

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

ALBERTO GABRIEL BORGES FELIPE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA EPÓXIDO HIDROLASE
SOLÚVEL INDUZIDA POR DROGA NA INFLAMAÇÃO PULMONAR**

UBERABA

2023

ALBERTO GABRIEL BORGES FELIPE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA EPÓXIDO HIDROLASE
SOLÚVEL INDUZIDA POR DROGA NA INFLAMAÇÃO PULMONAR**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada” da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Carlo José de Oliveira Freire

Coorientador: Dr. Wellington Francisco Rodrigues

UBERABA

2023

Catálogo na fonte:
Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

F353a Felipe, Alberto Gabriel Borges
Avaliação da atividade inibitória da epóxido hidrolase solúvel induzida por droga na inflamação pulmonar / Alberto Gabriel Borges Felipe. – 2023. 46 p.: il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023

Orientador: Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Wellington Francisco Rodrigues

1. Pulmão. 2. Inflamação. 3. Enzimas. 4. Estudo clínico. I. Oliveira, Carlo José Freire de. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.24-002

ALBERTO GABRIEL BORGES FELIPE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITORIA DA EPÓXIDO HIDROLASE
SOLÚVEL INDUZIDA POR DROGA NA INFLAMAÇÃO PULMONAR**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada” da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
Orientador: Prof. Dr. Carlo José de Oliveira Freire
Coorientador: Prof. Dr. Wellington Francisco Rodrigues

Uberaba, 10 de janeiro de 2023

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlo José de Oliveira Freire
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profa. Dra. Camila Botelho Miguel
Centro Universitário de Mineiros - UNIFIMES

Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Aos meus pais,

Adriana Borges Nunes que sempre me apoio e me deu amor e carinho, sendo minha confidente leal, meu exemplo de força e tenacidade.

Euzébio Flores Felipe que sempre esteve ao meu lado em todos os meus erros e acertos, sendo para mim melhor que para si, meu primeiro exemplo de pesquisador e maior referência.

Às pessoas que me ensinaram e ofereceram tudo o que estava ao alcance deles, apesar das muitas adversidades. Foram responsáveis pela formação do meu caráter do ser humano que hoje sou.

À minha família

Minha esposa querida Katielly Xavier que me ofereceu apoio nos momentos mais difíceis dessa jornada tornando tudo mais agradável, e a minha filha Isabel que concedeu-me a honra de ser pai, e poder oferecer a ela tudo que me foi oferecido, minha maior razão de esforço e dedicação.

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A minha família: Euzébio, Adriana, Adriano, Katy e Isabel, minha Vó Maria Borges e ao padrinho Rubão, madrinha Adrilene e padrinho Washington, Arthur e Allison, Tia Silvana e a todos meus familiares. Obrigado pelo amor, companheirismo e incentivo.

Aos colegas e amigos que fizeram de alguma forma parte desse projeto, em especial Jordana, Alex, Ana Paula. Obrigado pela parceria. Aos gestores desta Instituição por possibilitarem a concretização deste trabalho, parabéns pelo profissionalismo e dedicação.

Ao meu orientador prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira e ao meu co-orientador prof. Dr. Wellington Francisco Rodrigues por proporcionarem a oportunidade de concretização de um sonho, trabalhando sempre com dedicação e profissionalismo em todas as etapas do projeto. Obrigado pela paciência, conhecimento e sabedoria.

Aos Professores desta instituição, que cederam seu tempo e conhecimento, colaborando para minha formação.

Aos Professores: Dra. Camila Botelho Miguel, Dr. Carlos Antônio Trindade da Silva, Dr. Marcos Vinícius da Silva, Dra. Thaís Soares Farnesi de Assunção, Dr. Marcelo Henrique Napimoga, Dr. Carlos Ueira Vieira e Dr. Siomar de Castro Soares por aceitarem compor as bancas avaliadoras de qualificação e defesa, como membros titulares ou suplentes. Todos foram singulares para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta pesquisa, sem vocês não seria possível.

Obrigado!

“São as perguntas que não sabemos responder que mais nos ensinam. Elas nos ensinam a pensar. Se você dá uma resposta a um homem, tudo o que ele ganha é um fato qualquer. Mas, se você lhe der uma pergunta, ele procurará suas próprias respostas”.

Patrick Rothfuss

APOIO FINANCEIRO

WFR (Coorientador) recebe bolsa de Pós-Doutorado Junior – PDJ (processo: 152889/2022-1).

RESUMO

Introdução: Diversas enzimas atuam em vias de regulação de fatores que modulam as respostas pulmonares, incluindo as inflamatórias. Os processos inflamatórios que ocorrem no pulmão são vinculados a processos de lesão tecidual e perda funcional do órgão. Assim, avaliar as interações enzimáticas inflamatórias relacionadas às funções pulmonares colaboram para a geração de indicadores de intervenção ou mesmo medidas profiláticas que impactam o prognóstico do paciente. A inibição da enzima epóxido hidrolase pelo uso do GSK2256294 tem sido considerado promissora em modelos clínicos e pré-clínicos para processos inflamatórios pulmonares associados ao tabaco, DPOC ou obesidade, entretanto as discrepâncias entre a intensidade de efeitos nos tipos de modelos ainda não foram levantadas. Levando em consideração de que alguns Fármacos inibidores da epóxido hidrolase não possuem efetividade inibitória torna-se importante avaliar a reprodutibilidade dos modelos. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da inibição da epóxido hidrolase pelo GSK2256294 em diferentes modelos de inflamação pulmonar. **Métodos:** Foi realizado um estudo secundário nas bases de dados científicos Medline (PubMed), Web of Science, Scielo, Cochrane Library, Embase, Google acadêmico e literatura cinzenta. As buscas foram realizadas por 2 revisores independentes, delimitando os registros entre o período de 2012 e 2021. Foram excluídos artigos duplicados e que não se enquadram no escopo da pesquisa. Foram realizadas a análise de qualidade metodológica e consistência das evidências. A metanálise foi aplicada para comparação entre as diferentes variáveis. **Resultado:** Um total de 86 estudos foram encontrados nas diferentes bases de estudos, sendo que quatro deles foram selecionados na literatura cinzenta. Após a aplicação dos critérios de elegibilidade três estudos se enquadraram e foram avaliados. Contudo, o GSK2256294 foi capaz de reduzir em ambos os modelos de estudo clínico e pré-clínico a enzima epóxido hidrolase solúvel, mas com maior efetividade em estudos clínicos. Além disso, colabora na atividade anti-inflamatória mediada pela via dos eicosatrienoicos, tanto pela redução de DHETS e Leukotoxin-diol. **Conclusão:** O presente estudo demonstrou que o GSK2256294 é um fármaco promissor no controle das manifestações deletérias observadas na inflamação pulmonar, no entanto, devido ao pequeno número de artigos recuperados nos bancos de dados mais estudos são necessários para garantir a consistência das evidências e permitir desvendar outras rotas de atividades biológicas mediadas pelo GSK2256294 para estudos clínicos e pré-clínicos. **Registro de protocolo:** O estudo foi registrado na base de dados Open Science Framework (OSF Registers) sob o Doi. de registro 10.17605/OSF.IO/PMHA8

e estruturado de acordo com o Protocolo Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses.

