 para o T_H1 , ou com a redução da expressão das citocinas T_H2 (Stam e cols., 1993). Um estudo que tratou células T CD4 humanas *in vitro* com lidocaína (Tanaka e cols., 2002), demonstrou que 100 μ M do fármaco foi capaz de inibir a expressão e a liberação de citocinas T_H2 , sem no entanto afetar a viabilidade das células (Tanaka e cols., 2002). Em nosso estudo demonstramos que o tratamento realizado *in vivo* com lidocaína ou JMF2-1 nos camundongos desafiados

antigenicamente resultou em uma diminuição da produção espontânea de IL-4, IL-5 e IL-13, avaliadas no ensaio *ex vivo* com explantes pulmonares. Após uma estimulação antigênica *in vitro* os tratamentos só foram eficazes na inibição da IL-4. A produção de IL-5 e IL-13 após o desafio *in vitro* demonstrou que os fármacos não afetaram a viabilidade de todas as células capazes de produzir estas citocinas (Wills-Karp, 2004). Estes resultados apontam para uma ação seletiva dos tratamentos, visto que tanto a lidocaína quanto o composto JMF2-1 tiveram efeitos regulatórios sobre linfócitos, mastócitos (da Costa e cols., 2007) e eosinófilos, sem no entanto afetar células não inflamatórias capazes de produzir citocinas.

Tendo em vista as ações promovidas pelas citocinas T_H2 , os tratamentos capazes de reduzir sua liberação podem acarretar uma redução da inflamação já que reduzem as conseqüências trazidas por estes mediadores pró-inflamatórios (Stam e cols., 1993). Uma vez que o aumento do infiltrado eosinofílico pulmonar (Muro e cols., 2000, Shi e cols., 2000), assim como a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 nas vias aéreas estão associados aos quadros de hiperreatividade em asmáticos (Foster e cols., 1996, Kips, 2001, Wills-Karp, 2004), o bloqueio da liberação destas citocinas, bem como a redução do infiltrado linfocitário e eosinofílico podem ser responsáveis pela inibição da hiperreatividade observada no modelo murino de asma.

A fim de avaliar o efeito do análogo da lidocaína sobre as células T, utilizamos células dos linfonodos dos camundongos DO11.10 desafiadas antigenicamente e as tratamos com JMF2-1. O tratamento com JMF2-1 inibiu a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 estimulado antigenicamente *in vitro*, demonstrando sua capacidade de interferir na função efetora de uma cultura de linfócitos estimulados. Este efeito inibitório da atividade das células T corrobora os dados obtidos nos explantes pulmonares de camundongos desafiados antigenicamente e tratados com JMF2-1. O efeito inibitório do composto JMF2-1 na cultura de células T reforça mais uma vez que a contínua produção de citocinas IL-5 e IL-13, observado em explantes de animais desafiados e tratados *in vivo* e re-estimulados *in vitro*, como uma resposta das células estruturais dos pulmões capazes de produzir citocinas T_H2 (Wills-Karp, 2004).

Apesar de mais de 97% dos linfócitos T periféricos (Murphy e cols., 1990) dos camundongos DO11.10 codificarem um TCR específico para o peptídeo OVA₃₂₃₋₃₃₉ de galinha, se diferenciando preferencialmente em uma população linfocitária com perfil T_H2 , após o estímulo antigênico observamos uma produção exacerbada de IFN- γ , uma citocina típica de resposta T_H1 . A citocina IFN- γ pode ser produzida por diferentes tipos de células como células T CD4 T_H1 , células T CD8, células NK, macrófagos, células dendríticas, células T CD4 virgens e linfócitos B (Teixeira e cols., 2005). O IFN- γ detectado por ELISA nessa

cultura de células pode ter sido liberado por células T CD8, macrófagos ou células dendríticas presentes nos linfonodos dos camundongos DO11.10. O papel do IFN- γ na asma ainda não está bem elucidado, pois em modelos experimentais pode prevenir o desenvolvimento de eosinofilia nas vias aéreas e hiperresponsividade (Li e cols., 1996), contudo a administração de IFN- γ recombinante em asmáticos não altera a mecânica pulmonar desses indivíduos (Boguniewicz e cols., 1995). O tratamento *in vitro* com JMF2-1, bem como com lidocaína ou dexametasona, foi capaz de bloquear a produção de IFN- γ demonstrando que estes compostos também podem afetar a função efetora de diversas células inflamatórias como os linfócitos T CD8 e células mononucleares (Hollmann and Durieux, 2000).

No declínio das respostas inflamatórias ocorre um processo de eliminação das células inflamatórias, geralmente decorrente da indução da morte destas células por apoptose. Muitos fármacos antiinflamatórios, como os glicocorticóides, agem também através da indução da morte por apoptose das células inflamatórias (Herold e cols., 2006, McColl e cols., 1998). Tanaka e cols. (2002) sugeriram que o tratamento *in vitro* com 100 μ M de lidocaína inibia a proliferação e produção de citocinas dos linfócitos T CD4 humanos, por um mecanismo diferente da apoptose. Entretanto outros grupos relataram que o tratamento com lidocaína *in vitro* pode induzir a apoptose de linfócitos, dependente da concentração utilizada (Boselli e cols., 2003, Kamiya e cols., 2005, Nishimura e cols., 2006, Werdehausen e cols., 2007). Segundo Kamiya e cols. (2005) a utilização de até 12 mM de lidocaína induz a apoptose de uma cultura de linfócitos, mas as concentrações superiores a 12 mM promovem a necrose dessa população celular. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com lidocaína, assim como com JMF2-1 e dexametasona, foi capaz de inibir a proliferação das células T e promover uma parada do ciclo celular, reduzindo a entrada das células na fase de síntese e duplicação de DNA. Além disso, observamos que houve grande aumento da indução de apoptose das células desafiadas e tratadas com JMF2-1, lidocaína ou dexametasona, comparadas às células somente desafiadas. Nossos dados sugerem que a diminuição da proliferação das células T induzida pelo composto JMF2-1, lidocaína e dexametasona pode estar relacionada à indução da apoptose das células inflamatórias. O aumento da apoptose dos linfócitos, induzido pelos tratamentos *in vitro* com JMF2-1, lidocaína e dexametasona, pode estar associado ao número reduzido de linfócitos T CD4 e CD8 encontrados nos pulmões de camundongos desafiados antigenicamente e tratados com JMF2-1, lidocaína e dexametasona.

A ação do composto JMF2-1 no aumento de apoptose das células DO11.10 em cultura pode não explicar completamente a modulação da produção de citocinas, já que a concentração de 300 μ M de JMF2-1 reduziu aproximadamente 30% da proliferação e induziu

cerca de 70% de morte por apoptose, sem afetar a produção de IL-4 *in vitro*. Alguns agentes antiinflamatórios como os glicocorticóides são capazes de modular a expressão de fatores de transcrição específicos para T_h2, como GATA-3 e o ativador de transcrição 6 (STAT6) (Ray and Cohn, 1999). O tratamento *in vitro* e *in vivo* com dexametasona realizado em nosso trabalho confirma uma regulação negativa da liberação de citocinas com perfil T_h2, porém ainda não está totalmente elucidado o mecanismo molecular pelo qual a lidocaína e o composto JMF2-1 agem na imunoregulação da inflamação no modelo asmático.

A lidocaína é utilizada como anestésico local e anti-arrítmico devido a sua ação bloqueadora de canais de Na⁺ e Ca²⁺ (Tetzlaff, 2000). Além disso, a lidocaína pode promover o relaxamento do músculo liso através da redução do Ca²⁺ intracelular (Kai e cols., 1993). Em um estudo anterior, observamos que o composto JMF2-1 foi mais potente do que a lidocaína em inibir o influxo celular de Ca²⁺ (da Costa e cols., 2007). A ativação de diversos canais iônicos, incluindo canais de Ca²⁺, K⁺, e Cl⁻, é importante para a indução do estado de ativação dos linfócitos T (Shapiro e cols., 1985, Wacholtz e cols., 1992). O aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular é de fundamental importância para a ativação de fatores de transcrição como JNK, NFATs e NF-κB (Clipstone and Crabtree, 1992, Hivroz-Burgaud e cols., 1991), associados com a promoção da inflamação. Portanto, os efeitos inibitórios da resposta proliferativa e produção de citocinas, induzidos por JMF2-1 e lidocaína, podem estar associados em parte com a inibição dos canais de Ca²⁺ observados nos estudos anteriores (da Costa e cols., 2007).

Neste estudo investigamos os mecanismos de ação imunoregulatórios pelo qual o composto JMF2-1, análogo estrutural de lidocaína planejado visando o melhoramento seletivo de efeitos antiinflamatórios e espasmolíticos, com atenuação da propriedade anestésica local, inibe a inflamação pulmonar no modelo de asma aguda em camundongos. O tratamento de camundongos desafiados antígenicamente com JMF2-1 bloqueou eventos cruciais relacionados à patogênese da asma provavelmente através da redução da liberação de citocinas T_h2 e da inibição das funções celulares e sobrevivência de linfócitos T. Os resultados reforçam a importância de JMF2-1 e análogos não anestésicos de lidocaína como candidatos a terapias antiasmáticas alternativas ao uso de glicocorticóides.

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o composto JMF2-1 bloqueia os eventos cruciais relacionados à patogênese da asma através da imunomodulação de linfócitos T, confirmada pela redução da liberação de citocinas T_H2 e pela inibição das funções celulares e sobrevivência das células T (Figura 6.1).

- A inalação do composto JMF2-1 ou da lidocaína, bem como o tratamento sistêmico com dexametasona reduziram o número de eosinófilos e linfócitos T encontrados nos pulmões de camundongos desafiados antígenicamente, sugerindo que o JMF2-1 possua um papel regulador da inflamação.
- A inalação do composto JMF2-1 ou da lidocaína, bem como o tratamento sistêmico com dexametasona inibiram a hiperreatividade brônquica dos animais desafiados e provocados com metacolina, sugerindo que o JMF2-1 possua propriedades relevantes como candidato à antiasmático.
- A inalação do composto JMF2-1 ou da lidocaína, bem como o tratamento sistêmico com dexametasona inibiram a secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 em culturas de explante pulmonar, obtidos dos camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina. Após um segundo desafio com ovoalbumina, dessa vez *in vitro*, a produção de IL-5 e IL-13 foi inibida quando os explantes eram provindos de camundongos tratados com dexametasona, mas não lidocaína e JMF2-1, sugerindo que o composto JMF2-1 possa inibir a atividade efetora das células inflamatórias, que produzem citocinas T_H2 .
- O tratamento *in vitro* com JMF2-1, lidocaína ou dexametasona sobre células obtidas dos linfonodos de camundongos DO11.10 - TCR transgênico estimuladas com ovoalbumina inibiu a produção de citocinas e proliferação destas células. Observamos também que o tratamento *in vitro* com JMF2-1, lidocaína ou dexametasona induziu a apoptose destas células, sugerindo que o mecanismo de ação antiinflamatório do composto JMF2-1 seja através da imunomodulação dos linfócitos T.

O bloqueio do infiltrado eosinofílico e linfocitário, assim como a redução da hiperreatividade ocorreu provavelmente através da redução da liberação de citocinas T_H2 e da inibição da sobrevivência dos linfócitos T. Estes resultados reforçam a importância do composto JMF2-1 e da lidocaína como candidatos a medicamentos antiasmáticos. Além disso, nossos dados sugerem que o tratamento de pacientes asmáticos com JMF2-1 nebulizado teria

vantagens frente ao uso de lidocaína, incluindo a ausência do efeito sobre o reflexo neuronal e a maior atividade espasmolítica e antiinflamatória. Estudos toxicológicos extensivos são cruciais antes da avaliação clínica do composto JMF2-1 como antiasmático.

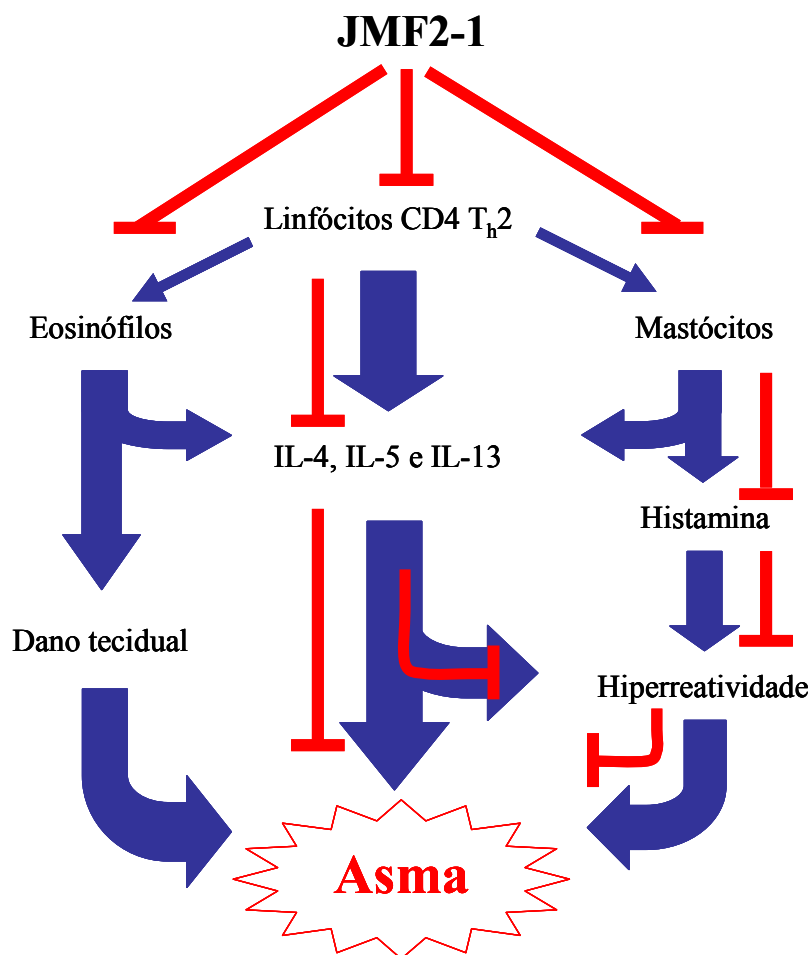


Figura 6.1: Ação antiinflamatória do composto JMF2-1. O composto JMF2-1 inibiu a atividade de células inflamatórias importantes na patogênese da asma como os linfócitos T CD4, mastócitos e eosinófilos. A inibição da atividade e da sobrevivência dos linfócitos T CD4 promoveu uma redução da produção das citocinas Th2 IL-4, IL-5 e IL-13, envolvidas na maturação, migração e ativação dos linfócitos, mastócitos e eosinófilos. A redução funcional dos eosinófilos também pode ter promovido uma redução da produção de citocinas Th2. A inibição dos mastócitos, além de acarretar na redução das citocinas Th2 liberadas, também reduziu a liberação da histamina. O bloqueio da liberação dos mediadores inflamatórios, como as citocinas e a histamina, nos pulmões dos animais desafiados provocou uma diminuição da hiperreatividade brônquica. As ações produzidas pelo composto JMF2-1 comprovam sua atividade antiinflamatória crucial no controle terapêutico da asma.

7. Referência bibliográfica

- Barnes PJ. Current therapies for asthma. Promise and limitations. *Chest*. 1997. 111: 17S-26S.
- Barnes PJ. Histamine and serotonin. *Pulm Pharmacol Ther*. 2001. 14: 329-39.
- Barnes PJ. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discov*. 2004. 3: 831-44.
- Barnes PJ, S Pedersen and WW Busse. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998. 157: S1-53.
- Belvisi MG. Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids. *Proc Am Thorac Soc*. 2004. 1: 207-14.
- Benz I and M Kohlhardt. Responsiveness of cardiac Na⁺ channels to antiarrhythmic drugs: the role of inactivation. *J Membr Biol*. 1991. 122: 267-78.
- Black J. 1997. Airway smooth muscle in asthma. *In Asthma*. PJ Barnes M.G., AR Leff, AJ Woolcock, editor. Lippencott-Raven, Philadelphia: 809-22.
- Boguniewicz M, RJ Martin, D Martin, U Gibson, A Celniker, M Williams and DY Leung. The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*. 1995. 95: 133-5.
- Boselli E, F Duflo, R Debon, B Allaouchiche, D Chassard, L Thomas and J Portoukalian. The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg*. 2003. 96: 755-6, table of contents.
- Boswell-Smith V, M Cazzola and CP Page. Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? *J Allergy Clin Immunol*. 2006. 117: 1237-43.
- Bulut Y, CA Hirshman and RH Brown. Prevention of lidocaine aerosol-induced bronchoconstriction with intravenous lidocaine. *Anesthesiology*. 1996. 85: 853-9.
- Busse WW, S Banks-Schlegel and SE Wenzel. Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000. 106: 1033-42.
- Busse WW and LJ Rosenwasser. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003. 111: S799-804.
- Chabalgoity JA, A Baz, A Rial and S Grille. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007. 18: 195-207.

- Chernoff DM and GR Strichartz. Kinetics of local anesthetic inhibition of neuronal sodium currents. pH and hydrophobicity dependence. *Biophys J*. 1990. 58: 69-81.
- Chikanza IC, D Kozaci and Y Chernajovsky. The molecular and cellular basis of corticosteroid resistance. *J Endocrinol*. 2003. 179: 301-10.
- Clinical practice guidelines. Expert Panel Report 2. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. : National Institute of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute.; 1997 Contract No.: Document Number].
- Clipstone NA and GR Crabtree. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*. 1992. 357: 695-7.
- Cohn L, JA Elias and GL Chupp. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004. 22: 789-815.
- Corrigan CJ and AB Kay. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today*. 1992. 13: 501-7.
- Cox G and RC Austin. Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J Leukoc Biol*. 1997. 61: 224-30.
- Coyle DE and N Sperelakis. Bupivacaine and lidocaine blockade of calcium-mediated slow action potentials in guinea pig ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987. 242: 1001-5.
- Cserhati E. The history of bronchial asthma from the ancient times till the Middle Ages. *Acta Physiol Hung*. 2004. 91: 243-61.
- Cserhati E. The history of bronchial asthma from the Renaissance till the beginning of the twentieth century. *Acta Physiol Hung*. 2005. 92: 181-92.
- da Costa JC, PC Olsen, R de Azeredo Siqueira, V de Frias Carvalho, MF Serra, LA Alves, RX Faria, DG Xisto, PR Rocco, RS Cordeiro, ESPM Rodrigues and MA Martins. JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats. *J Allergy Clin Immunol*. 2007. 119: 219-25.
- Dahlen SE, J Bjork, P Hedqvist, KE Arfors, S Hammarstrom, JA Lindgren and B Samuelsson. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981. 78: 3887-91.