Palavras-chave: Enzimas. Função Pulmonar. Inflamação. Estudo Clínico. Estudo Pré-Clinico.

ABSTRACT

Background: Several enzymes act on regulatory pathways of factors that modulate pulmonary responses, including inflammatory enzymes. The inflammatory processes that occur in the lung are linked to tissue damage processes and organ functional loss. Thus, evaluating the inflammatory enzymatic interactions related to pulmonary functions collaborate to generate intervention indicators or even prophylactic measures that improve the patient's prognosis. The inhibition of the epoxide hydrolase enzyme using GSK2256294 has been considered as promising in clinical and preclinical models for pulmonary inflammatory processes associated with tobacco, COPD or obesity, however the discrepancies between effect sizes in the types of models have not yet been raised. Considering that some synthetic epoxide hydrolase inhibitors do not have inhibitory effectiveness, it is important to evaluate the reproducibility of the models. **Objective:** Thus, the present study evaluated possible discrepancies between the effects of the inhibition of epoxide hydrolase by GSK2256294 in different models of pulmonary inflammation. **Methods:** A secondary study was carried out in the scientific databases Medline (PubMed), Web of Science, Scielo, cochrane library, embase, academic google and gray literature. The searches were carried out by 2 independent reviewers, delimiting the records between the period from 2012 to 2021. Duplicate articles that did not fit the scope of the research were excluded. The methodological quality and consistency of evidence were analyzed. Meta-analysis was applied to compare the different variables. **Result:** A total of 86 studies were found in the different study bases, with 4 of these studies selected in the gray literature. After applying the eligibility criteria, 3 studies were classified and evaluated. However, GSK2256294 was able to reduce the soluble epoxide hydrolase enzyme in both clinical and preclinical study models, but with greater effectiveness in clinical studies. In addition, it collaborates in the anti-inflammatory activity mediated by the eicosatrienoic pathway, both by reducing DHETS and Leukotoxin-diol. It also helps in controlling blood flow. **Conclusion:** The present study demonstrated that GSK2256294 is a promising drug in the control of the deleterious manifestations observed in lung inflammation, however, due to the small number of articles retrieved from the databases, further studies are needed to ensure consistency of evidence and allow for unraveling. other routes of biological activities mediated by GSK2256294 for clinical and preclinical studies. **Protocol registration:** The study was registered in the Open Science Framework database (OSF Registers) under registration Doi: 10.17605/OSF.IO/PMHA8 and structured according to the Protocol Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses.

Keywords: Enzymes. Lung function. Inflammation. Clinical study. Preclinical study.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma da seleção dos estudos elegíveis para a revisão sistemática segundo os critérios de elegibilidade do estudo (PRISMA 2020).....	27
Figura 2 - Avaliação dos efeitos de GSK2256294 na inibição da epóxido hidrolase solúvel em modelo de estudo clínico e pré-clínico para lesão pulmonar.....	28
Figura 3 - Correlação e metaregressão do efeito entre a concentração de GSK2256294 e a inibição da formação de DHETS para os estudos elegíveis.....	29
Figura 4 - Distribuição média da relação leukotoxina por leukotoxina-diol em modelos pré-clínico e clínico para avaliação de inflamação pulmonar após intervenção com GSK2256294.....	30
Figura 5 - Efeito do GSK2256294 no fluxo sanguíneo associado à bradicinina em estudo clínico de lesão pulmonar de pacientes fumantes.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 INFLAMAÇÃO MEDIADA PELO TABAGISMO	13
1.2 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA.....	15
1.3 EPÓXIDO HIDROLASE SOLÚVEL.....	18
2 HIPOTÉSE	21
3 JUSTIFICATIVA	22
4 OBJETIVOS	23
4.1 GERAL.....	23
4.2 ESPECÍFICOS	23
5 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	24
5.2 PROTOCOLO DE REGISTRO	24
5.3 ESTRATÉGIA DE BUSCA.....	24
5.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	25
5.5 QUALIDADE METODOLÓGICA E DA EVIDÊNCIA	25
5.6 ANÁLISE DOS DADOS	26
6 RESULTADOS	27
6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	31
7 DISCUSSÃO	32
8 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO A - Avaliação da qualidade metodológica do ensaio clínico elegíveis (Robbis 2)	42
ANEXO B - Avaliação da qualidade metodológica do estudo pré-clínico elegível (Syrcle)	43
ANEXO C - Comprovante de submissão	44
ANEXO D - Artigo submetido	46

1 INTRODUÇÃO

O trato respiratório está constantemente exposto a agressões da atmosfera, dessa forma o sistema imune inato e o adaptativo compartilham componentes e agem em conjunto pela se defesa contra essas agressões levando à inflamação, a qual estimula a resposta imune para promover a recuperação. Durante o insulto pulmonar agudo as células endoteliais são ativadas para expressar fatores quimiotáticos que levam à fixação e diapedese de leucócitos na região. A inflamação crônica ocorre quando essa inflamação aguda é resolvida parcialmente (MOLDOVEANU *et al.*,2009).

Durante a inflamação crônica causada por patógenos ou exposição a toxinas, poluentes, irritantes e alérgenos a função anormal dos genes indutores ou supressores diminui a apoptose das células imunes, isso leva ao prolongamento da infiltração de células inflamatórias nos pulmões (MOLDOVEANU *et al.*,2009; AGHASAFARI; GEORGE; PIDAPARTI, 2019).

Desses poluentes é possível citar a fumaça do cigarro, aerossol este constituído por gotículas sólidas e líquidas em fase gasosa que apresentam vários efeitos tóxicos, mutagênicos e cancerígenos. Sua composição inclui nicotina, alcatrão, amônia, monóxido de carbono, dióxido de carbono, formaldeído, acroleína, acetona, hidrocarbonetos aromáticos poliaromáticos, hidroxiquinona, óxidos de nitrogênio e cádmio. O material inalado da fumaça do cigarro é depositado no trato respiratório dependendo do tamanho, com partículas maiores nas vias aéreas superiores e partículas menores nos alvéolos (LUGG *et al.*,2022).

Dos fatores de riscos associados as doenças crônicas o tabagismo está relacionado a distúrbios cerebrovasculares; neoplasias malignas de pulmão, boca, laringe e faringe; doença coronariana aguda (angina e infarto) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Os aspectos epidemiológicos do cenário mundial demonstram uma epidemia global do tabaco, causadora de mais de 7 milhões de óbitos por ano. Além do tabagismo, diversas alterações fisiopatológicas estão associadas às doenças inflamatórias pulmonares, incluindo obesidade centrípeta e síndromes metabólicas (BANKS *et al.*,2019; KARKI *et al.*,2021; REITSMA *et al.*,2021) somadas aos efeitos sistêmicos do tabagismo, os quais desencadeiam inflamação crônica e disfunção endotelial (YANG *et al.*,2017).

As doenças inflamatórias pulmonares possuem várias vias de modulação, incluindo respostas Th2, observadas em doenças mediadas por hipersensibilidade ou ainda vários outros perfis Th1, Th17, Th22 com a participação de células da imunidade adaptativa e inata (SALEK-ARDAKANI *et al.*,2004; SEGAL *et al.*,2016). Ainda que as doenças se iniciem por meio de

fatores primários, o direcionamento das diferentes respostas é mediado por atividades enzimáticas diversas (LINO-DOS-SANTOS-FRANCO *et al.*,2011; VAN DER VLIET, 2008).

Nessas doenças a limitação do fluxo de ar provocada pela resposta inflamatória a toxinas inalatórias, frequentemente a fumaça do cigarro resulta em estresse oxidativo, hipóxia crônica, rigidez arterial, disfunção endotelial, desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e senescência de fatores celulares endoteliais. Dessa forma, alguns métodos de avaliação da função endotelial e periférica em indivíduos com inflamação pulmonar e consequente alteração do endotélio vascular pulmonar são de bastante utilidade, sendo possível citar técnicas como a pletismografia de oclusão venosa, dilatação mediada por fluxo do antebraço e biomarcadores em indivíduos com inflamação pulmonar (THEODORAKOPOULOU *et al.*,2021).

1.1 INFLAMAÇÃO MEDIADA PELO TABAGISMO

Durante a fase de combustão do cigarro são produzidas diversas substâncias reativas oxidativas com graves efeitos na imunidade do hospedeiro, vez que pode alterada a resposta imune inata na mucosa oral, nasal e das vias aéreas e a resposta imune adaptativa em nível sistêmico. A fumaça de cigarro ativa diretamente as células epiteliais e induz à liberação de quimiocinas e mediadores inflamatórios, incluindo proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), fator nuclear kappa-B (NF- κ B), transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) e proteína-1 ativadora (AP-1) , os quais também estão envolvidos na regulação de genes inflamatórios e do ciclo celular sendo relacionado à inflamação crônica nas vias aéreas, enquanto simultaneamente modula as funções da mucosa e resulta na diminuição da resposta aguda ao desafio infeccioso e a destruição alveolar (LEE; TANEJA; VASSALLO, 2012; LIANG *et al.*,2021; WONG; MAGUN; WOOD, 2016).

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são Ser/Thr quinases que convertem estímulos extracelulares em uma ampla gama de respostas celulares fosforila diretamente, assim ativando fatores de transcrição ou outras quinases que, por sua vez, ativam fatores de transcrição que levam à expressão de genes de resposta e ao aumento do número de neutrófilos, linfócitos e macrófagos e também apoptose das células epiteliais das vias aéreas. As MAPKs convencionais compreendem as quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), quinases c-Jun amino (N)-terminais 1/2/3 (JNK1/2/3) (KIM *et al.*,2022; WONG; MAGUN; WOOD, 2016; CARGNELLO; ROUX, 2011).

O fator nuclear kappa-B (NF- κ B) é um complexo protéico ativado em resposta à fumaça do cigarro, sendo a sua ativação principalmente por meio de um heterodímero de p65 e p50 que atua como fator de transcrição para genes alvo de NF- κ B. Em condições normais, esta ativação é mantida sob rígido controle por inibidores de kappa (I κ Bs) que se ligam a subunidades de NF- κ B, impedindo assim a translocação de NF- κ B para o núcleo. Após a fosforilação pela I κ B quinase (I κ K), I κ B sofre ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal, liberando NF- κ B para translocar para o núcleo e regular a transcrição do gene alvo. E essa ativação em monócitos/macrófagos pode então desencadear a liberação de mediadores pró-inflamatórios no fluido epitelial pulmonar que amplificaram a cascata inflamatória pela ativação de células epiteliais, bem como recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas (LIU *et al.*,2021; RAHMAN, 2006).

Os mecanismos de ativação na via JAK/STAT começam com a ligação de um ligante, induzindo sua dimerização. Em seguida, as JAKs associadas ao receptor são ativadas e fosforilam os resíduos de tirosina da cauda intracelular de seus receptores. Essas fosforilações servem como locais de ancoragem para transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs) e se ligam a eles por meio de seu domínio SH2. Assim, os STATs são ativados por JAKs e se translocam a fim de o núcleo para regular a expressão gênica, propiciando os infiltrados de células inflamatórias compreendendo linfócitos T e B e macrófagos (MONTERO *et al.*,2021; ROGER *et al.*,2021).

AP-1 controla a transcrição de genes no controle da inflamação e homeostase do sistema imunológico. Quando essa via é ativada induz à liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina (IL)-8, IL-6 e a ativação de enzimas da família do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) que liga a exposição à fumaça do cigarro com a produção alterada de citocinas (KIM *et al.*,2021; STRZELAK *et al.*,2018).

Já é de conhecimento que a exposição crônica à fumaça do cigarro prejudica processos imunológicos e inflamatórios no pulmão, assim causando alterações nas respostas imunes humorais e celulares, no entanto existe uma dualidade dessas alterações, podendo apresentar características pro-inflamatória e imunossupressora (STRZELAK *et al.*,2018). Nesse sentido, as células epiteliais das vias aéreas demonstraram regular a expressão de citocinas e também de metaloproteases de matriz (MMPs) via sinalização de quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e aumento da ativação de p38. Ainda mostram características de dano celular e morte celular, conseqüentemente levando à liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) no espaço extracelular. Paralelamente, células imunes, macrófagos, neutrófilos,

células dendríticas e linfócitos migram para o sistema pulmonar, produzindo níveis aumentados de MMPs: MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-12 e MMP-14, podendo desempenhar papel fundamental na patogênese da inflamação nos pulmões (MADANI *et al.*,2018).

Os linfócitos desempenham papel crucial na patogênese inflamatória. O aumento dos linfócitos T CD8 + que produzem elevadas quantidades de interferon- γ e libera perforinas e granzimas e dos linfócitos B sugerem que suas respostas antígeno específicas podem se voltar contra autoepítomos, em parte devido à tolerância prejudicada, alterando o equilíbrio imunológico potencialmente induzidas pela nicotina associada à ativação do seu receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ em macrófagos, células T e células B (MADANI *et al.*,2018; STRZELAK *et al.*,2018).