- Dahlen SE, P Hedqvist, S Hammarstrom and B Samuelsson. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature*. 1980. 288: 484-6.
- de Castro M, S Elliot, T Kino, C Bamberger, M Karl, E Webster and GP Chrousos. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol Med*. 1996. 2: 597-607.
- Decco ML, TA Neeno, LW Hunt, EJ O'Connell, JW Yunginger and MI Sachs. Nebulized lidocaine in the treatment of severe asthma in children: a pilot study. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999. 82: 29-32.
- Dodge RR and B Burrows. The prevalence and incidence of asthma and asthma-like symptoms in a general population sample. *Am Rev Respir Dis*. 1980. 122: 567-75.
- Doull IJ, S Lawrence, M Watson, T Begishvili, RW Beasley, F Lampe, T Holgate and NE Morton. Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996. 153: 1280-4.
- Elias JA, Z Zhu, G Chupp and RJ Homer. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest*. 1999. 104: 1001-6.
- Fernandes LB and RG Goldie. The single mediator approach to asthma therapy: is it so unreasonable? *Curr Opin Pharmacol*. 2003. 3: 251-6.
- Fish JE and VI Peterman. Effects of inhaled lidocaine on airway function in asthmatic subjects. *Respiration*. 1979. 37: 201-7.
- Flaster H, J Bernhagen, T Calandra and R Bucala. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol*. 2007. 21: 1267-80.
- Floistrup H, J Swartz, A Bergstrom, JS Alm, A Scheynius, M van Hage, M Waser, C Braun-Fahrlander, D Schram-Bijkerk, M Huber, A Zutavern, E von Mutius, E Ublagger, J Riedler, KB Michaels, G Pershagen and G The Parsifal Study. Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006. 117: 59-66.
- Foster PS, SP Hogan, AJ Ramsay, KI Matthaei and IG Young. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*. 1996. 183: 195-201.

- Foster PS, M Martinez-Moczygema, DP Huston and DB Corry. Interleukins-4, -5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. *Pharmacol Ther.* 2002. 94: 253-64.
- Gould HJ, BJ Sutton, AJ Bevil, RL Bevil, N McCloskey, HA Coker, D Fear and L Smurthwaite. The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol.* 2003. 21: 579-628.
- Groeben H, T Grosswendt, MT Silvanus, G Pavlakovic and J Peters. Airway anesthesia alone does not explain attenuation of histamine-induced bronchospasm by local anesthetics: a comparison of lidocaine, ropivacaine, and dyclonine. *Anesthesiology.* 2001. 94: 423-8; discussion 5A-6A.
- Groeben H and J Peters. Lidocaine exerts its effect on induced bronchospasms by mitigating reflexes, rather than by attenuation of smooth muscle contraction. *Acta Anaesthesiol Scan.* 2007. 51: 359-64.
- Groeben H, M Schlicht, S Stieglitz, G Pavlakovic and J Peters. Both local anesthetics and salbutamol pretreatment affect reflex bronchoconstriction in volunteers with asthma undergoing awake fiberoptic intubation. *Anesthesiology.* 2002. 97: 1445-50.
- Groeben H, MT Silvanus, M Beste and J Peters. Both intravenous and inhaled lidocaine attenuate reflex bronchoconstriction but at different plasma concentrations. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999. 159: 530-5.
- Groeben H, MT Silvanus, M Beste and J Peters. Combined lidocaine and salbutamol inhalation for airway anesthesia markedly protects against reflex bronchoconstriction. *Chest.* 2000. 118: 509-15.
- Halayko AJ and Y Amrani. Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003. 137: 209-22.
- Hamelmann E, J Schwarze, K Takeda, A Oshiba, GL Larsen, CG Irvin and EW Gelfand. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997. 156: 766-75.
- Hamid QA, JC Mak, MN Sheppard, B Corrin, JC Venter and PJ Barnes. Localization of beta 2-adrenoceptor messenger RNA in human and rat lung using in situ hybridization: correlation with receptor autoradiography. *Eur J Pharmacol.* 1991. 206: 133-8.

- Herold MJ, KG McPherson and HM Reichardt. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci.* 2006. 63: 60-72.
- Hivroz-Burgaud C, NA Clipstone and DA Cantrell. Signaling requirements for the expression of the transactivating factor NF-AT in human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1991. 21: 2811-9.
- Hollmann MW and ME Durieux. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology.* 2000. 93: 858-75.
- Homer RJ and JA Elias. Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med.* 2000. 21: 331-43.
- Hunt LW, E Frigas, JH Butterfield, H Kita, J Blomgren, SL Dunnette, KP Offord and GJ Gleich. Treatment of asthma with nebulized lidocaine: a randomized, placebo-controlled study. *J Allergy Clin Immunol.* 2004. 113: 853-9.
- Hunt LW, HA Swedlund and GJ Gleich. Effect of nebulized lidocaine on severe glucocorticoid-dependent asthma. *Mayo Clin Proc.* 1996. 71: 361-8.
- Irwin RS and ND Richardson. Side effects with inhaled corticosteroids: the physician's perception. *Chest.* 2006. 130: 41S-53S.
- Jenkins MA, JL Hopper, G Bowes, JB Carlin, LB Flander and GG Giles. Factors in childhood as predictors of asthma in adult life. *BMJ.* 1994. 309: 90-3.
- Kai T, J Nishimura, S Kobayashi, S Takahashi, J Yoshitake and H Kanaide. Effects of lidocaine on intracellular Ca²⁺ and tension in airway smooth muscle. *Anesthesiology.* 1993. 78: 954-65.
- Kam JC, SJ Szeffler, W Surs, ER Sher and DY Leung. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol.* 1993. 151: 3460-6.
- Kamada AK, SJ Szeffler, RJ Martin, HA Boushey, VM Chinchilli, JM Drazen, JE Fish, E Israel, SC Lazarus and RF Lemanske. Issues in the use of inhaled glucocorticoids. The Asthma Clinical Research Network. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996. 153: 1739-48.
- Kamiya Y, K Ohta and Y Kaneko. Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomed Res.* 2005. 26: 231-9.

- Kanbara T, MK Tomoda, EF Sato, W Ueda and M Manabe. Lidocaine inhibits priming and protein tyrosine phosphorylation of human peripheral neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 1993. 45: 1593-8.
- Kaplan MH, U Schindler, ST Smiley and MJ Grusby. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity.* 1996. 4: 313-9.
- Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl.* 2001. 34: 24s-33s.
- Lange P, J Parner, J Vestbo, P Schnohr and G Jensen. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med.* 1998. 339: 1194-200.
- Larche M, CA Akdis and R Valenta. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006. 6: 761-71.
- Li XM, RK Chopra, TY Chou, BH Schofield, M Wills-Karp and SK Huang. Mucosal IFN-gamma gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice. *J Immunol.* 1996. 157: 3216-9.
- Lonjou C, K Barnes, H Chen, WO Cookson, KA Deichmann, IP Hall, JW Holloway, T Laitinen, LJ Palmer, M Wjst and NE Morton. A first trial of retrospective collaboration for positional cloning in complex inheritance: assay of the cytokine region on chromosome 5 by the consortium on asthma genetics (COAG). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000. 97: 10942-7.
- Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol.* 2001. 1: 108-16.
- Mak JC, M Nishikawa, H Shirasaki, K Miyayasu and PJ Barnes. Protective effects of a glucocorticoid on downregulation of pulmonary beta 2-adrenergic receptors in vivo. *J Clin Invest.* 1995. 96: 99-106.
- Marom Z, JH Shelhamer, MK Bach, DR Morton and M Kaliner. Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis.* 1982. 126: 449-51.
- McCaughey W. Adverse effects of local anaesthetics. *Drug Saf.* 1992. 7: 178-89.
- McColl KS, H He, H Zhong, CM Whitacre, NA Berger and CW Distelhorst. Apoptosis induction by the glucocorticoid hormone dexamethasone and the calcium-ATPase inhibitor thapsigargin involves Bcl-2 regulated caspase activation. *Mol Cell Endocrinol.* 1998. 139: 229-38.

- Miller WC and R Awe. Effect of nebulized lidocaine on reactive airways. *Am Rev Respir Dis.* 1975. 111: 739-41.
- Muro S, EM Minshall and QA Hamid. The pathology of chronic asthma. *Clin Chest Med.* 2000. 21: 225-44.
- Murphy KM, AB Heimberger and DY Loh. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α thymocytes in vivo. *Science.* 1990. 250: 1720-3.
- Nelson HS. Long-acting beta-agonists in adult asthma: Evidence that these drugs are safe. *Prim Care Respir J.* 2006. 15: 271-7.
- Nishimura Y, A Kanada, JY Yamaguchi, K Horimoto, M Kobayashi, T Tatsuishi, K Kanemaru, SY Ueno and Y Oyama. Cytometric analysis of lidocaine-induced cytotoxicity: a model experiment using rat thymocytes. *Toxicology.* 2006. 218: 48-57.
- Ohnishi T, H Kita, AN Mayeno, S Okada, S Sur, DH Broide and GJ Gleich. Lidocaine in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) is an inhibitor of eosinophil-active cytokines. *Clin Exp Immunol.* 1996. 104: 325-31.
- Okada S, JB Hagan, M Kato, JL Bankers-Fulbright, LW Hunt, GJ Gleich and H Kita. Lidocaine and its analogues inhibit IL-5-mediated survival and activation of human eosinophils. *J Immunol.* 1998. 160: 4010-7.
- Panettieri RA, PA Yadvish, AM Kelly, NA Rubinstein and MI Kotlikoff. Histamine stimulates proliferation of airway smooth muscle and induces c-fos expression. *Am J Physiol.* 1990. 259: L365-71.
- Papiris SA, A Kollintza, P Kitsanta, G Kapotsis, M Karatza, J Milic-Emili, C Roussos and Z Daniil. Relationship of BAL and lung tissue CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and their ratio in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2005. 128: 2971-7.
- Pohunek P. Inflammation and airway remodeling. *Pediatr Pulmonol Suppl.* 2004. 26: 98-9.
- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o tratamento da Asma Grave. Brasília; Portaria SAS/MS nº 1012, de 20 de dezembro de 2002.
- Proust B, MA Nahori, C Ruffie, J Lefort and BB Vargaftig. Persistence of bronchopulmonary hyper-reactivity and eosinophilic lung inflammation after anti-IL-5 or -IL-13 treatment in allergic BALB/c and IL-4 α knockout mice. *Clin Exp Allergy.* 2003. 33: 119-31.

- Ray A and L Cohn. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest*. 1999. 104: 985-93.
- Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001. 54: 577-89.
- Roche WR, R Beasley, JH Williams and ST Holgate. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989. 1: 520-4.
- Rosario NA, CA Riedi and L Farias. Lidocaine nebulization for treatment of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000. 85: 245-6.
- Saglani S and A Bush. The early-life origins of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007. 7: 83-90.
- Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*. 1983. 220: 568-75.
- Schwartz RS. Paul Ehrlich's magic bullets. *N Engl J Med*. 2004. 350: 1079-80.
- Scow DT, GK Luttermoser and KS Dickerson. Leukotriene inhibitors in the treatment of allergy and asthma. *Am Fam Physician*. 2007. 75: 65-70.
- Shapiro DN, BS Adams and JE Niederhuber. Antigen-specific T cell activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *J Immunol*. 1985. 135: 2256-61.
- Sher ER, DY Leung, W Surs, JC Kam, G Zieg, AK Kamada and SJ Szeffler. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J Clin Invest*. 1994. 93: 33-9.
- Shi HZ, JM Deng, H Xu, ZX Nong, CQ Xiao, ZM Liu, SM Qin, HX Jiang, GN Liu and YQ Chen. Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998. 157: 1818-21.
- Shi HZ, A Humbles, C Gerard, Z Jin and PF Weller. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest*. 2000. 105: 945-53.
- Siqueira RA, JC Costa, RS Cordeiro, MF Serra, PM e Silva and MA Martins. Local anaesthetic medication for the treatment of asthma. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005. 100 Suppl 1: 161-5.
- Stam WB, AJ Van Oosterhout and FP Nijkamp. Pharmacologic modulation of Th1- and Th2-associated lymphokine production. *Life Sci*. 1993. 53: 1921-34.

- Storms W and MA Kaliner. Cromolyn sodium: fitting an old friend into current asthma treatment. *J Asthma*. 2005. 42: 79-89.
- Strickland I, K Kisich, PJ Hauk, A Vottero, GP Chrousos, DJ Klemm and DY Leung. High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J Exp Med*. 2001. 193: 585-93.
- Sullivan P, S Bekir, Z Jaffar, C Page, P Jeffery and J Costello. Anti-inflammatory effects of low-dose oral theophylline in atopic asthma. *Lancet*. 1994. 343: 1006-8.
- Tak PP and GS Firestein. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001. 107: 7-11.
- Tanaka A, K Minoguchi, N Oda, T Yokoe, H Matsuo, S Okada, T Tasaki and M Adachi. Inhibitory effect of lidocaine on T cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002. 109: 485-90.
- Tanaka K and M Yamasaki. Blocking of cortical inhibitory synapses by intravenous lidocaine. *Nature*. 1966. 209: 207-8.
- Tattersfield AE, AJ Knox, JR Britton and IP Hall. Asthma. *Lancet*. 2002. 360: 1313-22.
- Teixeira LK, BP Fonseca, BA Barboza and JP Viola. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005. 100 Suppl 1: 137-44.
- Temann UA, GP Geba, JA Rankin and RA Flavell. Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med*. 1998. 188: 1307-20.
- Tetzlaff JE. The pharmacology of local anesthetics. *Anesthesiol Clin North America*. 2000. 18: 217-33, v.
- The International study of asthma and allergy in childhood (ISSAC) steering committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms: The International study of asthma and allergy in Childhood (ISSAC). *Eur Respir J* 1998. 12 315-35.
- Tomkinson A, G Cieslewicz, C Duez, KA Larson, JJ Lee and EW Gelfand. Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001. 163: 721-30.

- Usmani OS, K Ito, K Maneechotesuwan, M Ito, M Johnson, PJ Barnes and IM Adcock. Glucocorticoid receptor nuclear translocation in airway cells after inhaled combination therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005. 172: 704-12.
- von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology.* 2007. 212: 433-9.
- Wacholtz MC, EJ Cragoe, Jr. and PE Lipsky. A Na(+)-dependent Ca²⁺ exchanger generates the sustained increase in intracellular Ca²⁺ required for T cell activation. *J Immunol.* 1992. 149: 1912-20.
- Walker C, JC Virchow, Jr., PL Bruijnzeel and K Blaser. T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J Immunol.* 1991. 146: 1829-35.
- Webb DC, AN McKenzie, AM Koskinen, M Yang, J Mattes and PS Foster. Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *J Immunol.* 2000. 165: 108-13.
- Weiss EB and AV Patwardhan. The response to lidocaine in bronchial asthma. *Chest.* 1977. 72: 429-38.
- Werdehausen R, S Braun, F Essmann, K Schulze-Osthoff, H Walczak, P Lipfert and MF Stevens. Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology.* 2007. 107: 136-43.
- Wilkinson J, S Grimley, A Collins, NS Thomas, ST Holgate and N Morton. Linkage of asthma to markers on chromosome 12 in a sample of 240 families using quantitative phenotype scores. *Genomics.* 1998. 53: 251-9.
- Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.* 1999. 17: 255-81.
- Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev.* 2004. 202: 175-90.
- Wills-Karp M and SL Ewart. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet.* 2004. 5: 376-87.
- Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003. 21: 425-56.

- Yanagi H, H Sankawa, H Saito and Y Iikura. Effect of lidocaine on histamine release and Ca²⁺ mobilization from mast cells and basophils. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1996. 40: 1138-44.
- Yang IA, S Savarimuthu, ST Kim, JW Holloway, SC Bell and KM Fong. Gene-environmental interaction in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007. 7: 75-82.

Anexos

Artigo 1:

JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats. da Costa, JC, Olsen, PC, de Azeredo Siqueira, R, de Frias Carvalho, V, Serra, MF, Alves, LA, Faria, RX, Xisto, DG, Rocco, PR, Cordeiro, RS, Rodrigues e Silva PM, Martins, MA. J Allergy Clin Immunol. 2007 Jan;119(1):219-25.

Artigo 2:

Immunomodulatory potential of the lidocaine derivative JMF2-1 in a murine model of asthma. Olsen, PC, Serra, MF, da Costa, JC, Fonseca BPF, Viola JPB, Cordeiro, RS, Rodrigues e Silva PM, Martins, MA. (em elaboração).

JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats

Jorge Carlos Santos da Costa, PhD,^{a,b} Priscilla Christina Olsen, BSc,^a Rodrigo de Azeredo Siqueira, MD, MSc,^a Vinicius de Frias Carvalho, PhD,^a Magda Fraguas Serra, PhD,^a Luiz Anastácio Alves, PhD,^a Robson Xavier Faria, MSc,^a Debora Gonçalves Xisto, MSc,^d Patricia Rieken Macêdo Rocco, MD, PhD,^d Renato Sérgio Balão Cordeiro, PhD,^b Patricia Machado Rodrigues e Silva, PhD,^b and Marco Aurélio Martins, PhD^a Rio de Janeiro, Brazil

Background: Prior reports show that nebulized lidocaine might be an effective treatment for asthma.
Objective: We sought to determine the anti-inflammatory and spasmolytic effects of lidocaine and its analogue, JMF2-1, which we have synthesized for reduced local anesthetic activity.
Methods: Blockade of Na⁺ currents was assayed in cultured GH₃ cells by using the patch-clamp technique, whereas anesthesia was assessed in a cutaneous pinching test in rats. Lidocaine and its analogue were nebulized into sensitized rats for evaluation of their effectiveness on airways spasm and inflammation induced by methacholine and allergen, respectively. Tissue histamine release and tracheal spasm triggered by allergen challenge in the absence and presence of these treatments were also examined *in vitro*.
Results: The 50% inhibitory concentration values for blockade of Na⁺ currents after treatment with JMF2-1 (25.4 mM) was remarkably higher than that of lidocaine (0.18 mM), which is consistent with the weak anesthetic capacity of this analogue. In contrast, JMF2-1 was more potent than lidocaine in inhibiting allergen-induced histamine release and tracheal spasm. In *in vivo* settings methacholine-induced increase in lung resistance (145%) significantly reduced to 72% and 47% after lidocaine and JMF2-1 treatment, respectively. Both treatments inhibited by about 81% allergen-evoked eosinophil accumulation into the lung tissue.