1.2 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

A doença pulmonar obstrutiva crônica apresenta sintomas respiratórios persistentes e limitação do fluxo aéreo pouco reversível, geralmente progressiva. A limitação do fluxo aéreo está associada a uma resposta inflamatória crônica nas vias aéreas e nos pulmões a partículas e gases nocivos. O tabagismo é a principal causa de DPOC e responde por mais de 95% dos casos em países desenvolvidos (CHAN *et al.*,2019).

A primeira alteração histológica detectável após a exposição à fumaça do cigarro é a reprogramação epigenética das células epiteliais basais, as quais funcionam como a principal barreira após a lesão pulmonar. Em razão da reprogramação epigenética dessas células as vias aéreas distais exibem metaplasia escamosa, disfunção ciliar, hiperplasia de células basais e caliciformes e hipersecreção de muco, criando um ambiente inflamatório, propenso a danos e infecções, além de alterar o volume, composição e mucina do líquido da superfície das vias aéreas (FERRERA; LABAKI; HAN, 2021). A inflamação observada nos pulmões de pacientes com DPOC envolve tanto a imunidade inata (macrófagos, neutrófilos, mastócitos, Linfócitos natural killer, células T $\gamma\delta$, ILCs e células dendríticas) quanto a imunidade adaptativa (linfócitos T e B), sendo provável que esses linfócitos juntos perpetuam a inflamação neutrofilica nos pulmões da DPOC e possam ser responsáveis pela persistência da inflamação (BARNES, 2019; POTO *et al.*,2022).

Os macrófagos são as células imunes predominantes no parênquima pulmonar humano e são a primeira linha de defesa contra poluentes e patógenos microbianos, reconhecidos como uma célula multifuncional, central para a manutenção dos tecidos, contribuindo para a regeneração tecidual, crescimento pulmonar compensatório e podem recrutar células

progenitoras. As ações dos macrófagos podem ser conduzidas pelo NF- κ B, ativado nos macrófagos alveolares de pacientes com DPOC, principalmente durante as exacerbações. Também podem ser ativados por CSE para liberar mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, fatores quimiotáticos (CXCL1, CXCL8, CCL2, LTB 4) e espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, outras vias também são descritas como a proteína ativadora-1 (AP-1) e tirosina quinase c-Src. O aumento do recrutamento de monócitos da circulação em resposta a quimiocinas seletivas de monócitos que estão aumentadas nas vias aéreas da DPOC e a proliferação local de macrófagos pulmonares podem contribuir para o crescimento do número de macrófagos pulmonares, aumentando a liberação de fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, IL-8, outras quimiocinas CXC, peptídeo quimiotático de monócitos (MCP)-1, LTB4 (BAGDONAS *et al.*,2015; POTO *et al.*,2022).

O tabagismo estimula a produção e liberação de neutrófilos da medula óssea e a sobrevivência no trato respiratório, mediada por GM-CSF e G-CSF secretados pelos macrófagos pulmonares. O seu recrutamento para o parênquima pulmonar envolve a adesão inicial a células epiteliais ativadas por meio da E-selectina, a qual é superexpressa em células epiteliais nas vias aéreas de pacientes com DPOC, envolvendo vários fatores quimiotáticos como LTB 4, CXCL1, CXCL5 e CXCL8. Esses mediadores quimiotáticos podem ser derivados de macrófagos alveolares, mastócitos, células T e células epiteliais. Os próprios neutrófilos podem ser uma importante fonte de CXCL8 secretando elastase de neutrófilos (NE), catepsina G (CG) e proteinase 3 (PR3), bem como MMP-8 e MMP9 que contribuem para a destruição alveolar. À medida que um neutrófilo migra, serinoproteinases incluindo elastase de neutrófilos (NE), catepsina G e proteinase 3 (PR3) são liberadas dos grânulos azurófilos no espaço extracelular, e alguma enzima ativa é retida na membrana plasmática. Os substratos para essas proteinases incluem elastina, colágeno e fibronectina, sendo estes os principais componentes da matriz extracelular estando sua degradação ligada a todas as facetas clínicas da DPOC (BARNES, 2019; JASPER *et al.*,2019; POTO *et al.*,2022).

Os mastócitos surgem de células-tronco pluripotentes, maduras no tecido e têm a capacidade de gerar inflamação após a exposição a uma variedade de sinais mediados por receptores iniciados por mecanismos de resposta imune adquirida. São proeminentes no parênquima pulmonar humano e desempenham papel fundamental na coordenação da inflamação pulmonar, e normalmente, residem próximos aos epitélios, vasos, nervos, células musculares lisas e glândulas produtoras de muco, sendo nas vias aéreas expostos à inalação e injúrias (MORTAZ; FOLKERTS; REDEGELD, 2011; POTO *et al.*,2022).

O CXCL-10 foi implicado na migração de mastócitos para as células musculares lisas das vias e paralelamente, TNF- α e IFN γ aumentam sinergicamente a ativação transcricional de CXCL-10 em células musculares lisas das vias aéreas humanas via STAT-1, NF-kB. Por outro lado, os mastócitos têm muitos outros receptores que podem possivelmente ser ativados em pacientes com DPOC. Os mastócitos são uma fonte de IL-4 e IL-13 que podem influenciar as células T respostas, hiperplasia da glândula mucosa e hipertrofia/hiperplasia do músculo liso. Além disso, mediadores derivados de mastócitos como histamina e cisteína leucotrienos podem ativar macrófagos pulmonares para gerar óxido nítrico, enzimas lisossômicas e citocinas pró-inflamatórias no tecido circundante, ressaltando que a exposição a desafios ambientais pode resultar em patologia inflamatória crônica (MORTAZ; FOLKERTS; REDEGELD, 2011; POTO *et al.*, 2022).

As células dendríticas no pulmão estão distribuídas ao longo do epitélio e do parênquima captando os antígenos e, em seguida, migram para os linfonodos de drenagem. Dentro dos folículos linfoides pulmonares são as responsáveis pela ativação das células T e B virgens. Na DPOC, um número maior de células dendríticas é recrutado para os pulmões, no entanto, a exposição prolongada a partículas nocivas prejudica a sua maturação, o que inibe sua capacidade de apresentação de antígenos. À medida que o número de células dendríticas maduras diminui no tecido pulmonar afetado pela DPOC, liberam mais CCL3 e CXCL2, os quais podem promover o recrutamento de neutrófilos, e também induzem respostas TH 1 e TH 17, além de participarem da degradação da elastina no parênquima pulmonar. Durante a progressão da DPOC, as CDs participam da colonização bacteriana e da tolerância imunológica e facilitam o remodelamento pulmonar (BU; WANG; YIN, 2020; FREEMAN; CURTIS, 2017; PETERS; PETERS; BUFE, 2019).

Os linfócitos T são principalmente células T citotóxicas CD8 +, mas as células T auxiliares CD4 + também estão presentes na DPOC. Na resposta inicial à fumaça do cigarro, as células epiteliais das vias aéreas e os macrófagos induzem a inflamação das vias aéreas, tanto por efeitos diretos quanto pelo recrutamento de células T da periferia. As células CD8 + causam apoptose e destruição das células epiteliais alveolares mediante a liberação de perforinas e TNF- α , enquanto as células CD4 + recrutam e ativam outras células imunes, incluindo neutrófilos, perpetuando o processo inflamatório sustentado (FORSSLUND *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2021).

1.3 EPÓXIDO HIDROLASE SOLÚVEL

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poli-insaturado ω -6 que constitui o domínio fosfolipídico da maior parte das membranas celulares. O AA é liberado pela fosfolipase A2 citoplasmática (cPLA2) podendo ser metabolizado em eicosanóides por meio de três vias principais: a via prostaglandina-endoperóxido sintase/ciclooxigenase (PTGS/COX), a via lipoxigenase (LOX) e a via do citocromo P450 (CYP). Os prostanóides são os eicosanóides produzidos pela via PTGS/COX, enquanto a via LOX gera leucotrienos e ácidos hidroxi-eicosatetraenóico (HETE). As enzimas CYP que convertem AA em eicosanóides incluem CYP epóxigenase e enzimas CYP ω -hidroxilase. As CYP epóxigenases, como os membros da família CYP2C e CYP2J, metabolizam AA em quatro ácidos epóxi-eicosatrienóico biologicamente ativos (EETs) (5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET, e 14,15-EET). Todos os EET são então rapidamente metabolizados por enzimas epóxido hidrolase solúvel (sEH) em ácidos dihidroxi-eicosatrienóico (DHETs) que têm atividade biológica reduzida ou inexistente (DING *et al.*, 2021; IMIG, 2019; WANG & DUBOIS, 2012).

Alguns estudos relatam a ação de alguns dos metabólitos eicosanóides do ácido araquidônico em vários papéis na patogênese dessas doenças, como efeitos anti-inflamatórios, anti-fibrogênicos, anti-apoptóticos e nos padrões das respostas das células inflamatórias (CASTELINO, 2012; CELEJEWSKA-WÓJCIK *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2021). Desses metabólitos com significância cabe citar os descritos como fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, resultado do metabolismo do ácido araquidônico pelas epóxigenases do citocromo P450, fatores esses que atuam no controle do tônus vasomotor, inibição da ativação da via de sinalização do NF κ -B, por meio de modulação dos canais de potássio somado a efeitos anti-apoptóticos nas células endoteliais e propriedades anti-inflamatórias (RAND *et al.*, 2019; SPECTOR; NORRIS, 2007; SUDHAHAR; SHAW; IMIG, 2010).

Os fármacos existentes têm como alvo as vias da cascata do ácido araquidônico da ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (MARNETT, 2009; HAEGGSTROM *et al.*, 2010) e, que em grande parte biossintetizam mediadores pró-inflamatórios, enquanto o braço mais recentemente descoberto da cascata do citocromo P450 não tem sido explorado como um alvo farmacêutico. A via do P450 do ácido araquidônico produz tanto metabólito pró-inflamatório, como o ácido 20-hidroxi-eicosatetraenóico hidroxilado (20-HETE) (WILLIAMS *et al.*, 2010) como os ácidos graxos epóxi com ação anti-inflamatória tais como EETs (SPECTOR, 2009; IMIG, 2012). Os EETs parecem favorecer a resolução do processo inflamatório, em vez de evitar de uma forma semelhante à exibida por mediadores na via das lipoxigenases (SERHAN

et al.,2011). Dessa forma, novas terapêuticas baseadas na inibição farmacológica das sEH vem sendo estudadas nos últimos tempos (KODANI; HAMMOCK, 2015), demonstrando ainda ser bastante efetivas em diversos modelos experimentais tais como artrite (TRINDADE-DASILVA *et al.*,2020) atividade analgésica e anti-inflamatória (HARRIS *et al.*,2015; SASSO *et al.*,2015).

Apesar dos efeitos promissores em diversos modelos experimentais dos potenciais fármacos inibidores de epóxido hidrolase solúvel nenhum foi aplicado com sucesso em testes pré-clínicos (BZÓWKA *et al.*,2021), como é o caso do Ésteres e sais de ácido adamantano-1-il-ureido]-dodecanóico (AUDA) que apesar de serem considerados bons inibidores de sEH, seu uso clínico foi restrito devido à instabilidade metabólica e solubilidade limitada em água e muitos solventes orgânicos (TRIPATHI *et al.*,2018) ou no caso do AR9281 que mostrou um alto nível de segurança nos ensaios clínicos de Fase I e IIA, mas podem apresentar efeitos colaterais relacionados a ao mecanismo de inibição ou relacionados ao composto (MORISSEAU; HAMMOCK, 2013).

Diante disso, desenvolveu-se um inibidor potente e seletivo de sEH, o GSK2256294, descoberto utilizando tecnologia de Bibliotecas químicas codificadas por DNA, baseando-se em uma mistura combinatória de oligonucleotídeos expressa como um peptídeo combinatório ou biblioteca de proteínas na superfície de partículas de fago ou expressa usando métodos de tradução *in vitro*. É produzida uma população de moléculas da biblioteca que se liga a um alvo, logo sendo deconvoluída por sequenciamento dos genes que codificam os peptídeos selecionados (BELYANSKAYA *et al.*, 2017).

O GSK2256294 ((1 R, 3 S) -N- (4 - ciano - 2- (trifluorometil) benzil) -3 - ((4 - metil - 6- (metilamino) -1,3,5 - triazin - 2 - il) amino) ciclohexanocarboxamida) é um potente inibidor de forte ligação, mas reversível, de sEH. É específico para o domínio da hidrolase de EPHX2 e inativo contra o domínio da fosfatase, todavia demonstrou atenuar a inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro em modelos animais (CAPOZZI *et al.*,2016; ONTKO *et al.*,2021). Tem sido testado em ensaios pré-clínicos e clínicos randomizados com potencial de impactar a função endotelial pulmonar e sistêmica (DING *et al.*,2021), atenuando a inflamação pulmonar causada pela fumaça de cigarro. Tais estudos têm demonstrado que a inibição de sEH impediu a iniciação e a manutenção, bem como promoveu a resolução da resposta inflamatória pulmonar (LAZAAR *et al.*,2016; PODOLIN *et al.*,2013; YANG *et al.*,2017).