Conclusion: Replacement of the 2,6-dimethyl radicals by the 2-trifluoromethyl group on the benzene ring of lidocaine significantly reduces anesthetic activity, preserving its ability to prevent key aspects of the allergic inflammatory response in the lung.
Clinical implications: Nebulized JMF2-1 might be a means of achieving the antiasthmatic effects of lidocaine without the anesthetic effects. (*J Allergy Clin Immunol* 2007;119: 219-25.)

Key words: Asthma, local anesthetics, lidocaine, rat model

Asthma is defined as a chronic inflammation of the lung airways caused by environmental factors in genetically predisposed individuals. Episodic airway obstruction and bronchial hyperresponsiveness to nonspecific irritants are the major symptoms of this disease, which is on the increase in many countries and can be fatal.^{1,2} Inflammation is central in the pathogenesis of asthma. The antigens activate mast cells and T_H2 lymphocytes in the airways, which then release preformed and neosynthesized inflammatory mediators, including vasoactive amines, lipid mediators, and cytokines, such as IL-4, IL-5, and IL-13.^{1,3} A marked feature of this process is the massive infiltration of eosinophils. Interestingly, numerous experimental and clinical observations have linked eosinophil derivatives with the asthmatic dysfunction, leading to the assumption that drugs able to downregulate eosinophil recruitment and activation might have great therapeutic potential in asthma control.¹⁻⁵

Local anesthetics are known for their ability to block voltage-sensitive sodium channels, which are responsible for the increase in sodium permeability during the rapid rising phase of the action potential in excitable cells, such as neurons and cardiac and smooth muscle cells.⁴ Lidocaine, first synthesized in 1943, is still largely used as a short-acting local anesthetic and antiarrhythmic agent. However, it is now well established that lidocaine has also significant effects on nonexcitable cells, including neutrophils,⁵ monocytes,⁶ T_H2 lymphocytes,⁷ mast cells,⁸ and eosinophils,⁹⁻¹¹ raising the possibility of alternative clinical uses to control chronic inflammatory diseases, including asthma.

From ^athe Department of Physiology and Pharmacodynamics, IOC, ^bFarmanguinhos, and ^cthe Department of Immunology, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), and ^dthe Laboratory of Pulmonary Investigation, Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
Supported by FAPERJ—Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (grant no. E-26/152.478/2002), CNPq—Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant no. 501234/2003-9), and FDTIS—Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde, FIOCRUZ, Brazil.
Disclosure of potential conflict of interest: J. C. Costa, R. Siqueira, and M. A. Martins have patent licensing arrangements involving the compound JMF2-1. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.
Received for publication May 3, 2006; revised July 25, 2006; accepted for publication August 29, 2006.
Available online October 18, 2006.
Reprint requests: Marco Aurélio Martins, PhD, Department of Physiology and Pharmacodynamics, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Av Brasil 4365, Caixa Postal 926, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: mmartins@ioc.fiocruz.br
0091-6749/532.00
© 2007 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
doi:10.1016/j.jaci.2006.08.037

Abbreviations used

IC₅₀: 50% inhibitory concentration
 Pes: Esophageal pressure
 Ptr: Tracheal pressure
 V': Airflow

In 1996, Ohnishi et al¹¹ first reported the proapoptotic effect of lidocaine on eosinophils *in vitro*, strongly motivating further studies in asthmatic patients. In fact, recent clinical observations support the interpretation that lidocaine has glucocorticoid-sparing properties in atopic asthmatic subjects, as attested by a significant increase in FEV₁ measurements and reduction in nighttime awakenings, symptoms, bronchodilator use, and blood eosinophil counts.¹²⁻¹⁵

It is well established that in asthmatic patients airway instrumentation, such as endotracheal intubations, can cause life-threatening bronchospasm¹⁶ and that lidocaine, when administered both intravenously or as an aerosol, significantly attenuates that sort of reflex bronchoconstriction.¹⁷ Inhaled lidocaine can also diminish the response to an inhalational provocation with hyperosmolar saline solution,¹⁸ histamine,¹⁹ and water.²⁰ On the other hand, the usefulness of this treatment in asthma is still debatable because lidocaine itself produces an initial airway irritation and bronchoconstriction in asthmatic patients, as attested by a reduction in FEV₁ and other changes.²¹⁻²⁵ While trying to gain further understanding of the mechanism of action of local anesthetics in asthma, we sought to compare the putative anti-inflammatory and spasmolytic effects of lidocaine with those of a structural lidocaine analogue, 2-diethylamine-2'-trifluoromethyl-acetoanilide hydrochloride, here termed JMF2-1, which we have synthesized and screened for reduced local anesthetic activity.

METHODS**Animals**

Wistar rats (180-250 g) and Swiss-Webster mice (20-25 g) were obtained from the Oswaldo Cruz Foundation breeding facility and kept in the animal-housing facilities of the Department of Physiology and Pharmacodynamics at a controlled room temperature (22°C-25°C) and with a 12-hour (6 AM-6 PM) light/dark cycle. All the procedures involving care and use of laboratory animals in this study were examined and approved by the Animal Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA-FIOCRUZ, Prot. 00085-02).

Neurobehavioral evaluation

The nocifensive cutaneous reaction was evaluated in naive rats on the basis of the withdrawal reflex to pinching on cutaneous sites on their backs that were previously injected intradermally with increasing doses of lidocaine or analogues (1-4 μ mol per site) in a final volume of 50 μ L in 5-minute intervals. An area of anesthesia was considered present when the rat did not squeak or withdraw the skin within 4 seconds of starting skin clamping, as previously described.²⁶ Lidocaine and JMF2-1 solutions were prepared by using physiologic saline (0.9% NaCl solution).

Whole-cell voltage clamp experiments, cell culture, and treatments

Rat clonal pituitary GH₃ cells were kindly provided by Eduardo Arz (Laboratory of Physiology and Molecular Biology, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina). GH₃ cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FCS, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL) and plated on a glass sheet at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere to be used within 1 to 2 days. Ion-channel currents in GH₃ cells were recorded by means of a patch-clamp technique.²⁷ Na⁺ currents were recorded in saline solution in the presence or absence of lidocaine or JMF2-1.

Anaphylactic histamine release from rat subcutaneous tissue fragments *in vitro*

Immunized rats were killed in a CO₂ atmosphere, and fragments from dorsal subcutaneous tissue (approximately 1 mg) were removed and placed in 48-well plates containing HBSS with Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ in a final volume of 700 μ L. The fragments were exposed to ovalbumin (300 μ g/mL) for 1 hour, and then the plates were centrifuged at 150g for 10 minutes, and the samples were collected and added to 0.8 N perchloric acid (1:2 dilution) as previously reported.²⁸ The tissue system was pretreated with the target substance or its vehicle at 37°C for 1 hour to test the potential effect of lidocaine and JMF2-1 (10⁻⁹ to 10⁻³ M) on ovalbumin-evoked histamine release. After centrifugation at 170g for 10 minutes, the supernatant was collected and stored at -20°C for histamine fluorimetric quantification, as previously reported.²⁹

For laboratory procedures concerning (1) isolated tracheal preparation and measurement of tension, (2) assessment of *in vivo* respiratory mechanics, and (3) sensitization, challenge, and treatments, see the Methods section in the Online Repository at www.jacionline.org.

Seizure incidence

Mice were randomly divided into groups of 10 animals. Ten minutes after intraperitoneal administration of lidocaine or JMF2-1 (40-500 mg/kg), the animals were observed for the occurrence or absence of seizures, as previously reported.³⁰

Chemicals

Lidocaine hydrochloride was donated by Nortec Química Desenvolvidores Tecnológicos S.A. (Duque de Caxias, RJ, Brazil). JMF2-1.HCl was synthesized from 2-trifluoromethyl-aniline in the Department of Organic Synthesis of Farmanguinhos (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil). Albuterol sulfate was donated by GlaxoSmithkline (Rio de Janeiro, Brazil). Lidocaine, JMF2-1, and albuterol were dissolved in saline solution immediately before use.

Statistical analysis

Statistical analysis involving 2 groups was done with the Student *t* test, whereas ANOVA and the Newman-Keuls-Student test were used to compare more than 2 groups. *P* values of .05 or less (2-tailed test) were considered significant.

RESULTS**Duration of anesthesia after intradermal application of lidocaine and JMF2-1 in rats**

The nocifensive reaction was evaluated in naive rats by means of the withdrawal reflex to pinching on cutaneous sites previously injected with increasing doses of lidocaine

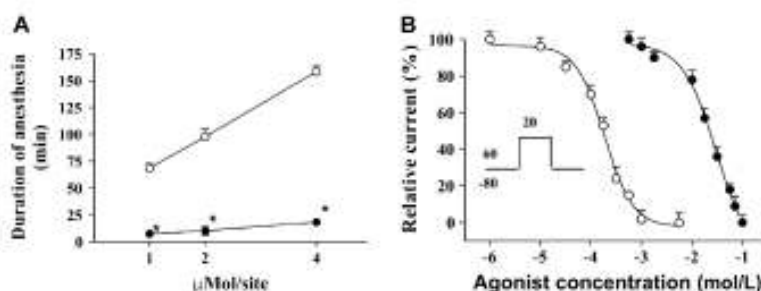


FIG 1. Local anesthesia activity and whole-cell recording of Na⁺ channel currents. **A**, Duration to full recovery of sensory block (mean ± SD, n = 6) after intradermal injection of increasing doses of lidocaine (open circles) and JMF2-1 (solid circles) in rats. *P < .05 compared with lidocaine-treated group. **B**, Tonic block of Na⁺ currents in GH₃ cells by lidocaine (open circles) and JMF2-1 (solid circles). Data are reported as the means ± SD (n = 6 for all groups, with at least 3 independent experiments).

or JMF2-1 (1–4 μmol per site). As shown in Fig 1, A, our findings indicated that the duration of complete blockade for the nociceptive response was clearly longer with lidocaine in doses ranging from 1 to 4 μmol per site.

Blockade of Na⁺ channels with lidocaine and JMF2-1

Because JMF2-1 presented reduced local anesthetic activity compared with lidocaine, we wanted to compare the effectiveness of these molecules on Na⁺ current blockade by means of patch-clamp recording of GH₃ cells. Voltage-gated Na⁺ currents were recorded from these cells in the presence or absence of either lidocaine or JMF2-1. In control experiments (n = 6) GH₃ cells were depolarized from a holding potential –80 mV to +60 mV step pulse (2-second duration), leading to inward Na⁺ currents (data not shown). In addition, bath application of increasing tetrodotoxin concentrations inhibited Na⁺ channel currents with a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 304 nmol/L (curve concentration-response not shown), confirming the presence of tetrodotoxin-sensitive voltage-gated Na⁺ channels in GH₃ cells. Marked blockade of Na⁺ currents was also noted after treatment with increasing concentrations of lidocaine (IC₅₀, 0.18 mmol/L), as expected (Fig 1, B). Remarkably, treatment with JMF2-1 (Fig 1, B) inhibited Na⁺ currents in GH₃ cells, but the concentrations required were significantly higher. In fact, the IC₅₀ of JMF2-1 (25.4 mmol/L) was found to be 169 times higher than that noted in the case of lidocaine.

Effect of lidocaine and JMF2-1 on allergen-evoked histamine release

Using a model of anaphylactic histamine release from rat subcutaneous tissue fragments *in vitro*, we compared the putative mast cell-stabilizing properties of lidocaine and JMF2-1. As shown in Fig 2, lidocaine inhibited the allergen-evoked histamine release, and so did JMF2-1, but the latter was shown to be about 28 times more potent than the former (IC₅₀, 4.5 and 0.16 μmol/L, respectively).

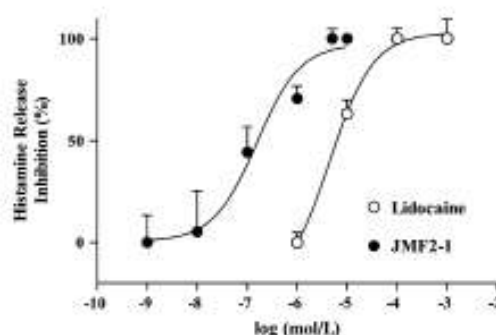


FIG 2. Histamine release inhibition. Blockade of allergen-evoked tissue histamine release caused by treatment with increasing concentrations of either lidocaine (open circles) or JMF2-1 (solid circles). Values are expressed as means ± SD from at least 4 experiments.

Effect of lidocaine and JMF2-1 on the anaphylactic tracheal spasm

In a set of *ex vivo* experiments, we investigated the effect of lidocaine and JMF2-1 on allergen-evoked tracheal spasm. Contractions were induced by ovalbumin (100 μg/mL) in isolated trachea obtained from actively sensitized rats. As shown in Fig 3, lidocaine (Fig 3, A) and JMF2-1 (0.3–3 mM; Fig 3, B) inhibited ovalbumin-evoked contraction in a concentration-dependent manner. Compared with lidocaine, the efficacy of blockade appeared significantly higher in the JMF2-1-treated condition. Pretreatment with albuterol (0.045, 0.136, and 1 mM) also inhibited anaphylactic tracheal spasm in a concentration-dependent manner, as expected (Fig 3, C).

Effect of lidocaine and JMF2-1 on the [Ca²⁺]_i-tension relationship

Because lidocaine directly relaxes airway smooth muscle by decreasing both Ca²⁺ influx and mobilization of stored Ca²⁺,³¹ we further compared the effects of lidocaine and JMF2-1 on tracheal contraction induced by

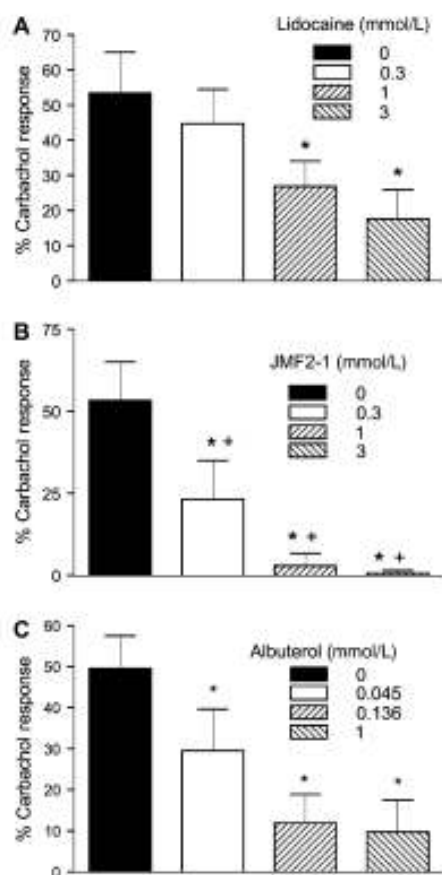


FIG 3. Ex vivo tracheal spasm blockade. Inhibitory effect of lidocaine (A), JMF2-1 (B), and albuterol (C) on the anaphylactic contraction evoked by ovalbumin (100 μ g/mL) in rat trachea. Values are expressed as means \pm SD from at least 6 experiments. * $P < .05$ compared with the untreated group; ** $P < .05$ compared with the lidocaine-treated group.

changes in extracellular Ca^{2+} concentrations during high K^+ depolarization. Fig 4 shows that in response to a stepwise increment in extracellular Ca^{2+} concentration, tracheal contraction increased in a concentration-dependent manner in a mechanism sensitive to JMF2-1 (0.1 and 1 mmol/L; Fig 4, A). Lidocaine also prevented the phenomenon, but the blockade was apparent only at the higher concentration (1 mmol/L; Fig 4, B).

Effects of lidocaine and JMF2-1 on methacholine-evoked airways spasm

In naive rats treated intravenously with either lidocaine or JMF2-1 (1 mg/kg), we found a marked attenuation in the increase in lung resistance induced by 100 μ g/kg methacholine injected intravenously. Values in percentages of increase from baseline after intravenous injection of methacholine measured within 3 minutes of

provocation reduced from 145% \pm 35% in saline-treated animals to 72% \pm 6% and 47% \pm 18% after lidocaine and JMF2-1 ($P < .05$ compared with untreated rats), respectively. In contrast, both treatments failed to alter methacholine-evoked increases in dynamic elastance (see Table E1 in the Online Repository at www.jacionline.org).

Effects of nebulized lidocaine and JMF2-1 on allergen-evoked cell influx into the lung

Actively sensitized rats were aerosolized with 5% ovalbumin for 30 minutes separately or in combination with either lidocaine or JMF2-1 at 5% to study the effect of lidocaine and JMF2-1 on allergen-evoked lung inflammation. Treatment, but not provocation, was repeated once more within 8 hours. The scheme of provocation and treatment was repeated the day after, and the cellular analysis was performed in lung tissue digest samples obtained 48 hours after the first provocation. As shown in Fig 5, compared with sham-challenged control animals, allergen stimulation caused a marked increase in total leukocyte numbers (Fig 5, A), which was accounted for by an increase in the number of mononuclear cells (Fig 5, B), eosinophils (Fig 5, C), and neutrophils (Fig 5, D). All these changes, except augmentation in mononuclear cell counts, were sensitive to treatment with either lidocaine or JMF2-1.

Proconvulsive effect of lidocaine and JMF2-1

In an attempt to assess the neurotoxic profile of JMF2-1 in comparison with that of lidocaine, we evaluated the convulsive effect of these molecules in mice. Increasing doses of each compound were intraperitoneally injected into distinct groups of 10 animals, and the incidence of convulsion was determined. The dose of lidocaine necessary to cause convulsion in 50% of the animals (63 mg/kg) was 4.3-fold lower than the dose of JMF2-1 (273 mg/kg). Moreover, 10 of 10 animals tested had convulsion at a concentration of 80 mg/kg lidocaine. Of note, it was not possible to cause convulsive events in mice with doses equal or lower than 200 mg/kg after JMF2-1 treatment (see Fig E1 in the Online Repository at www.jacionline.org).