Testes em modelos experimentais demonstraram que com a inibição das sEH os EETs são regulados, logo abrandando-se a inflamação e enfisema secundárias ao tabagismo com melhora na síndrome metabólica e função pulmonar (IYER *et al.*,2011). Estratégias

consagradas são utilizadas visando à inibição enzimática para o controle destas e outras manifestações por meio da utilização de drogas como os anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (BEDNAREK *et al.*, 1999).

Sendo assim, é de extrema relevância o levantamento de estudos que demonstrem a eficácia do inibidor potente e seletivo de sEH, o GSK2256294, minimizando ou eliminando a inflamação pulmonar causada pela fumaça de cigarro como tratamento inovador e promissor para os portadores de patologias pulmonares. Além disso, espera-se que estudos pré-clínicos possam mimetizar situações funcionais em humanos. Dadas as discrepâncias de efeitos para inibidores da sEH avaliar as disparidades de modelos pré-clínico e clínico com o uso de GSK2256294 poderá garantir delineamentos experimentais mais assertivos aos estudos de lesões pulmonares. Assim, o presente estudo avaliou por meio de uma revisão sistemática as possíveis discrepâncias entre os efeitos da inibição da epóxido hidrolase pelo GSK2256294 em diferentes modelos de inflamação pulmonar.

2 HIPOTÉSE

O inibidor de epóxido hidrolase solúvel GSK2256294 viabiliza atividade anti-inflamatória capaz de reduzir os efeitos deletérios na inflamação pulmonar e sua atividade é dependente do modelo experimental.

3 JUSTIFICATIVA

Há evidências de que a atividade de GSK2256294 inibiu a iniciação e manutenção, bem como promoveu a resolução da resposta inflamatória pulmonar mediada por agressões externas (LAZAAR *et al.*,2016; PODOLIN *et al.*,2013; YANG *et al.*,2017). A avaliação em modelo experimental indicou que a inibição de sEH e TSEs é regulada, demonstrando atenuação da inflamação e enfisema secundários ao tabagismo com melhora da síndrome metabólica e da função pulmonar (IYER *et al.*,2011). Estratégias que visam inibir enzimas que colaboram na potencialização da inflamação e dano tecidual já são amplamente utilizadas, como os anti-inflamatórios (BEDNAREK *et al.*,1999), mas a busca por biomoléculas que possam garantir maior seletividade e eficácia ainda é necessário.

Assim, torna-se importante a síntese de estudos que possam demonstrar ou contribuir para a consistência das evidências sobre a atividade do GSK2256294 na intervenção para doenças inflamatórias pulmonares. Além disso, dados os aspectos seletivos do inibidor, é importante entender possíveis discrepâncias entre os modelos experimentais, visando melhores delineamentos com resultados cada vez mais consistentes.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

- Avaliar a eficácia da ação da GSK2256294 e possíveis discrepâncias entre os efeitos da inibição da epóxido hidrolase em diferentes modelos de inflamação pulmonar, por meio de uma revisão sistemática da literatura.

4.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a efetividade na ação do inibidor de epóxido hidrolase solúvel, o GSK2256294, quanto a imunomodulação em processos inflamatórios pulmonares;
- Avaliar e comparar a ação do GSK2256294 para diferentes modelos de inflamação pulmonar.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho é um estudo secundário e não ultrapassa nenhuma legislação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal vigente relacionada à ética em animais, tampouco as do comitê de ética em pesquisa com humanos.

5.2 PROTOCOLO DE REGISTRO

O estudo foi registrado na base de dados Open Science Framework (OSF Registers) sob o Doi. de registro 10.17605/OSF.IO/PMHA8 e estruturado de acordo com o Protocolo Preferred Reporting Items for Systematic (PRISMA 2020) (PAGE *et al.*,2021).

5.3 ESTRATÉGIA DE BUSCA

Foi realizada uma busca eletrônica nas bases de dados Medline (PubMed), Web of Science, Scielo, Cochrane Library, Embase, Google acadêmico e literatura cinzenta. O Medical Subject Headings (MeSH) foi utilizado para a definição dos descritores das bases de dados PubMed e Web of Science, e o “Descritores em Ciências da Saúde” (DeCS) foi utilizado para a definição dos descritores da base de dados Scielo. A seleção dos artigos nas bases de dados PubMed e Web of Science foi realizada com a inserção dos descritores

“N-((4-cyano-2-(trifluoromethyl)phenyl)methyl)-3-((4-methyl-6-(methylamino) 1,3,5 triazin-2-yl)amino)cyclohexanecarboxamide e “Pulmonary Disease, Chronic Obstructive”; ((((((((((Pulmonary Disease, Chronic Obstructive[Title/Abstract]) OR (Chronic Obstructive Lung Disease[Title/Abstract])) OR (Chronic Obstructive Pulmonary Diseases[Title/Abstract])) OR (COAD[Title/Abstract])) OR (COPD[Title/Abstract])) OR (Chronic Obstructive Airway Disease[Title/Abstract])) OR (Chronic Obstructive Pulmonary Disease[Title/Abstract])) OR (Airflow Obstruction, Chronic[Title/Abstract])) OR (Airflow Obstructions, Chronic[Title/Abstract])) OR (Chronic Airflow Obstructions[Title/Abstract])) OR (Chronic Airflow Obstruction[Title/Abstract])) AND ((((((((((Pulmonary Disease, Chronic Obstructive[Title/Abstract]) OR (Chronic Obstructive Lung Disease[Title/Abstract])) OR (Chronic Obstructive Pulmonary Diseases[Title/Abstract])) OR (COAD[Title/Abstract])) OR (COPD[Title/Abstract])) OR (Chronic Obstructive Airway Disease[Title/Abstract])) OR

(Chronic Obstructive Pulmonary Disease[Title/Abstract])) OR (Airflow Obstruction, Chronic[Title/Abstract])) OR (Airflow Obstructions, Chronic[Title/Abstract])) OR (Chronic Airflow Obstructions [Title/Abstract])) OR (Chronic Airflow Obstruction[Title/Abstract]))”. utilizando-se o conector “AND” ou “OR” entre os termos. Foi utilizada a mesma estratégia realizando alterações na chave de busca de acordo com as características dos demais bancos de dados.

A busca na literatura cinzenta foi realizada seguindo as orientações do manual “Grey Matters: a practical tool for searching health-related grey literature” (CADTH, 2018).

5.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Foram estabelecidos como critérios de elegibilidade ensaios clínicos e pré-clínicos *in vivo* ou *in vitro* de estudos originais que apresentaram relações com inflamação no parênquima pulmonar e atividade enzimática, independentemente se avaliada como variável de desenvolvimento, exposição ou de desfecho. Para efeito da presente revisão foram consideradas todas as avaliações relacionadas à temática publicadas, restringindo-se ao período de 2012 a 2021.