DISCUSSION

Local anesthetics, particularly lidocaine, are arousing interest as possible new pharmacologic agents for the treatment of asthma.¹²⁻¹⁵ Nevertheless, topical anesthesia of the airways has been associated with discomfort and side effects. The present study investigated the possibility that nonanesthetic lidocaine derivatives might preserve the anti-inflammatory and spasmolytic activities of the parent compound. We reported here that the lidocaine analogue JMF2-1, which we synthesized and screened for reduced local anesthetic activity, was able to prevent both methacholine-evoked airways spasm in naive rats and allergen-evoked neutrophil and eosinophil infiltration into the lungs of actively sensitized rats. It also inhibited

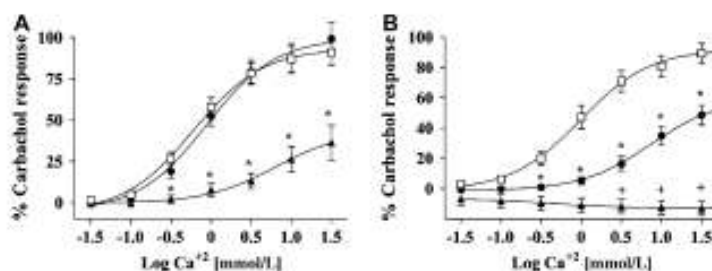


FIG 4. Interference on the Ca^{2+} -sension relationship. Effect of lidocaine (A) and JMF2-1 (B) at concentrations of zero (squares), 0.1 mmol/L (circles), and 1 mmol/L (triangles) on the contraction development induced by changes in extracellular Ca^{2+} during 100 mM K^+ depolarization. Values are expressed as means \pm SEM from at least 4 experiments. * $P < .05$ compared with the untreated group; * $P < .05$ compared with the 0.1 mmol/L JMF2-1-treated group.

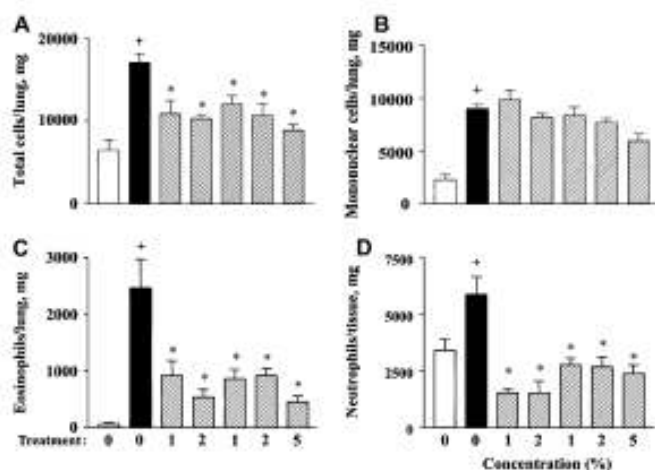


FIG 5. Lung tissue leukocytes. Effect of lidocaine (left-hatched columns) and JMF2-1 (right-hatched columns) on total leukocytes (A), mononuclear cells (B), eosinophils (C), and neutrophils (D) infiltrated in the lung tissue of sensitized and ovalbumin-challenged rats. Values are expressed as means \pm SEM from at least 6 animals. + $P < .05$ compared with the sensitized, saline-challenged group (open columns); * $P < .05$ compared with the ovalbumin-challenged and saline-treated group (closed columns).

histamine release *in vitro*, as well as allergen-evoked tracheal contraction in *ex vivo* settings, and evidence suggests that the spasmolytic effect is at least in part accounted for by blockade of Ca^{2+} influx. These findings support the interpretation that JMF2-1 might have clinical value as a therapeutic alternative for asthma control, with advantages over local anesthetics.

Lidocaine's aromatic tail is a major structural feature that determines the interaction of local anesthetics with voltage-operated Na^+ channels, causing their reversible blockade.³² Our findings revealed that the potency in blocking voltage-operated Na^+ channels in GH_3 cells of JMF2-1, a lidocaine analogue resulting from structural changes in the aromatic tail, was markedly reduced compared with the potency of the parent compound lidocaine. In fact, the IC_{50} value for blockade of Na^+ currents by

JMF2-1 was 169-fold higher than the lidocaine IC_{50} value. In parallel, we found about 90% reduction in the duration of JMF2-1 anesthetic activity, according to the cutaneous pinching test. This difference was not as great as would be predicted from the results concerning Na^+ current blockade by these molecules, which might be accounted for by pharmacokinetic reasons.

It is well established that local anesthetics have pharmacologic properties beyond local anesthesia, most of them resulting from their interaction with other cellular systems than excitable cells.³³ For instance, the function of mast cells and basophils, which are histamine-storing cells deeply implicated in allergic dysfunctions, is markedly sensitive to local anesthetics; both IgE-dependent and IgE-independent histamine release are blocked by lidocaine treatment in a mechanism involving a decrease

in calcium influx.³⁴⁻³⁶ Using a model of allergen-evoked histamine release *in vitro*, we found strong evidence that the anti-inflammatory effect of lidocaine could be dissociated from its ability to block Na⁺ currents and cause local anesthesia. In fact, we found that in spite of being about 2 orders of magnitude less active than lidocaine in terms of blockade of Na⁺ channels, JMF2-1 was 30-fold more potent than the local anesthetic concerning blockade of histamine release, confirming the hypothesis that a non-anesthetic lidocaine analogue might have improved the ability to prevent allergic inflammation exhibited by the parent compound.

Several studies have demonstrated that lidocaine directly relaxes airway smooth muscle^{31,35,37} and can prevent life-threatening bronchospasm in human subjects.^{17,18,20} While trying to compare the effects of lidocaine, JMF2-1, and albuterol on allergen-evoked rat tracheal spasm, we noted that both lidocaine and albuterol did not modify the basal tone but caused a concentration-dependent blockade of tracheal anaphylactic contraction. These findings are in line with prior publications in which the antispasmodic effect of lidocaine was reported.³⁵ JMF2-1 also did not alter tracheal baseline tone and was significantly more effective than lidocaine in inhibiting allergen-evoked tracheal contraction in all concentrations tested, which might be at least in part related to its higher potency in preventing allergen-evoked histamine release.

Recent clinical investigations have shown the efficacy of nebulized lidocaine in the treatment of asthmatic patients.¹²⁻¹⁵ The interest in local anesthetics as alternative agents for the treatment of asthma has been strongly motivated by the findings that eosinophil survival and activation are highly sensitive to lidocaine *in vitro*.⁹⁻¹¹ Although treatment of asthmatic patients has clearly revealed a reduction in the number of blood eosinophils and asthma symptoms in parallel with an increase in FEV₁ measurements, no data are available in the literature concerning the putative influence of lidocaine on lung eosinophil numbers, either in patients or experimental animals. While trying to clarify the effects of local anesthetics in the airways subjected to allergic inflammation, we showed that treatment of actively sensitized rats with aerosols of lidocaine or JMF2-1 equally prevented the lung eosinophilic infiltration triggered by allergen challenge. Remarkably, these treatments also inhibited neutrophil, but not mononuclear cell, accumulation into the lung tissue. Because mononuclear cell counts embrace both macrophages and lymphocytes, further studies are now underway to clarify the sensitivity of each one of these leukocyte subtypes. It is noteworthy that the inhibitory effect of lidocaine on T cells from asthmatic subjects has been reported,⁷ raising the possibility that a blockade of CD4⁺ T-cell proliferation, T_H2 cytokine generation, or both could be underlying the anti-inflammatory action of lidocaine and JMF2-1. The ability of lidocaine to down-regulate eosinophil activation and survival,^{9,11} mast cell degranulation,³⁶ or both might also contribute to this suppressive mechanism.

Throughout the literature, there are conflicting reports concerning the putative benefits of nebulized lidocaine on

bronchoconstriction induced by histamine, hyperosmolar saline, and exercise in asthmatic patients.^{13,14,24,38-40} Our findings revealed that airways constriction induced by intravenous injection of methacholine in rats was markedly attenuated by both lidocaine and JMF2-1. On the contrary, both treatments failed to alter the methacholine-evoked increase in lung dynamic elastance. These results, in combination with those in which lidocaine's capacity to prevent allergen-induced lung recruitment of inflammatory cells is demonstrated, might help to explain the therapeutic benefits devoted to this local anesthetic in studies involving asthmatic patients.^{13,14} On the other hand, our findings are consistent with the interpretation that JMF2-1 does have relevant anti-inflammatory and spasmolytic properties *in vivo* and can therefore relieve breathlessness and exert antiasthma actions without inducing the long-lasting topical anesthesia of lidocaine. Of note, in a comparative analysis involving inhalation of distinct local anesthetics by volunteers with bronchial hyperreactivity, the longest-lasting and most intense anesthesia brought about by dyclonine inhalation was not enough to prevent airways hyperreactivity noted after histamine challenge under conditions in which both lidocaine and ropivacaine significantly attenuated the phenomenon.³⁸ Evidence from the literature indicates that substances acting on Na⁺ channels, such as local anesthetics, including lidocaine, could also block the function of Ca²⁺ channels.³¹ Evidence from our *ex vivo* experiments also gives support to this interpretation, pointing out that JMF2-1 was clearly more potent than lidocaine in inhibiting the extracellularly applied Ca²⁺-induced tracheal tension during high K⁺ depolarization, probably by inhibiting influx of Ca²⁺ into the smooth muscle cells. Altogether, these results reinforce the potential usefulness of this nonanesthetic lidocaine derivative in controlling allergic dysfunctions, leading to the assumption that JMF2-1 might indeed serve as an innovative prototype in drug discovery for asthma syndromes.

Finally, it should be emphasized that the toxicity of local anesthetics, including lidocaine, is closely related to the potency of the local anesthetic because toxicity is largely dependent on the blockade of Na⁺ channels within the central nervous system and cardiovascular system.⁴ In fact, our findings indicated that the proconvulsive potency of lidocaine was significantly higher than that presented by JMF2-1, as expected by the short-lasting and weak anesthesia developed by this analogue, suggesting that JMF2-1 might prove to be safer than lidocaine for patients with asthma. However, because, unlike lidocaine, JMF2-1 is halogenated with a trifluoromethyl substitution at the benzene ring, experiments should be done to better define the safety profile of this substance, mainly concerning hepatic injury.

In conclusion, these observations suggest that the anesthetic action might not be relevant in the anti-inflammatory and spasmolytic activity of local anesthetics and provide support for the belief that the lidocaine derivative JMF2-1, when inhaled, might achieve useful clinical benefit for the treatment of asthma.

We thank Ana Lucia de Aguiar Pires, Luana Pimentel Guimarães Santos, Taliana Paula Teixeira Ferreira, and Ana Carolina dos Santos Arantes for their skilful technical assistance. Priscilla C. Olsen thanks CNPq for her Master scholarship.

REFERENCES

1. Barnes PJ. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:831-44.
2. Busse WW, Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(suppl):S799-804.
3. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 2004;202:175-90.
4. Tetzlaff JE. The pharmacology of local anesthetics. *Anesthesiol Clin North America* 2000;18:217-33.
5. Goldstein IM, Lind S, Hoffstein S, Weisemann G. Influence of local anesthetics upon human polymorphonuclear leukocyte function in vitro. Reduction of lysosomal enzyme release and superoxide anion production. *J Exp Med* 1977;146:483-94.
6. Sinclair R, Eriksson AS, Grotzer C, Casotto J, Thomsen P. Inhibitory effects of amide local anesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB4 release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 1993;37:159-65.
7. Tanaka A, Minoguchi K, Oda N, Yokoe T, Matsuo H, Okada S, et al. Inhibitory effect of lidocaine on T cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:485-90.
8. Suzuki T, Ohishi K, Kida J, Uchida M. Influence of pH on the inhibitory effects of local anesthetics on histamine release induced from rat mast cells by concanavalin A and compound 4880. *Eur J Pharmacol* 1984;98:347-55.
9. Okada S, Hagan JB, Kato M, Bankers-Fulbright JL, Hunt LW, Gleich GJ, et al. Lidocaine and its analogues inhibit IL-5-mediated survival and activation of human eosinophils. *J Immunol* 1998;160:4010-7.
10. Bankers-Fulbright JL, Kephart GM, Loegering DA, Bradford AL, Okada S, Kim H, et al. Sulfonylureas inhibit cytokine-induced eosinophil survival and activation. *J Immunol* 1998;160:5546-53.
11. Ohnishi T, Kim H, Mayeno AN, Okada S, Sur S, Broide DH, et al. Lidocaine in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) is an inhibitor of eosinophil-active cytokines. *Clin Exp Immunol* 1996;104:325-31.
12. Deco ML, Nezo TA, Hunt LW, O'Connell EJ, Younger JW, Sachs MI. Nebulized lidocaine in the treatment of severe asthma in children: a pilot study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82:29-32.
13. Hunt LW, Fejes E, Butterfield JH, Kim H, Blomgren J, Dumette SL, et al. Treatment of asthma with nebulized lidocaine: a randomized, placebo-controlled study. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:853-9.
14. Hunt LW, Swedlund HA, Gleich GJ. Effect of nebulized lidocaine on severe glucocorticoid-dependent asthma. *Mayo Clin Proc* 1986;71:361-8.
15. Rosario NA, Riedl CA, Farias L. Lidocaine nebulization for treatment of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:245-6.
16. Caplan RA, Posner KL, Ward RL, Cheney FW. Adverse respiratory events in anesthesia: a closed claims analysis. *Anesthesiology* 1990;72:828-33.
17. Groeben H, Silvanius MT, Beste M, Peters J. Both intravenous and inhaled lidocaine attenuate reflex bronchoconstriction but at different plasma concentrations. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:530-5.
18. Makker HK, Holgate ST. The contribution of neurogenic reflexes to hypertonic saline-induced bronchoconstriction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:82-8.
19. Groeben H, Grosswendt T, Silvanius M, Beste M, Peters J. Lidocaine inhalation for local anesthesia and attenuation of bronchial hyperactivity with least airway irritation. Effect of three different dose regimens. *Eur J Anaesthesiol* 2000;17:672-0.
20. Luehning RW, Wallemath CL, Bergman NA. Lidocaine and increased respiratory resistance produced by ultrasonic aerosols. *Anesthesiology* 1976;44:306-10.
21. Buiat Y, Hirschman CA, Brown RH. Prevention of lidocaine aerosol-induced bronchoconstriction with intravenous lidocaine. *Anesthesiology* 1996;85:853-9.
22. Fish JE, Peterman VI. Effects of inhaled lidocaine on airway function in asthmatic subjects. *Respiration* 1979;37:201-7.
23. McAlpine LG, Thomson NC. Lidocaine-induced bronchoconstriction in asthmatic patients. Relation to histamine airway responsiveness and effect of preservative. *Chest* 1989;90:1012-5.
24. Weiss EB, Potwardhan AV. The response to lidocaine in bronchial asthma. *Chest* 1977;72:429-38.
25. Miller WC, Awe R. Effect of nebulized lidocaine on reactive airways. *Am Rev Respir Dis* 1975;111:739-41.
26. Tokagi H, Inokai T, Nakama M. A modification of Haffner's method for testing analgesics. *Jpn J Pharmacol* 1966;16:287-94.
27. Neher E, Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am* 1992;266:44-51.
28. de Oliveira Barreto E, de Fritas Carvalho V, Diaz BL, Boldrino A, Cordeiro RS, Martins MA, et al. Adoptive transfer of mast cells abolishes the inflammatory refractoriness to allergen in diabetic rats. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131:212-20.
29. Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH Jr. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1959;127:182-6.
30. Fanao T, Oda Y, Tanaka K, Asada A. The P-glycoprotein inhibitor quinidine decreases the threshold for bupivacaine-induced, but not lidocaine-induced, convulsions in rats. *Can J Anaesth* 2003;50:805-11.
31. Kae T, Nishimura J, Kobayashi S, Takahashi S, Yoshizaki J, Kamaide H. Effects of lidocaine on intracellular Ca²⁺ and tension in airway smooth muscle. *Anesthesiology* 1993;78:954-65.
32. Zamponi GW, French RJ. Dissociating lidocaine action: diethylamide and phenol mimic separate modes of lidocaine block of sodium channels from heart and skeletal muscle. *Biophys J* 1993;65:2335-47.
33. Hollmann MW, Durioux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology* 2000;93:858-75.
34. Johnson HG, Miller MD. Inhibition of histamine release and ionophore-induced calcium flux in rat mast cells by lidocaine and chlorpromazine. *Agents Actions* 1979;9:239-43.
35. Weiss EB, Hargraves WA, Viswanath SG. The inhibitory action of lidocaine in anaphylaxis. *Am Rev Respir Dis* 1978;117:859-69.
36. Yanagi H, Ozawa R, Kobayashi M, Sankawa H, Saito H. Effect of dibucaine and lidocaine on histamine release from mouse bone marrow-derived cultured mast cells. *Masui* 1997;46:16-22.
37. Weiss EB, Anderson WH, O'Brien KP. The effect of local anesthetic, lidocaine, on guinea pig trachealis muscle in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1975;112:393-400.
38. Groeben H, Grosswendt T, Silvanius MT, Pavlakovic G, Peters J. Airway anesthesia alone does not explain attenuation of histamine-induced bronchospasm by local anesthetics: a comparison of lidocaine, ropivacaine, and dyclonine. *Anesthesiology* 2001;94:423-8.
39. Groeben H, Schlicht M, Stieglitz S, Pavlakovic G, Peters J. Both local anesthetics and salbutamol pretreatment affect reflex bronchoconstriction in volunteers with asthma undergoing awake fiberoptic intubation. *Anesthesiology* 2002;97:1445-50.
40. Harrison TW, Tattersfield AE. Effect of single doses of inhaled lignocaine on FEV1 and bronchial reactivity in asthma. *Respir Med* 1988;92:1359-63.

METHODS

Isolated tracheal preparation and measurement of tension

Immunized rats were killed in a CO₂ atmosphere, their tracheas were quickly excised, and 4 tracheal ring segments (4-5 mm in length) were obtained from each animal. Each ring segment was mounted in an organ bath filled with 10 mL of Krebs solution of the following composition: NaCl, 118 mmol/L; KCl, 4.8 mmol/L; CaCl₂, 2.5 mmol/L; MgSO₄, 1.2 mmol/L; KH₂PO₄, 1.2 mmol/L; NaHCO₃, 24 mmol/L; and glucose, 11 mmol/L. The solution was maintained at 37°C and aerated with 95% O₂ plus 5% CO₂. An initial tension of 1 g was applied to achieve a steady spontaneous tone level.

Contractions were measured isometrically with a force-displacement transducer (Ugo Basile, Italy). Changes in isometric forces were analyzed and recorded by an Isolated Organs Data Acquisition program (Proto5; Leticia Scientific Instruments, Spain). Tissues were allowed to stabilize for 60 minutes, with the bathing solution exchanged at 10-minute intervals. At the end of the equilibration period, the response to carbachol (2.5×10^{-6} mol/L) was recorded. After washout of carbachol and re-establishment of stable baseline tone, tissues were exposed to ovalbumin (100 µg/mL) in the presence or absence of lidocaine or JMF2-1 (0.3-3 mmol/L) or albuterol sulfate (0.045-1 mmol/L). The preparations were preincubated with the tested compounds 20 minutes before ovalbumin addition. All responses were expressed as the percentage of response to 2.5×10^{-6} mol/L carbachol.