Os estudos que relataram argumentos relacionados à temática em algum tópico do trabalho, mas que não foram produtos de delineamentos de pesquisa, como revisões narrativas ou não relacionarem com a temática foram excluídos do estudo. Foram avaliados estudos indexados no Pubmed dos últimos 10 anos. Logo, os dados extraídos incluíram as características dos estudos e suas principais abordagens. E, por fim, os dados foram avaliados e descritos no decorrer da seção de resultados. A descrição dos dados foi feita por avaliação qualitativa com a utilização de tabelas, por 2 revisores de forma independente (AGBF) (APBL), e, posteriormente, os dados foram compilados e as possíveis divergências resolvidas junto a um terceiro autor com expertise sobre o tema (WFR).

5.5 QUALIDADE METODOLÓGICA E DA EVIDÊNCIA

A avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos na revisão foi realizada por 2 revisores de forma independente, e opiniões divergentes foram resolvidas por um acordo entre eles. Utilizaram-se as ferramentas ROB 2.0 (STERNE *et al.*, 2019) que avalia o risco de viés para estudos clínicos e SYRCLE (HOOIJMANS *et al.*, 2014) para o risco de viés em estudos com animais. Essa ferramenta (Syrcle) contém as seguintes categorias de avaliação:

viés de seleção, performance, detecção, atrito, relato e outras fontes de viés. Dez perguntas são aplicadas aos artigos incluídos na revisão sistemática, cujas respostas podem ser “SIM” quando há baixo risco de viés, “NÃO”, para alto risco de viés, já “INCERTO”, indica risco de viés não definido. Não é recomendado calcular o escore somatório de cada estudo individual por essa ferramenta (HOOIJMANS *et al.*, 2014).

5.6 ANÁLISE DOS DADOS

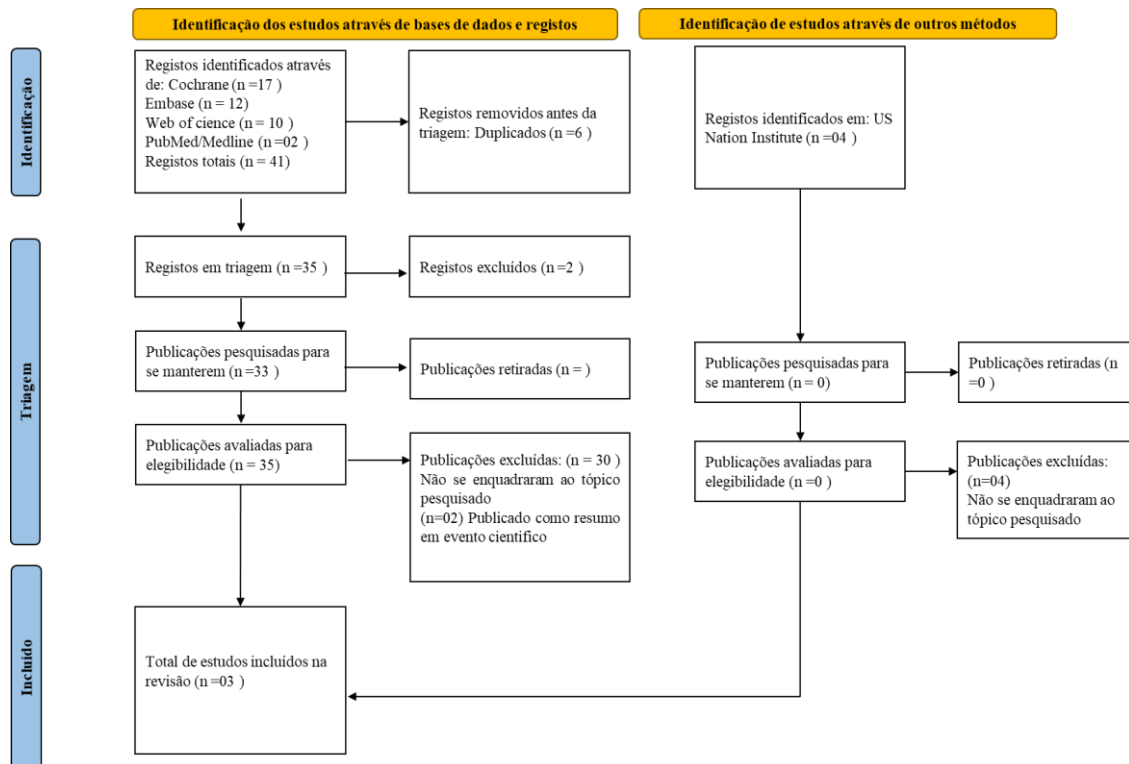
Os dados foram tabulados no Excel 2019 v2212 da Microsoft® e para as análises e exposição visual dos dados foram utilizados os programas RStudio v. 4.9.

O pacote geral para meta-análises versão 4.9-5 foi utilizado para avaliação e comparações das prevalências (metaprop), médias (metacont) ou metaregressão (metareg). O “Forest plot” foi utilizado para avaliação e representação dos dados, assim como gráfico de correlação para F(X). A heterogeneidade dos estudos foi avaliada utilizando a estatística I^2 a partir da estatística Q do teste de Cochran e do número J de estudos analisados. Dada a heterogeneidade encontrada foi considerado o modelo de efeito aleatório (ARANGO, 2001; HIGGINS; THOMPSON, 2002; LITTELL; CORCORAN; PILLAI, 2008; VIECHTBAUER, 2010).

6 RESULTADOS

Um total de 86 estudos foram encontrados com a utilização da chave de busca nas diferentes bases de estudos, sendo quatro deles foram selecionados na literatura cinzenta. Ainda na fase de identificação 41 registros foram separados para posterior triagem, com seis excluídos por estarem duplicados. Na fase de triagem com a leitura integral dos registros 30 artigos foram descartados por não se enquadrarem no tópico estudo e dois por serem publicados em formato de evento científico. Com a aplicação dos critérios de elegibilidade 3 estudos se enquadraram e foram avaliados (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma da seleção dos estudos elegíveis para a revisão sistemática segundo os critérios de elegibilidade do estudo (PRISMA, 2020)