Protocol for measurement of tension development after increasing Ca²⁺ extracellular concentration during high K⁺ depolarization

The responses to carbachol (2.5×10^{-6} mol/L) of tracheal ring segments from naive rats were recorded. After washout of carbachol and re-establishment of stable baseline tone, tissues were exposed to successive cycles of 100 mmol/L KCl stimulations/washouts in Ca²⁺-free Krebs solution containing 2 mmol/L ethyleneglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid until complete desensitization to the 100 mmol/L KCl-evoked contractile response. Next, tracheal rings were immersed in Ca²⁺-free Krebs solution containing 100 mmol/L KCl, and the extracellular Ca²⁺ concentration was stepwise increased by the cumulative addition of CaCl₂ (0.03-30 mmol/L) in the presence or absence of either lidocaine or JMF2-1 (0.1 and 1 mmol/L). All responses were expressed as the percentage of response to 2.5×10^{-6} mol/L carbachol.

Assessment of *in vivo* respiratory mechanics

Naive rats were sedated (diazepam, 5 mg administered intraperitoneally), anesthetized (thiopental sodium, 20 mg/kg administered intraperitoneally), and tracheotomized. A snugly fitting cannula (1.7 mm internal diameter [ID]) was introduced into the trachea. A catheter was placed in the right jugular vein. A pneumotachograph (1.5 mm ID; length, 4.2 cm; distance between side ports, 2.1 cm) was connected to the tracheal cannula for the measurement of V'.^{E1} The pressure gradient across the pneumotachograph was determined by using a differential pressure transducer (SCIREQ, SC-24, Montreal, Quebec, Canada). Tidal volume (V_T) was obtained by integration of the V' signal. The flow resistance of the equipment (Req), the tracheal cannula included, was constant up to flow rates of 26 mL/s and amounted to 0.08 cm H₂O/mL/s. Equipment resistive pressure (Req/V') was subtracted from pulmonary resistance so that the results represent intrinsic values. Tracheal pressure (Ptr) was measured with a differential pressure transducer SCIREQ (SC-24). Changes in esophageal pressures (Pes), which reflect chest wall pressure, were

measured with a 30-cm-long water-filled catheter (PE205) with side holes at the tip connected to a differential pressure transducer (SC-24). The catheter was passed into the stomach and then slowly returned into the esophagus; its proper positioning was assessed with the "occlusion test."^{E2} This consisted of comparing ΔPes and ΔPtr during spontaneous inspiratory efforts subsequent to airway occlusion at end expiration. In all instances ΔPes was close to ΔPtr, the difference not exceeding 3%. Transpulmonary pressure was calculated by subtracting chest wall pressure from Ptr. The frequency responses of Ptr and Pes measurement systems were flat up to 20 Hz, without appreciable phase shift between the signals. All signals were filtered (100 Hz) and amplified in a 4-channel conditioner (SC-24, SCIREQ). Flow and pressure signals were then sampled at 200 Hz with a 12-bit analog-to-digital converter (DT2801A; Data Translation, Marlboro, Mass) and stored on a microcomputer. All data were collected with LABDAT software (RHT-InfoData, Inc, Montreal, Quebec, Canada).

During spontaneous breathing, lung resistance (RL) and dynamic elastance (Edyn) were obtained by using the equation of motion, as follows: $Transpulmonary\ pressure(t) = Edyn \cdot V(t) + RL \cdot V'(t)$, where t is time.^{E3} ANADAT software (RHT-Infodat) was used for this purpose. Respiratory mechanical data were measured before and for 3 minutes after administration of an intrajugular bolus of methacholine (100 µg/kg) dissolved in a final volume of 100 µL. In animals treated with lidocaine or JMF2-1, the mechanical parameters were measured for 2 minutes after intravenous administration. Then methacholine was intravenously injected, and the mechanical data were obtained during the next 3 minutes.

Sensitization, challenge, and leukocyte enumeration protocols

Rats were immunized on day 0 and boosted on day 14 with a subcutaneous injection (0.2 mL) of a mixture containing ovalbumin (50 µg) and aluminum hydroxide (5 mg) in 0.9% NaCl solution (saline), as previously reported.^{E4} On days 21 and 22, animals were placed in a Plexiglas chamber (45 × 28 × 29 cm) and challenged by means of exposure for 30 minutes to an aerosol of ovalbumin generated from a 50 mg/mL solution by use of an air-driven nebulizer (model NS I-210/12; Indústria de Aparelhos Biomédicos, São Paulo, Brazil) at a flow rate of 10 L/min. In sham-challenged rats' aerosol of ovalbumin was replaced by its vehicle (0.9% NaCl, saline). Thirty-minute treatments with either lidocaine (2% and 5%) or JMF2-1 (1%, 2%, and 5%) dissolved in saline (pH of lidocaine and JMF2-1 solutions was around 5.0) were performed twice a day for 2 consecutive days. The first daily treatment occurred throughout ovalbumin exposure (coadministration with allergen), and the second occurred 8 hours later. Forty-eight hours after the first allergen challenge, rats were killed (sodium pentobarbital, 200 mg/kg administered intraperitoneally), and the lungs were removed, cleaned, and finely chopped after blood had been perfused out. The chopped tissue was then enzymatically digested to obtain lung leukocytes, as previously reported.^{E5} Total leukocyte counts were performed in Neubauer chambers by means of light microscopy after dilution of the cell lung samples in Türk (acetic acid, 0.2%) solution. Eosinophils, neutrophils, and mononuclear cells were counted by means of standard morphologic criteria from cytocentrifuge preparations stained with May-Grünwald-Giemsa stain.

REFERENCES

- E1. Mortola JP, Noworaj A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol* 1983;55:250-3.
- E2. Baydur A, Behrakis PK, Zin WA, Jaeger M, Milic-Emili J. A simple method for assessing the validity of the esophageal balloon technique. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:788-91.

- E3. Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanco MR, Amirano D, Lapa ESJR, et al. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171: 829-37.
- E4. Bandeira-Melo C, Bonavita AG, Diaz BL, PM ES, Carvalho VF, Jose PJ, et al. A novel effect for annexin 1-derived peptide ac2-26: reduction of allergic inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313: 1416-22.
- E5. Underwood SL, Raeburn D, Lawrence C, Foster M, Webber S, Karlsson JA. RPR 106541, a novel, airways-selective glucocorticoid: effects against antigen-induced CD4+ T lymphocyte accumulation and cytokine gene expression in the Brown Norway rat lung. *Br J Pharmacol* 1997;122:439-46.

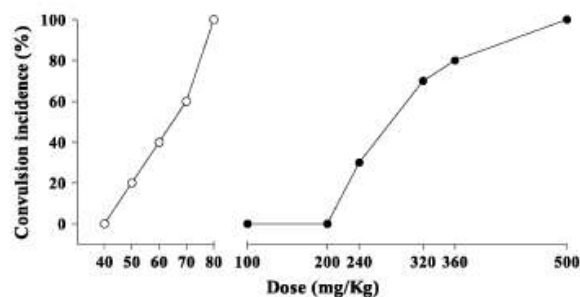


FIG E1. Central toxicity. Preconvulsive effect of increasing doses of lidocaine (*open circles*) and JMF2-1 (*solid circles*) administered to mice through the intraperitoneal route. Values are expressed as the incidence of convulsion (percentage) in groups of 10 animals.

TABLE E1. Respiratory mechanical parameters

	RL (cm H ₂ O · mL ⁻¹ · s)	Edyn (cm H ₂ O · mL ⁻¹)
Control	0.27 ± 0.03	5.79 ± 0.47
Saline	0.24 ± 0.04	5.69 ± 0.46
Methacholine (%)	144.93 ± 38.31*	44.13 ± 11.22*
Lidocaine (%)	12.27 ± 2.07	24.09 ± 6.13
Methacholine after lidocaine (%)	71.53 ± 6.01†	55.76 ± 15.50
JMF2-1 (%)	26.07 ± 9.45	14.22 ± 1.87
Methacholine after JMF2-1 (%)	47.06 ± 17.76†	35.54 ± 11.17

Values are presented as means ± SEM of 2 to 10 animals in each group (6 determinations in each animal). Measurements were made in baseline conditions (control), after intravenous injection of saline (0.1 mL), and after intravenous injection of methacholine (100 µg/kg). Animals were also treated with lidocaine or JMF2-1 instead of saline. Percentage of increase in lung resistance and dynamic elastance from baseline after intravenous injection of methacholine (100 µg/kg) is shown. Changes in lung resistance and dynamic elastance were calculated from the ratio between baseline and maximum effects below or above within 3 minutes.

RL, Lung resistance; Edyn, dynamic elastance.

*P < .05 compared with the saline group.

†P < .05 compared with the methacholine group.

**IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF THE LIDOCAINE DERIVATIVE
JMF2-1 IN A MURINE MODEL OF ASTHMA**

**Priscilla Christina Olsen¹, Magda Fraguas Serra¹, Jorge Carlos Santos da Costa^{1,2},
Bruna PF Fonseca³, João Paulo B Viola³, Renato Sérgio Balão Cordeiro¹, Patrícia
Machado Rodrigues e Silva¹, Marco Aurélio Martins¹**

¹Department of Physiology and Pharmacodynamics, IOC and ²Farmanguinhos,
Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, ³Division of Cellular Biology, INCA, Rio de Janeiro,
RJ, Brazil.

**Correspondence: Dr. M. A. Martins, Department of Physiology and Pharmacodynamics,
Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Caixa Postal 926, Rio de
Janeiro, Brazil.**

E-mail: mmartins@ioc.fiocruz.br

Fax number: +55 21 25984395

Tel. Number: +55 21 25587382

**This study was sponsored by FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à
Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Grant number E-26/152.478/2002), CNPq –
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant number
501234/2003-9) and PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos
para Saúde, FIOCRUZ, Brazil.**

Abstract

Background: Our previous study showed that nebulized JMF2-1 might be a way of achieving the anti-asthmatic effects of lidocaine without the anesthetic effect.

Objective: Since the mode of action of JMF2-1 is still unclear, we examined here its putative immunoregulatory effect in comparison to lidocaine and dexamethasone.

Methods: Ovalbumin-sensitized BALB/c mice were nebulized with ovalbumin and treated with nebulized lidocaine or JMF2-1, or systemic dexamethasone, from day 19 to 21 post-sensitization. Analyzes of JMF2-1, lidocaine or dexamethasone effects on inflammation and hyperresponsiveness were performed 24 h after the last challenge. Lymphocytes from lymph nodes of DO11.10 mice were exposed to OVA in the presence of dexamethasone, lidocaine, or JMF2-1. T cell proliferation and survival were assessed by measuring increases in tritiated thymidine uptake and PI staining respectively, whereas cytokine secretion was measured by commercial ELISA.

Results: We found that both lidocaine and JMF2-1 inhalation inhibited blood and lung eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness. JMF2-1 inhibited both *in vivo* and *ex vivo* production of Th2 cytokine. Ovalbumin-evoked proliferation of lymph node cells, from DO11.10 TCR transgenic mice, were inhibited by both JMF2-1 and lidocaine applied *in vitro*. Moreover, JMF2-1 and lidocaine seemed to induce apoptosis of these lymphocytes *in vitro*.

Conclusion: These results show that inhalation of JMF2-1 prevents cardinal features of asthma, probably by reducing T_h2 cytokine generation via inhibition of T cell function and survival. JMF2-1 should be considered as a new prototype in drug discovery for asthma with advantages over local anesthetics.

Keywords:

Asthma, local anesthetics, JMF2-1, mouse model

Abbreviations used:

ANOVA: Analysis of variance

Penh: Enhanced pause

FEV₁: Forced expiratory volume in one second

Introduction

Asthma is characterized by a specific pattern of inflammation in the airways including the infiltration of eosinophils, increased numbers of T_H2 cells and activated mast cells (Tattersfield *et al.*, 2002). The principal symptoms of asthma are airways obstruction and reversible bronchial hyperresponsiveness to non-specific irritants. Since it is a complex disease that involves not only inflammation but also neurogenic dysfunctions, treatments that target a single cell or mediator are unlikely to be effective (Fernandes and Goldie, 2003). Conventional therapeutic strategies consist on bronchodilators, such as β 2-agonists in combination with anti-inflammatory agents, most commonly glucocorticoids. Although asthma is often well controlled with inhaled corticosteroids, some patients with severe asthma require additional oral corticosteroids and the long-term use of those often leads to side effects (Barnes, 2004, Kamada *et al.*, 1996). Corticosteroid insensitivity is also of great concern when it comes to controlling asthma symptoms (Leung *et al.*, 1995). Therefore, steroid-sparing therapeutic alternatives are necessary.

Lidocaine is a local anesthetic (LA) known for its ability to block voltage-gated Na⁺ currents causing reversible inhibition of impulse transmission and blockade of neuronal function (Chernoff and Strichartz, 1990). Other than its known effects on excitable cells, lidocaine was also proved to act in non-excitabile cells such as eosinophils and mast cells inhibiting their function (Ohnishi *et al.*, 1996, Okada *et al.*, 1998, Yanagi *et al.*, 1996). Therefore lidocaine's immunoregulatory features became very promising in the treatment of asthma. Several studies of patients with severe asthma showed that nebulized lidocaine is an effective steroid-sparing treatment, since this treatment allows a reduction of the use of glucocorticoids. Nebulized lidocaine treatment induced an increase in pulmonary function (FEV₁), and reduced blood eosinophil counts (Hunt *et al.*, 1996, Decco *et al.*, 1999, Rosario *et al.*, 2000, Hunt *et al.*, 2004). Side effects observed in these patients were mostly transient oropharyngeal anesthesia and bitter taste. Although lidocaine appear to be useful in the treatment of asthma it should be emphasized that some studies have demonstrated increased bronchoconstriction in the short period following lidocaine nebulization (Miller and Awe, 1975, Weiss and Patwardhan, 1977, Fish and Peterman, 1979, Bulut *et al.*, 1996, McAlpine and Thomson, 1989).

Our recent data reported that JMF2-1, a lidocaine analog synthesized for reduced local anesthetic activity was able to inhibit infiltrate cells in the lungs of immunized and challenged rats (da Costa *et al.*, 2007). The analog JMF2-1 was more effective in attenuating airways spasm, than lidocaine (da Costa *et al.*, 2007). Altogether, lidocaine's analog, JMF2-1, seemed to have improved antiasthmatic activity, comparing to lidocaine, without showing the

anesthetic effects. In this study we have sought to investigate whether the treatment with JMF2-1 and lidocaine could prevent inflammation in an asthma mouse model and search the mechanisms of action that could explain their antiasthmatic effects.

Methods

Animals

BALB/c mice (20-30 g) were obtained from the Oswaldo Cruz Foundation breeding, and kept in the animal-housing facilities of the Department of Physiology and Pharmacodynamics with controlled room temperature (22-25 °C) and a 12-h (6:00 AM-6 PM) light dark cycle. All the procedures involving care and use of laboratory animals in this study were examined and approved by the Animal Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA-FIOCRUZ, Prot 00085-02).

DO11.10 TCR Tg mice were kindly donated by João P. Viola (Division of Cellular Biology, Nacional Institute of Cancer, Rio de Janeiro, Brazil).

Sensitization, challenge and treatment protocol

BALB/c mice were immunized on day 0 by a dorsal subcutaneous (s.c.) injection (0,2 ml) of a mixture containing ovalbumin (50 µg) and aluminum hydroxide (5 mg) in 0.9 % NaCl solution (saline). On day 14, animals were boosted intraperitoneously with the same solution described above. On days 19, 20 and 21 post sensitization mice were placed in a plexiglas chamber (45 x 28 x 29 cm) and challenged by exposure for 30 min to an aerosol of ovalbumin, generated from a 20 mg/ml solution, by use of an air-driven nebulizer (model NS I -210/12, Indústria de Aparelhos Biomédicos, São Paulo, Brazil) at a flow rate of 10 liters/min. In sham-challenged mice aerosol of ovalbumin was replaced by its vehicle (0.9 % NaCl, saline). Treatments were performed by exposure for 30 min to an aerosol of either lidocaine or JMF2-1 (5, 10 or 20 mg/ml) at 0 h and 8 h after each challenge. Dexamethasone (1 mg/ml) was administered intraperitoneously one hour before each challenge.

Airway obstruction measurements in nonrestrained, conscious mice

Using barometric whole-body pletysmography (Buxco Research System, Wilmington, NC, USA) and increases in enhanced pause (Penh) as a parameter of airway obstruction (Hamelmann e cols., 1997), we measured responses to inhaled methacholine in conscious, unrestrained naïve mice that had been subjected to sensitization, challenge and treatments either with dexamethasone, lidocaine or JMF2-1 for three days. Mice were provoked with increasing concentrations of methacholine (6, 12 and 25 mg/ml) for 2.5 min, with 5 min of evaluation.

Inflammatory cells in the lung

BALB/c immunized mice were euthanized (sodium pentobarbital, 500 mg/kg, i.p.) 24 hours after the last antigen challenge. The lung was perfused with 20 ml of saline through the heart and the right lung was extracted, weighted, cut and digested with 1 ml of 0,2% collagenase diluted in RPMI. The digested lung was incubated twice for 20 minutes at 37 °C. The homogenate was centrifuged (1500 rpm, 5 min) and the cell pellet was resuspended in RPMI with 10% SBF. Tissue was homogenized and pushed through a cell strainer to restrain parts not digested. Total leukocyte count was performed in Neubauer chambers by means of light microscope after dilution in Türk (acetic acid 0.2%) solution and expressed per mg of lung tissue. Eosinophils, neutrophils and mononuclear cells were counted by means of standard morphological criteria from cytocentrifuge preparations stained with May-Grünwald-Giemsa stain.

Cell recovery from airway lumen

BALB/c immunized mice were euthanized as described above and the trachea was immediately cannulated. Cell influx into the airway lumen was quantified by counting cells recovered from bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. BAL was performed by flushing the airways with 1 ml of phosphate buffered saline plus 10 mM EDTA (EDTA-PBS). The fluid was retrieved by gentle aspiration. The BAL was centrifuged (1500 rpm, 10 min) and the cell pellet was resuspended in EDTA-PBS. Total leukocyte, eosinophils, neutrophils and mononuclear cells were counted as described above.

T cells obtained from the BAL were stained with CD3 FITC, CD4 PE and CD8 Cy staining (Pharmingen) and analyzed with a FACScan flow cytometer (FacsCalibur).

Blood cell count

Blood from mice tail was obtained immediately before euthanize. Total leukocyte, eosinophils, neutrophils and mononuclear cells were counted as described above.

Detection of cytokines from lung explants

Lungs of BALB/c mice were removed 24 hours after the last challenge plus treatment, and flushed through the heart with 20 ml of saline. The right lung was chopped into 16 small pieces and 4 pieces were placed per well in a 24-well plate, which was cultured for 24 hours at 37 °C and 5% CO₂ in DMEM (Sigma) medium without serum containing 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (Sigma). The spontaneous production of cytokines was evaluated by adding only sterile PBS 1x. OVA was added *in vitro* to induce specific

cytokine production. Supernatants from lung explants with medium alone or stimulated with 10 µg/ml of OVA (Sigma) were collected and stored at -20 °C until used. Cytokine production was analyzed by ELISA. IL-13, IL-4, IL-5 and IFN-γ were quantified using enzyme-linked immunosorbent assays with reagents from Biosource for IL-13 and IL-4 and from Duoset for IL-5 and IFN-γ, following indications of each manufacturer. Results were expressed per mg of lung tissue (dry weight) (Proust e cols., 2003, Lagranderie e cols., 2003).

***In vitro* proliferation assay and cytokine/chemokine production**

For the proliferation assay, cells obtained from cervical, inguinal and axillary lymph nodes of DO11.10 TCR Tg male mice ($1 \cdot 10^5$ cells/well) were cultured with 0,5 mg/ml ovalbumin (OVA) antigen for 72 hours. Treatment with dexamethasone (100 µM), lidocaine (100, 300 or 600 µM) or JMF2-1 (100, 300 or 600 µM) was performed simultaneously with OVA challenge. Subsequently cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂. After incubation cells were pulsed with 1 µCi of tritiated methylthymidine (Amersham Corp, Arlington Heights, Ill) for the last 8 hours of the culture period. Proliferation was analyzed by incorporation of tritiated thymidine in new DNA strands of daughter cells.

For *in vitro* cytokine production, $1 \cdot 10^6$ cells obtained from lymph nodes of DO11.10 TCR Tg male mice were stimulated with OVA and treated with either dexamethasone, lidocaine or JMF2-1 as described above. 72 hours after the stimulus, the supernatants of the cultures were collected and frozen at -80 °C for further cytokine quantification. IL-13, IL-4, IL-5 and IFN-γ were quantified using enzyme-linked immunosorbent assays with reagents from Biosource for IL-13 and IL-4 and from Duoset for IL-5 and IFN-γ, following indications of each manufacturer.

Flow-cytometric analysis of apoptosis

To analyze apoptosis, cells obtained from cervical, inguinal and axillaries lymph nodes of Do11.10 TCR Tg male mice ($1 \cdot 10^6$ cells), stimulated with OVA were cultured in the absence or presence of dexamethasone, lidocaine, or JMF2-1 in the medium for 72 hours. Cells were permeabilized and stained with propidium iodide (PI) (Sigma). The samples were analyzed with a FACScan flow cytometer (FacsCalibur).

Chemicals

Lidocaine hydrochloride was donated by Nortec Química Desenvolvidimentos Tecnológicos S.A. (Duque de Caxias, RJ, Brazil). JMF2-1.HCl was synthesized in the

Department of Organic Synthesis of Far-Manguinhos (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) from 2-trifluormethyl-aniline. Lidocaine and JMF2-1 were dissolved in saline solution immediately before use.

Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM. Statistical analysis involving two groups was done with Newman-Keuls-Student test, whereas analysis of variance (ANOVA). *P* values of 0.05 or less (two-tailed test) were considered significant.

Results

JMF2-1, dexamethasone and lidocaine inhibit airway hyperresponsiveness

Antigen challenge with ovalbumin (OVA) significantly increased airway hyperresponsiveness to inhaled methacholine (6, 12 and 25 mg/ml) compared with saline control mice. Hyperreactivity was detected in response to 6, 12 and 25 mg/ml of inhaled methacholine (Figure 1). The treatments with JMF2-1, lidocaine or dexamethasone do not alter the basal values of Penh, which is used in this assay as an index of airway obstruction (Figure 1). However, the treatments attenuated the hyperresponsiveness induced by all concentrations of methacholine (Figure 1).

Nebulized JMF2-1 inhibits eosinophilia and the influx of eosinophils in the lungs

Eosinophils and lymphocytes are key effector cells in the pathogenesis of asthma, therefore we sought to investigate the effect of JMF2-1 on inflammatory cells in the lung of OVA challenged mice. Antigen challenge caused a significant increase in eosinophils found in lung tissue and on the bronchoalveolar lavage (BAL) (Figure 2 and 3 A), and an increase in CD4 and CD8 T cells present on the BAL (Figure 4). JMF2-1 inhibited both eosinophils and T lymphocytes accumulation in the lungs of antigenically challenged mice (Figure 2, 3 and 4).

Interference of JMF2-1 with cytokine production by lung explants

CD4 T cells interact actively on the asthmatic response and its main role is the production of inflammatory mediators such as IL-4, IL-5 and IL-13, T_H2 cytokines. The increase in Th2 cytokines was described on isolated cells (Webb et al., 2000) and on the BAL (Tomkinson et al., 2001) of asthmatics, after an antigenic stimulus. One way to analyze the production of cytokines by lung cells of challenged mice is through the usage of mice lung explants in culture (Proust et al., 2003).

We observed that OVA challenged mice spontaneously produced more IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ *in vitro*, than saline challenged mice (Figure 5 A, C, E and G respectively). The treatments with JMF2-1, lidocaine or dexamethasone inhibited the spontaneous production of IL-4, IL-5 and IL-13 (Figure 5 A, C and E respectively). After the *in vitro* antigenic challenge, the release of cytokines was increased, especially in OVA *in vivo* challenged mice (Figure 5 B, D, F and H). Only the production of IL-4 was inhibited by all the treatments after the *in vitro* antigenic challenge (Figure 5 B), the release of IL-5 and IL-13 was inhibited by *in vivo* dexamethasone treatment (Figure 5 D and F).

There was no significant increase of the spontaneous production of IFN- γ cytokine on lung explants from OVA challenged mice, compared to saline challenged ones (Figure 5 G). Treatments with JMF2-1 or dexamethasone provoked a discrete attenuation of IFN- γ spontaneous production (Figure 5 G). After the *in vitro* OVA challenge we could not observe a difference in the production of IFN- γ between mice challenged *in vivo* with saline or OVA. (Figure 5 H).

***In vitro* production of cytokines by lymphocytes**

To characterize the effect of JMF2-1 on T_h2 lymphocytes, lymph node cells from DO11.10 (TCR Tg) mice were utilized in culture. OVA challenge and the treatments with JMF2-1, lidocaine or dexamethasone were done simultaneously and stayed on culture for 72 hours. The stimulus with OVA induced the release of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ cytokines (Figure 6 A, B, C and D). Dexamethasone and JMF2-1 treatments blocked the production of all cytokines evaluated (Figure 6 A, B, C and D). Lidocaine treatment inhibited only the release of IL-13 and IFN- γ (Figure 6 C and D).

Effect of JMF2-1 on the proliferative response of lymphocytes

To elucidate the mechanisms by which JMF2-1 reduces the number of T cells from BAL of OVA challenged mice, we used lymph node cells from DO11.10 (TCR Tg) mice. *In vitro* challenge with OVA induced an increased proliferation, compared to saline challenged cells (Figure 7). Treatments with dexamethasone (100 μ M), lidocaine (600 μ M) or JMF2-1 (300 e 600 μ M) attenuated the proliferation of OVA challenged cells.

JMF2-1 inhibits survival of lymphocytes

A previous study (Tanaka *et al.*, 2002) showed that the *in vitro* treatment with lidocaine inhibits the proliferation of human lymphocytes antigenically challenged, by a mechanism different than apoptosis. Therefore, we evaluated the effect of JMF2-1 on the survival of lymph node cells from DO11.10 (TCR Tg) mice challenged with OVA. The lack of stimulus on sham saline challenged cells induced up to 70,2 % of death. The antigen challenge reduced PI staining to 25,5 % and increased the percentage of viable lymphocytes entering the G2 phase of proliferation. Treatment with JMF2-1 induced 72,2 % of staining, increasing cell death by apoptosis and reducing the percentage of cells entering phase G2 of

proliferation. Dexamethasone treatment induced 86,5 % of apoptosis while lidocaine induced only 34,0 % of cell death.

Discussion

Asthma is defined as a chronic inflammation of the airways caused by ambient factors in genetically predisposed individuals. Airway obstruction and bronchial hyperresponsiveness due to non-specific irritants are the principal symptoms of asthma, a disease that has been increasing in many countries and can be fatal (Barnes, 2004, Busse and Rosenwasser, 2003). Inflammation is the central feature of the pathogenesis of asthma. The specific pattern of inflammation of the airways includes a dense eosinophilic infiltrate, increased numbers of T_H2 cells and activated mast cells (Tattersfield 2002). The allergens activate mast cells and T_H2 cells in the airways, which release pre-formed and neo-synthesized inflammatory mediators, including histamine, lipid mediators and cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13 (Wills-Karp, 2004, Barnes, 2004, Busse and Rosenwasser, 2003).

The conventional therapeutic strategies consist in using a combination of bronchodilators and anti-inflammatory agents, amongst them the most used are β_2 -agonists and glucocorticoids, respectively (Barnes, 2004). Allergic asthma may be well controlled with inhaled glucocorticoids, however there are a number of patients with severe asthma that need oral glucocorticoids. Moreover the prolonged use of oral glucocorticoids may lead to several side effects (Barnes, 2004, Kamada e cols., 1996). Altogether, the search for therapies alternative to glucocorticoids is still necessary.

Lidocaine has arised great interest as a pharmacological agent against asthma, therefore its topical anesthetic effect on the airways may cause discomfort and side effects (Hunt e cols., 1996, Decco e cols., 1999, Rosario e cols., 2000, Hunt e cols., 2004). Our previous results demonstrated that JMF2-1, a lidocaine analog synthesized to have a reduced local anesthetic activity, was more potent than lidocaine in inhibiting tracheal spasm and release of histamine (da Costa e cols., 2007). Besides, JMF2-1 and lidocaine reduced the accumulation of eosinophils in the bronchoalveolar lavage of rats challenged with ovalbumin. Only JMF2-1 treatment inhibited the airway obstruction induced by methacoline. These results indicated that the substitution of the radical 2,6-dimethyl for a 2-trifluoromethyl on the benzenic ring of lidocaine preserved the ability to prevent key aspects of the allergic inflammatory response of the lungs (da Costa e cols., 2007). On this present study, we investigated the immunoregulatory mechanisms of JMF2-1 compound, compared to lidocaine and dexamethasone. In the murine model of asthma, treatment with JMF2-1 led to a reduction of the principal traits of the inflammatory response in asthma. We observed that treatment with nebulized JMF2-1, as well as nebulized lidocaine or systemic dexamethasone, prevented eosinophilic and lymphocyte infiltrate in the lungs of mice challenged with ovalbumin. JMF2-1, lidocaine and dexamethasone also attenuated the hyperreactivity induced by methacoline

and reduced the production of pro-inflammatory cytokines. Besides, we demonstrated that *in vitro* treatment with JMF2-1, lidocaine or dexamethasone, inhibited the function and survival of T cells. These results suggest that the inhibition of inflammatory infiltrate and attenuation of hyperreactivity, provoked by JMF2-1 aerosol, may be related to the reduction of T_h2 cytokines and to the increase in T cell death, by apoptosis.

Inflammation, hyperreactivity and reversible obstruction of the airways are trade marks of asthma and can be related to each other. Hyperreactivity can be defined as an excessive bronchoconstriction of the airways in response to a variety of stimulus. Previous studies have demonstrated conflicting evidences about the actions of lidocaine treatment on the airways of asthmatics, describing an early bronchoconstriction followed by a protector effect of bronchoconstriction (Hunt e cols., 2004, Groeben e cols., 2001, Groeben e cols., 2002). Costa *et al.* (2007) showed that the bronchoconstriction of rats was attenuated by both lidocaine and JMF2-1. Our results revealed that both treatments, as well as dexamethasone, significantly attenuated the hyperreactivity induced by methacoline, in ovalbumin challenged mice. These results agree with the interpretation that JMF2-1 has relevant spasmolytic properties and can relieve breathlessness, exerting antiasthmatic effects.

In asthma, the wall of the airways is infiltrated with eosinophils and mononuclear cells, mostly T CD4 lymphocytes. Mast cells, macrophages and neutrophils seem to be accumulated in the airways of asthmatics. Within the lumen of the airways, the mucus is fulfilled with macrophages, eosinophils, lymphocytes and shedded epithelial cells. Some asthmatic patients, specially the severe cases, have an increased number of neutrophils (Cohn e cols., 2004). These inflammatory cells are responsible for the release of several mediators of inflammation and may account for the positive feedback of the inflammatory response (Cohn e cols., 2004, Tattersfield e cols., 2002). Evidences in the literature show that lidocaine has immunoregulatory effects on mast cells, eosinophils and neutrophils (Ohnishi e cols., 1996, Okada e cols., 1998, Yanagi e cols., 1996, Kanbara e cols., 1993). Our data showed that lidocaine or JMF2-1 aerosol treatment reduced the eosinophilic counts in the lungs of challenged mice. These results, in the murine model, reinforced the anti-inflammatory effects of JMF2-1, observed previously in rats (da Costa e cols., 2007) and also confirm the efficiency of JMF2-1 treatment, compared to lidocaine and dexamethasone.

After the antigenic challenge, the numbers of neutrophils were not raised, when compared to saline, but we observed an increased number of such cells in the lungs of mice treated with systemic dexamethasone. This increased infiltrate agrees with data in the literature that show a increase in survival of neutrophils, induced by glucocorticoids (Cox and Austin, 1997, Strickland e cols., 2001).

As a principal orchestrator of the adaptive immune response, T cells have been implicated in the pathogenesis of asthma. CD4 T cells, especially those that produce T_h2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13) play a crucial role on development of the pathogenesis of this disease (Wills-Karp, 1999, Wills-Karp, 2004). Several studies established that T cells found in the lung of asthmatics express, mostly, T_h2 cytokines. IL-4, IL-5 and IL-13 detected in the lungs of asthmatics are important in the recruitment and activation of effector cells related to the allergic response, such as eosinophils and mast cells. Well succeeded asthma treatments relates to the ability to change the pattern of T_h2 cytokine to T_h1, or the ability to reduce the expression of T_h2 cytokines (Stam e cols., 1993). *In vitro* treatment with lidocaine inhibited the expression and production of T_h2 cytokines by antigenic stimulated human CD4 T cells, without affecting the viability of the cells (Tanaka e cols., 2002). We demonstrated here that the *in vivo* treatment with lidocaine or JMF2-1 in antigenically challenged mice resulted in a reduction of spontaneous production of IL-4, IL-5 and IL-13, analyzed in lung explants of mice. After an *in vitro* antigenic stimulus both treatments inhibited only IL-4 production. The continuous production of IL-5 and IL-13 after the *in vitro* challenge showed that lidocaine and JMF2-1 did not affect the viability of all cells capable of producing these cytokines (Wills-Karp, 2004). These results suggest a selective action of both treatments, since lidocaine and JMF2-1 inhibited the functions of lymphocytes, mast cells (da Costa e cols., 2007) and eosinophils, without influencing structural cells capable of producing cytokines.

Since T_h2 cytokines promote the allergic response in asthma, drugs able to repress their production may downregulate the inflammation (Stam e cols., 1993). The increase in eosinophilic infiltrate in the lungs (Muro e cols., 2000, Shi e cols., 2000), as well as the production of IL-4, IL-5 and IL-13 in the airways are related to the hyperresponsiveness in asthmatics (Kips, 2001, Foster e cols., 1996, Wills-Karp, 2004), therefore the blockade of the T_h2 cytokines and the reduction of lymphocytic and eosinophilic infiltrate may be responsible for the inhibition of hyperresponsiveness observed in the murine model of asthma.

To study the effect of the lidocaine analog on T cells we used cells obtained from lymph nodes of DO11.10 mice antigenically challenged and treated them with JMF2-1. The treatment with JMF2-1 inhibited the production of IL-4, IL-5 and IL-13 which was stimulated by the antigen challenge. These results showed that JMF2-1 has the ability to intervene in the effector function of stimulated T lymphocytes. This inhibitory effect supports the previous *ex vivo* results, besides it reinforces that the continuous production of IL-5 and IL-13 observed before was a response of lung structural cells (Wills-Karp, 2004).

Despite more than 97% of T cells from DO11.10 mice encode a specific TCR for OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Murphy *et al.*, 1990), which differentiate preferentially in a sub-population with a T_h2 pattern, we observed an IFN- γ increased production after the antigenic stimulus. IFN- γ cytokine may be produced by different cells like CD4 T_h1 cells, CD8 T cells, NK cells, macrophages, dendritic cells, naive CD4 T cells and B lymphocytes (Teixeira *et al.*, 2005). IFN- γ detected by ELISA in this cell culture might have been produced by CD8 T cells, macrophages or dendritic cells present in the lymph nodes of DO11.10 mice. The role of IFN- γ in asthma is not fully elucidated, since in experimental models this cytokine might prevent the development of eosinophilia in the airways and hyperresponsiveness (Li *et al.*, 1996), whereas IFN- γ administration in asthmatics does not change the lung mechanics (Boguniewicz *et al.*, 1995). The *in vitro* treatment with JMF2-1, as well as with lidocaine or dexamethasone, was able to block the production of IFN- γ , demonstrating that these compounds can act on inflammatory cells like CD8 T cells and mononuclear cells (Hollmann and Durieux, 2000). The reduction of IFN- γ production, induced by JMF2-1, lidocaine or dexamethasone, might be associated with the reduction of CD8 T cells observed in the bronchoalveolar lavage of antigenically challenged mice treated with JMF2-1.

During the decline of inflammatory response occurs an elimination of inflammatory cells, generally followed by the death of these cells, through apoptosis. Many anti-inflammatory drugs, like glucocorticoids, also act through the induction of apoptosis of inflammatory cells (McColl *et al.*, 1998, Herold *et al.*, 2006). Tanaka *et al.* (2002) suggested that the *in vitro* treatment with lidocaine inhibited the production of cytokines and the proliferation of human CD4 T cells by a mechanism other than apoptosis. However, other studies demonstrated that lidocaine *in vitro* treatment induces apoptosis of T cells, dependent on the concentration used (Boselli *et al.*, 2003, Kamiya *et al.*, 2005, Nishimura *et al.*, 2006, Werdehausen *et al.*, 2007). Our results showed that lidocaine treatment, as well as JMF2-1 or dexamethasone, inhibited the proliferation of T cells, apparently via apoptosis. The increase in apoptosis, induced by the former drugs explains the reduction of CD4 and CD8 T cells found in lungs of antigen challenged mice treated with JMF2-1, lidocaine or dexamethasone.

The reduction of T_h2 cytokines promoted by JMF2-1, in DO11.10 cultured T cells, may not be fully due to the induction of apoptosis, since 300 μ M of JMF2-1 reduced approximately 30 % of proliferation and induced up to 70 % of death, without affecting IL-4 *in vitro* production. Some anti-inflammatory agents like glucocorticoids can modulate the expression of transcription factors specific for mounting a T_h2 response (Ray and Cohn, 1999). The *in vitro* and *in vivo* treatment with dexamethasone reinforced the down modulation

of T_h2 cytokines, however, it is not fully elucidated through which molecular mechanisms lidocaine and JMF2-1 act when repressing the inflammation in the murine model of asthma.

Lidocaine is used as a local anesthetic and anti-arrhythmic due to its blocking activity of Na⁺ and Ca²⁺ channels (Tetzlaff, 2000). Moreover, lidocaine can promote the relaxation of smooth muscle cells through the reduction of intracellular Ca²⁺ (Kai e cols., 1993). On a preliminary study we showed that JMF2-1 was more potent than lidocaine in inhibiting the cellular influx of Ca²⁺ (da Costa e cols., 2007). The activation of several ionic channels, including Ca²⁺, K⁺, and Cl⁻ channels, is important for the induction of the activation state of T cells (Wacholtz e cols., 1992, Shapiro e cols., 1985). The increase in the levels of intracellular Ca²⁺ is of great importance to the activation of transcription factors such as JNK, NFATs and NF-κB (Clipstone and Crabtree, 1992, Hivroz-Burgaud e cols., 1991), associated with the inflammation. Therefore, the inhibitory effects of the proliferative response and production of cytokines, induced by JMF2-1 and lidocaine, may be associated to the inhibition of Ca²⁺ channels observed previously (da Costa e cols., 2007).

In this study we investigated the immunoregulatory mechanisms of action of the compound JMF2-1 responsible for the attenuation of lung inflammation in the murine model of asthma. The treatment with JMF2-1 prevented crucial features of asthma, probably by reducing the release of T_h2 cytokines and inhibiting the function and survival of T cells. These results reinforce the importance of JMF2-1 as a candidate of antiasthmatic therapies alternative to glucocorticoids.

Legends:

Figure 1: Hyperresponsiveness. Effect of nebulized JMF2-1 (0,5-2%), lidocaine (2%) or intraperitoneal dexamethasone (1 mg/kg) on airway hyperresponsiveness measured by Penh after aerolised methacholine (6, 12 and 25 mg/ml). Immunized mice were analyzed 24 hours after the last antigen challenge. Results represent mean \pm s.e.m. (n= 7). $^{+++}P<0,001$ compared to saline challenged group. $^*P<0,05$; $^{**}P<0,01$; $^{***}P<0,001$ compared with OVA challenged positive control group.

Figure 2: Lung tissue eosinophils. Effect of nebulized JMF2-1 (0,5-2%), lidocaine (2%) and intraperitoneal dexamethasone (1 mg/kg), on lung tissue eosinophil counts 24 hours after the last antigen challenge. Results represent mean \pm s.e.m. (n= 6). $^{++}P<0,01$; $^{+++}P<0,001$ compared to saline challenged group. $^*P<0,05$; $^{**}P<0,01$; $^{***}P<0,001$ compared with OVA challenged positive control group.

Figure 3: Eosinophils on BAL. Effect of JMF2-1 (0,5-2 %) on the accumulation of eosinophil per BAL, 24 hours after the last challenge. Results represent mean \pm s.e.m. (n= 6). $^{++}P<0,01$; $^{+++}P<0,001$ compared to saline challenged group. $^*P<0,05$; $^{**}P<0,01$; $^{***}P<0,001$ compared with OVA challenged positive control group.

Figure 4: BAL T cell phenotype. Effect of nebulized JMF2-1 (2%), lidocaine (2%) or intraperitoneal dexamethasone (1 mg/kg) on CD4 (A) and CD8 (B) bronchoalveolar lavage cellularity. (2 pools of 4 animals each). Results represent mean \pm s.e.m. $^*P<0,05$ compared with OVA challenged positive control group.

Figure 5: Production of T_h2 cytokines by lung explants from immunized and/or OVA challenged mice. Effect of nebulized JMF2-1 (2%), lidocaine (2%) or intraperitoneal dexamethasone (1 mg/kg) on T_h2 lung cytokine release. Results represent mean \pm s.e.m. (n= 4). $^+P<0,05$; $^{+++}P<0,001$ compared to saline challenged group. $^*P<0,05$; $^{**}P<0,01$; $^{***}P<0,001$ compared with OVA challenged positive control group.

Figure 6: Inhibition of *in vitro* cytokine secretion. Effect of *in vitro* treatment with JMF2-1 (100, 300 e 600 μ M), lidocaine (100, 300 e 600 μ M) or dexamethasone (100 μ M) on the secretion of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ , by T cells antigenically stimulated. Results represent mean \pm SEM representative of 2 separate experiments (n=3). $^+P<0,05$; $^+P<0,01$; $^{+++}P<0,001$

compared to saline challenged group. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ compared with OVA challenged positive control group.

Figure 7: Inhibition of proliferation. Effect of *in vitro* treatment with JMF2-1 (100, 300 e 600 μM), lidocaine (100, 300 e 600 μM) or dexamethasone (100 μM) on the proliferation of OVA challenged cells from lymph nodes of DO11.10 mice. Results represent mean \pm SEM of 3 sets of data from 3 separate experiments. +++ $P < 0,001$ compared to saline challenged group. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ compared with OVA challenged positive control group.

Figure 1

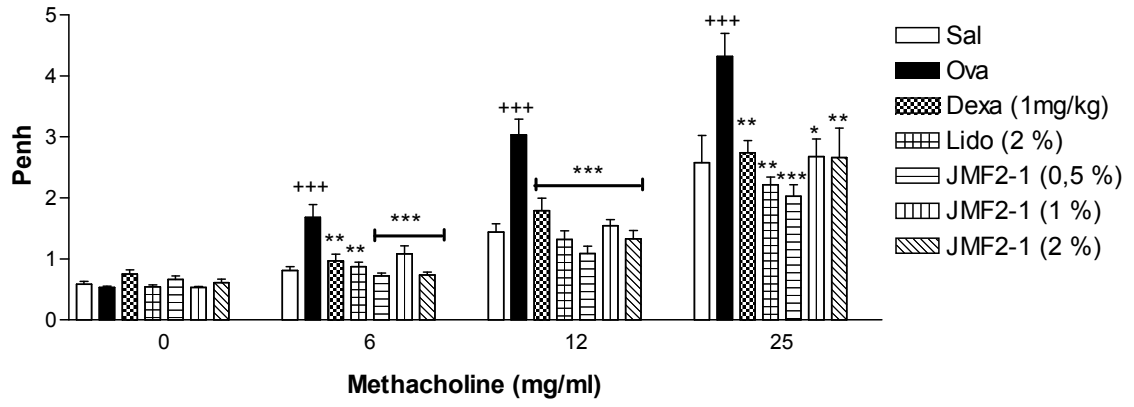


Figure 2

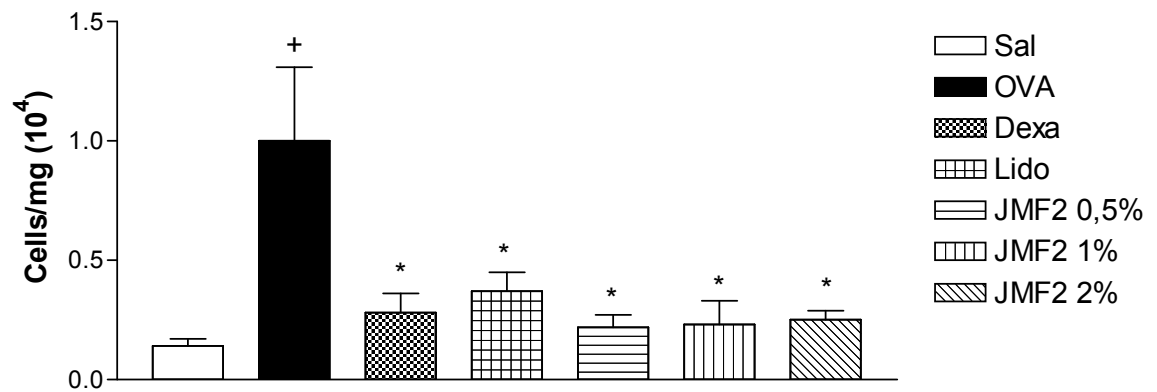


Figure 3

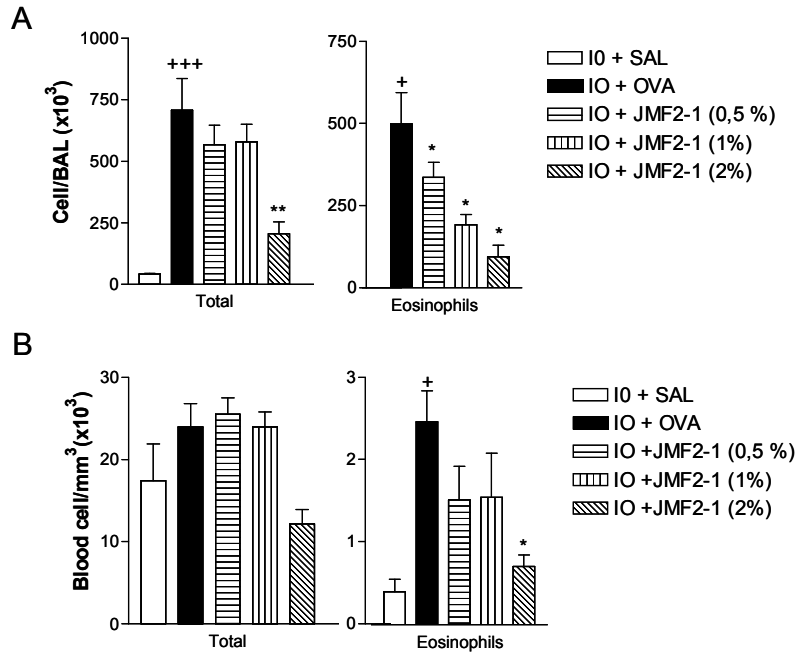


Figure 4:

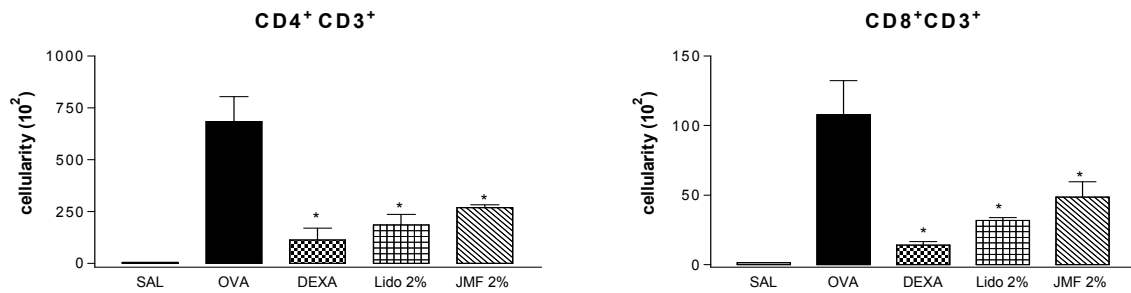


Figure 5:

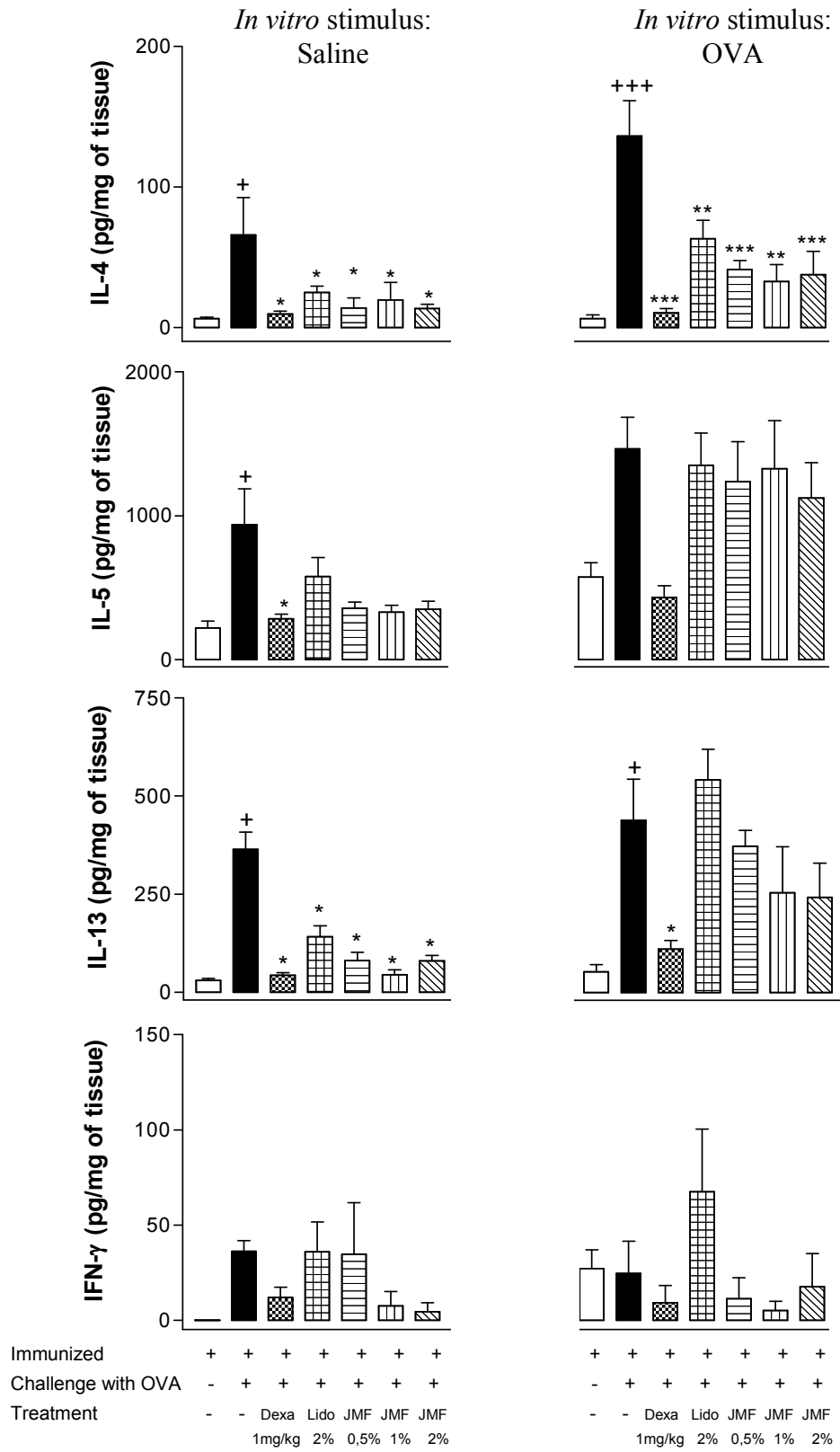
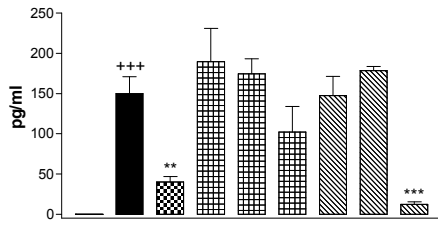
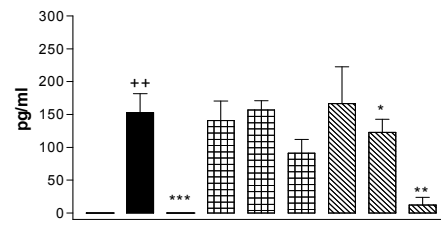


Figure 6:

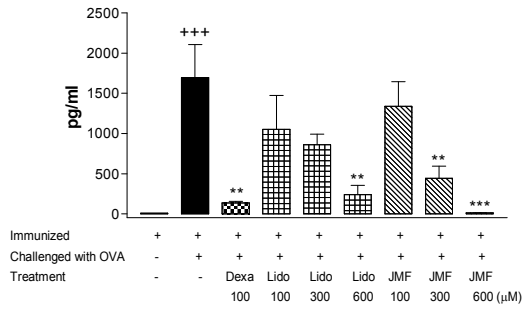
A



B



C



D

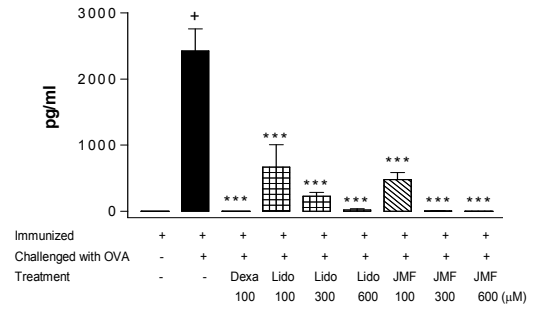
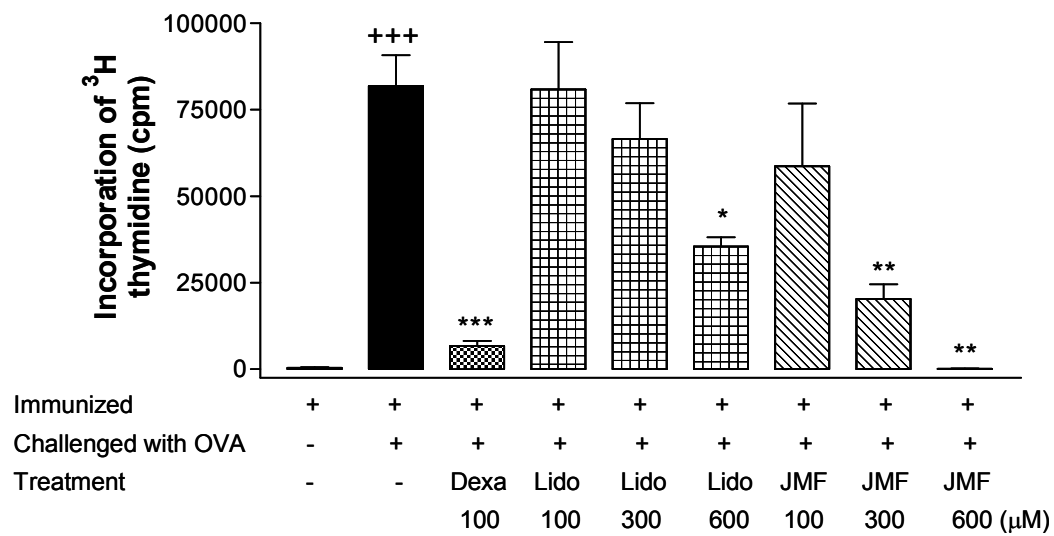


Figure 7:



References:

1. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):761-71.
2. Cserhati E. The history of bronchial asthma from the ancient times till the Middle Ages. *Acta Physiol Hung*. 2004;91(3-4):243-61.
3. Cserhati E. The history of bronchial asthma from the Renaissance till the beginning of the twentieth century. *Acta Physiol Hung*. 2005;92(2):181-92.
4. Schwartz RS. Paul Ehrlich's magic bullets. *N Engl J Med*. 2004 Mar 11;350(11):1079-80.
5. Wills-Karp M, Ewart SL. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet*. 2004 May;5(5):376-87.
6. Clinical practice guidelines. Expert Panel Report 2. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. : National Institute of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute.; 1997 Contract No.: Document Number].
7. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.
8. The International study of asthma and allergy in childhood (ISSAC) steering committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms: The International study of asthma and allergy in Childhood (ISSAC). . *Eur Respir J* 1998;12 315-35.
9. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o tratamento da Asma Grave. Brasília; 2002.
10. Dodge RR, Burrows B. The prevalence and incidence of asthma and asthma-like symptoms in a general population sample. *Am Rev Respir Dis*. 1980 Oct;122(4):567-75.
11. Saglani S, Bush A. The early-life origins of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Feb;7(1):83-90.
12. Jenkins MA, Hopper JL, Bowes G, Carlin JB, Flander LB, Giles GG. Factors in childhood as predictors of asthma in adult life. *BMJ*. 1994 Jul 9;309(6947):90-3.
13. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med*. 1998 Oct 22;339(17):1194-200.
14. Lonjou C, Barnes K, Chen H, Cookson WO, Deichmann KA, Hall IP, et al. A first trial of retrospective collaboration for positional cloning in complex inheritance: assay of the cytokine region on chromosome 5 by the consortium on asthma genetics (COAG). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 26;97(20):10942-7.
15. Doull IJ, Lawrence S, Watson M, Begishvili T, Beasley RW, Lampe F, et al. Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Apr;153(4 Pt 1):1280-4.

16. Wilkinson J, Grimley S, Collins A, Thomas NS, Holgate ST, Morton N. Linkage of asthma to markers on chromosome 12 in a sample of 240 families using quantitative phenotypic scores. *Genomics*. 1998 Nov 1;53(3):251-9.
17. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet*. 2002 Oct 26;360(9342):1313-22.
18. von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology*. 2007;212(6):433-9.
19. Yang IA, Savarimuthu S, Kim ST, Holloway JW, Bell SC, Fong KM. Gene-environmental interaction in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Feb;7(1):75-82.
20. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001 Aug;54(8):577-89.
21. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, et al. The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:579-628.
22. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol*. 2001 Nov;1(2):108-16.
23. Busse WW, Banks-Schlegel S, Wenzel SE. Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Dec;106(6):1033-42.
24. Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today*. 1992 Dec;13(12):501-7.
25. Muro S, Minshall EM, Hamid QA. The pathology of chronic asthma. *Clin Chest Med*. 2000 Jun;21(2):225-44.
26. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest*. 1999 Oct;104(8):1001-6.
27. Halayko AJ, Amrani Y. Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003 Sep 16;137(2-3):209-22.
28. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989 Mar 11;1(8637):520-4.
29. Black J. Airway smooth muscle in asthma. In: PJ Barnes MG, AR Leff, AJ Woolcock, editor. *Asthma*. Philadelphia: Lippencott-Raven; 1997. p. 809-22.
30. Homer RJ, Elias JA. Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med*. 2000 Jun;21(2):331-43, ix.
31. Pohunek P. Inflammation and airway remodeling. *Pediatr Pulmonol Suppl*. 2004;26:98-9.

32. Chabalgoity JA, Baz A, Rial A, Grille S. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Feb-Apr;18(1-2):195-207.
33. Foster PS, Martinez-Moczygemba M, Huston DP, Corry DB. Interleukins-4, -5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. *Pharmacol Ther.* 2002 Jun;94(3):253-64.
34. Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl.* 2001 Dec;34:24s-33s.
35. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:255-81.
36. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med.* 1996 Jan 1;183(1):195-201.
37. Walker C, Virchow JC, Jr., Bruijnzeel PL, Blaser K. T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J Immunol.* 1991 Mar 15;146(6):1829-35.
38. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202:175-90.
39. Temann UA, Geba GP, Rankin JA, Flavell RA. Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med.* 1998 Oct 5;188(7):1307-20.
40. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:425-56.
41. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity.* 1996 Mar;4(3):313-9.
42. Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Mar;100 Suppl 1:137-44.
43. Li XM, Chopra RK, Chou TY, Schofield BH, Wills-Karp M, Huang SK. Mucosal IFN-gamma gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice. *J Immunol.* 1996 Oct 15;157(8):3216-9.
44. Boguniewicz M, Martin RJ, Martin D, Gibson U, Celniker A, Williams M, et al. The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 1995 Jan;95(1 Pt 1):133-5.
45. Dahlen SE, Hedqvist P, Hammarstrom S, Samuelsson B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature.* 1980 Dec 4;288(5790):484-6.
46. Marom Z, Shelhamer JH, Bach MK, Morton DR, Kaliner M. Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis.* 1982 Sep;126(3):449-51.
47. Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S, Lindgren JA, et al. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in

- vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Jun;78(6):3887-91.
48. Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*. 1983 May 6;220(4597):568-75.
49. Barnes PJ. Histamine and serotonin. *Pulm Pharmacol Ther*. 2001;14(5):329-39.
50. Panettieri RA, Yadvish PA, Kelly AM, Rubinstein NA, Kotlikoff MI. Histamine stimulates proliferation of airway smooth muscle and induces c-fos expression. *Am J Physiol*. 1990 Dec;259(6 Pt 1):L365-71.
51. Barnes PJ. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Oct;3(10):831-44.
52. Barnes PJ, Pedersen S, Busse WW. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar;157(3 Pt 2):S1-53.
53. Belvisi MG. Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):207-14.
54. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001 Jan;107(1):7-11.
55. Chikanza IC, Kozaci D, Chernajovsky Y. The molecular and cellular basis of corticosteroid resistance. *J Endocrinol*. 2003 Dec;179(3):301-10.
56. de Castro M, Elliot S, Kino T, Bamberger C, Karl M, Webster E, et al. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol Med*. 1996 Sep;2(5):597-607.
57. Irwin RS, Richardson ND. Side effects with inhaled corticosteroids: the physician's perception. *Chest*. 2006 Jul;130(1 Suppl):41S-53S.
58. Sher ER, Leung DY, Surs W, Kam JC, Zieg G, Kamada AK, et al. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J Clin Invest*. 1994 Jan;93(1):33-9.
59. Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol*. 2007 Jun;21(6):1267-80.
60. Kam JC, Szeffler SJ, Surs W, Sher ER, Leung DY. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol*. 1993 Oct 1;151(7):3460-6.
61. Storms W, Kaliner MA. Cromolyn sodium: fitting an old friend into current asthma treatment. *J Asthma*. 2005 Mar;42(2):79-89.
62. Barnes PJ. Current therapies for asthma. Promise and limitations. *Chest*. 1997 Feb;111(2 Suppl):17S-26S.

63. Hamid QA, Mak JC, Sheppard MN, Corrin B, Venter JC, Barnes PJ. Localization of beta 2-adrenoceptor messenger RNA in human and rat lung using in situ hybridization: correlation with receptor autoradiography. *Eur J Pharmacol*. 1991 Feb 25;206(2):133-8.
64. Nelson HS. Long-acting beta-agonists in adult asthma: Evidence that these drugs are safe. *Prim Care Respir J*. 2006 Oct;15(5):271-7.
65. Usmani OS, Ito K, Maneechotesuwan K, Ito M, Johnson M, Barnes PJ, et al. Glucocorticoid receptor nuclear translocation in airway cells after inhaled combination therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Sep 15;172(6):704-12.
66. Mak JC, Nishikawa M, Shirasaki H, Miyayasu K, Barnes PJ. Protective effects of a glucocorticoid on downregulation of pulmonary beta 2-adrenergic receptors in vivo. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):99-106.
67. Boswell-Smith V, Cazzola M, Page CP. Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jun;117(6):1237-43.
68. Sullivan P, Bekir S, Jaffar Z, Page C, Jeffery P, Costello J. Anti-inflammatory effects of low-dose oral theophylline in atopic asthma. *Lancet*. 1994 Apr 23;343(8904):1006-8.
69. Scow DT, Luttermoser GK, Dickerson KS. Leukotriene inhibitors in the treatment of allergy and asthma. *Am Fam Physician*. 2007 Jan 1;75(1):65-70.
70. Fernandes LB, Goldie RG. The single mediator approach to asthma therapy: is it so unreasonable? *Curr Opin Pharmacol*. 2003 Jun;3(3):251-6.
71. Benz I, Kohlhardt M. Responsiveness of cardiac Na⁺ channels to antiarrhythmic drugs: the role of inactivation. *J Membr Biol*. 1991 Jun;122(3):267-78.
72. Coyle DE, Sperelakis N. Bupivacaine and lidocaine blockade of calcium-mediated slow action potentials in guinea pig ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987 Sep;242(3):1001-5.
73. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology*. 2000 Sep;93(3):858-75.
74. Ohnishi T, Kita H, Mayeno AN, Okada S, Sur S, Broide DH, et al. Lidocaine in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) is an inhibitor of eosinophil-active cytokines. *Clin Exp Immunol*. 1996 May;104(2):325-31.
75. Okada S, Hagan JB, Kato M, Bankers-Fulbright JL, Hunt LW, Gleich GJ, et al. Lidocaine and its analogues inhibit IL-5-mediated survival and activation of human eosinophils. *J Immunol*. 1998 Apr 15;160(8):4010-7.
76. Yanagi H, Sankawa H, Saito H, Iikura Y. Effect of lidocaine on histamine release and Ca²⁺ mobilization from mast cells and basophils. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1996 Oct;40(9):1138-44.
77. Tanaka A, Minoguchi K, Oda N, Yokoe T, Matsuo H, Okada S, et al. Inhibitory effect of lidocaine on T cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Mar;109(3):485-90.

78. Hunt LW, Swedlund HA, Gleich GJ. Effect of nebulized lidocaine on severe glucocorticoid-dependent asthma. *Mayo Clin Proc.* 1996 Apr;71(4):361-8.
79. Decco ML, Neeno TA, Hunt LW, O'Connell EJ, Yunginger JW, Sachs MI. Nebulized lidocaine in the treatment of severe asthma in children: a pilot study. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999 Jan;82(1):29-32.
80. Rosario NA, Riedi CA, Farias L. Lidocaine nebulization for treatment of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000 Sep;85(3):245-6.
81. Miller WC, Awe R. Effect of nebulized lidocaine on reactive airways. *Am Rev Respir Dis.* 1975 Jun;111(6):739-41.
82. Groeben H, Silvanus MT, Beste M, Peters J. Combined lidocaine and salbutamol inhalation for airway anesthesia markedly protects against reflex bronchoconstriction. *Chest.* 2000 Aug;118(2):509-15.
83. Weiss EB, Patwardhan AV. The response to lidocaine in bronchial asthma. *Chest.* 1977 Oct;72(4):429-38.
84. Fish JE, Peterman VI. Effects of inhaled lidocaine on airway function in asthmatic subjects. *Respiration.* 1979;37(4):201-7.
85. Bulut Y, Hirshman CA, Brown RH. Prevention of lidocaine aerosol-induced bronchoconstriction with intravenous lidocaine. *Anesthesiology.* 1996 Oct;85(4):853-9.
86. Groeben H, Silvanus MT, Beste M, Peters J. Both intravenous and inhaled lidocaine attenuate reflex bronchoconstriction but at different plasma concentrations. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Feb;159(2):530-5.
87. Hunt LW, Frigas E, Butterfield JH, Kita H, Blomgren J, Dunnette SL, et al. Treatment of asthma with nebulized lidocaine: a randomized, placebo-controlled study. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 May;113(5):853-9.
88. McCaughey W. Adverse effects of local anaesthetics. *Drug Saf.* 1992 May-Jun;7(3):178-89.
89. Tanaka K, Yamasaki M. Blocking of cortical inhibitory synapses by intravenous lidocaine. *Nature.* 1966 Jan 8;209(5019):207-8.
90. Groeben H, Grosswendt T, Silvanus MT, Pavlakovic G, Peters J. Airway anesthesia alone does not explain attenuation of histamine-induced bronchospasm by local anesthetics: a comparison of lidocaine, ropivacaine, and dyclonine. *Anesthesiology.* 2001 Mar;94(3):423-8; discussion 5A-6A.
91. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Sep;156(3 Pt 1):766-75.
92. Papisir SA, Kollintza A, Kitsanta P, Kapotsis G, Karatza M, Milic-Emili J, et al. Relationship of BAL and lung tissue CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and their ratio in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2005 Oct;128(4):2971-7.

93. Webb DC, McKenzie AN, Koskinen AM, Yang M, Mattes J, Foster PS. Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *J Immunol.* 2000 Jul 1;165(1):108-13.
94. Tomkinson A, Cieslewicz G, Duez C, Larson KA, Lee JJ, Gelfand EW. Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Mar;163(3 Pt 1):721-30.
95. Proust B, Nahori MA, Ruffie C, Lefort J, Vargaftig BB. Persistence of bronchopulmonary hyper-reactivity and eosinophilic lung inflammation after anti-IL-5 or -IL-13 treatment in allergic BALB/c and IL-4Ralpha knockout mice. *Clin Exp Allergy.* 2003 Jan;33(1):119-31.
96. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science.* 1990 Dec 21;250(4988):1720-3.
97. Busse WW, Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Mar;111(3 Suppl):S799-804.
98. Kamada AK, Szeffler SJ, Martin RJ, Boushey HA, Chinchilli VM, Drazen JM, et al. Issues in the use of inhaled glucocorticoids. The Asthma Clinical Research Network. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Jun;153(6 Pt 1):1739-48.
99. da Costa JC, Olsen PC, de Azeredo Siqueira R, de Frias Carvalho V, Serra MF, Alves LA, et al. JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jan;119(1):219-25.
100. Groeben H, Schlicht M, Stieglitz S, Pavlakovic G, Peters J. Both local anesthetics and salbutamol pretreatment affect reflex bronchoconstriction in volunteers with asthma undergoing awake fiberoptic intubation. *Anesthesiology.* 2002 Dec;97(6):1445-50.
101. Kanbara T, Tomoda MK, Sato EF, Ueda W, Manabe M. Lidocaine inhibits priming and protein tyrosine phosphorylation of human peripheral neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 1993 Apr 22;45(8):1593-8.
102. Cox G, Austin RC. Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J Leukoc Biol.* 1997 Feb;61(2):224-30.
103. Strickland I, Kisich K, Hauk PJ, Vottero A, Chrousos GP, Klemm DJ, et al. High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J Exp Med.* 2001 Mar 5;193(5):585-93.
104. Stam WB, Van Oosterhout AJ, Nijkamp FP. Pharmacologic modulation of Th1- and Th2-associated lymphokine production. *Life Sci.* 1993;53(26):1921-34.
105. Shi HZ, Humbles A, Gerard C, Jin Z, Weller PF. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(7):945-53.
106. McColl KS, He H, Zhong H, Whitacre CM, Berger NA, Distelhorst CW. Apoptosis induction by the glucocorticoid hormone dexamethasone and the calcium-ATPase inhibitor

thapsigargin involves Bcl-2 regulated caspase activation. *Mol Cell Endocrinol.* 1998 Apr 30;139(1-2):229-38.

107. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Jan;63(1):60-72.

108. Boselli E, Duflo F, Debon R, Allaouchiche B, Chassard D, Thomas L, et al. The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg.* 2003 Mar;96(3):755-6, table of contents.

109. Kamiya Y, Ohta K, Kaneko Y. Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomed Res.* 2005 Dec;26(6):231-9.

110. Nishimura Y, Kanada A, Yamaguchi JY, Horimoto K, Kobayashi M, Tatsuishi T, et al. Cytometric analysis of lidocaine-induced cytotoxicity: a model experiment using rat thymocytes. *Toxicology.* 2006 Jan 20;218(1):48-57.

111. Werdehausen R, Braun S, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Walczak H, Lipfert P, et al. Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology.* 2007 Jul;107(1):136-43.

112. Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest.* 1999 Oct;104(8):985-93.

113. Tetzlaff JE. The pharmacology of local anesthetics. *Anesthesiol Clin North America.* 2000 Jun;18(2):217-33, v.

114. Kai T, Nishimura J, Kobayashi S, Takahashi S, Yoshitake J, Kanaide H. Effects of lidocaine on intracellular Ca²⁺ and tension in airway smooth muscle. *Anesthesiology.* 1993 May;78(5):954-65.

115. Wacholtz MC, Cragoe EJ, Jr., Lipsky PE. A Na(+)-dependent Ca²⁺ exchanger generates the sustained increase in intracellular Ca²⁺ required for T cell activation. *J Immunol.* 1992 Sep 15;149(6):1912-20.

116. Shapiro DN, Adams BS, Niederhuber JE. Antigen-specific T cell activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *J Immunol.* 1985 Oct;135(4):2256-61.

117. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* 1992 Jun 25;357(6380):695-7.

118. Hivroz-Burgaud C, Clipstone NA, Cantrell DA. Signaling requirements for the expression of the transactivating factor NF-AT in human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1991 Nov;21(11):2811-9.

119. Leung DY, Martin RJ, Szeffler SJ, Sher ER, Ying S, Kay AB, et al. Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *J Exp Med.* 1995 Jan 1;181(1):33-40.

120. Chernoff DM, Strichartz GR. Kinetics of local anesthetic inhibition of neuronal sodium currents. pH and hydrophobicity dependence. *Biophys J.* 1990 Jul;58(1):69-81.

121. McAlpine LG, Thomson NC. Lidocaine-induced bronchoconstriction in asthmatic patients. Relation to histamine airway responsiveness and effect of preservative. *Chest*. 1989 Nov;96(5):1012-5.
122. Lagranderie M, Nahori MA, Balazuc AM, Kiefer-Biasizzo H, Lapa e Silva JR, Milon G, et al. Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of *Mycobacterium bovis* BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production. *Immunology*. 2003 Mar;108(3):352-64.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)