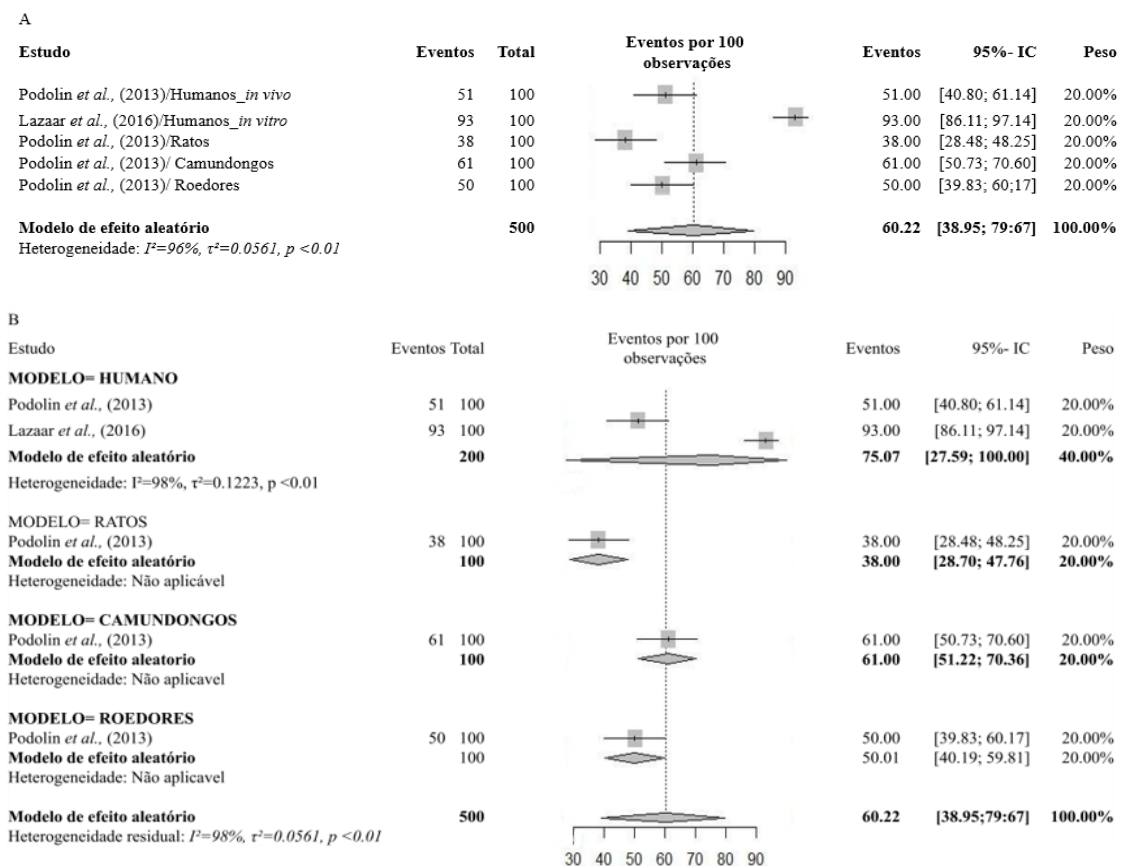
Na avaliação da qualidade metodológica dos estudos elegíveis foi possível encontrar “algumas preocupações” para ambos os estudos clínicos (SP1) e moderado risco de viés para o estudo pré-clínico (SP2) de acordo com as recomendações de cada ferramenta aplicada (Robbis2 e Syrcle).

Inicialmente foram verificados os efeitos de GSK2256294 na redução da enzima epóxido hidrolase solúvel para os diferentes modelos (Figura 2A). Uma alta heterogeneidade é observada no agrupamento das frequências ($I^2 = 96\%$), havendo diferenças significativas entre

os modelos de estudo ($p < 0,001$). O maior efeito de redução observado foi em avaliação “*in vitro*” em amostras de sangue humano (redução de 93%).

Por outro lado, nas amostras de modelo em ratos a atividade de GSK2256294 foi capaz de reduzir apenas 38%. O efeito de redução aumentou em modelo pré-clínico quando utilizado camundongo (61%) ou média dos efeitos quando avaliados roedores (50%) (Figura 2).

Figura 2 - Avaliação dos efeitos de GSK2256294 na inibição da epóxido hidrolase solúvel em modelo de estudo clínico e pré-clínico para lesão pulmonar

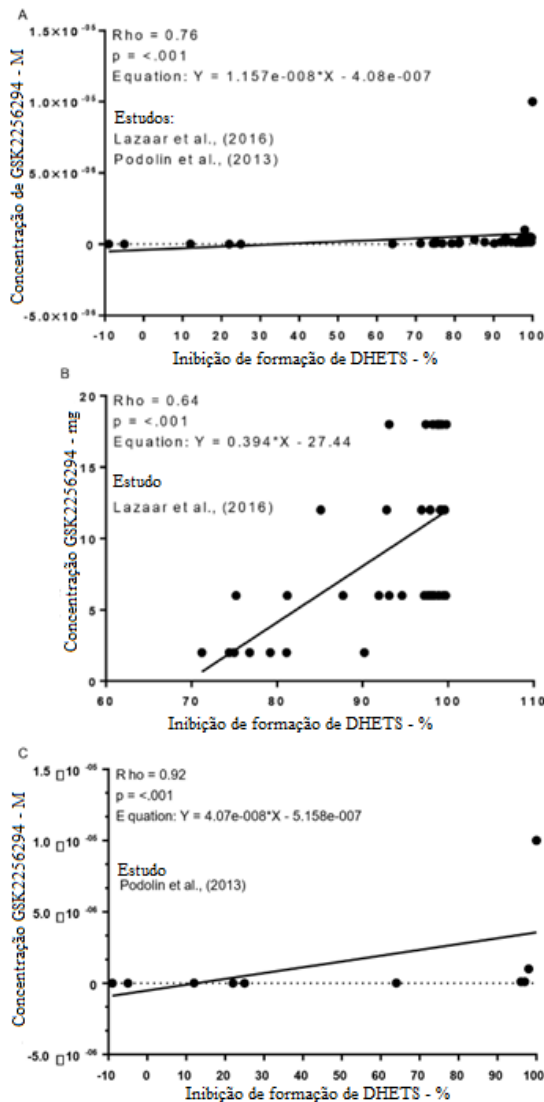


Nota: Em A, descrição das frequências relativas de inibição para os diferentes modelos de estudo. Já em B as frequências relativas dos efeitos de inibição estratificados pelos modelos de estudos. As médias das prevalências foram utilizadas e apresentado também os intervalos de confiança de 95% para cada descrição.

Após determinar as atividades de inibição da enzima epóxido hidrolase solúvel com o uso do GSK2256294 nos diferentes modelos para inflamação pulmonar foi também avaliado o efeito de diminuição dos DHETS correlacionando com as concentrações de GSK2256294 para os diferentes modelos (clínicos e pré-clínico) (Figura 3). Para todas as correlações foi possível identificar uma correlação positiva e significativa e quando agrupados os modelos, foi observada correlação positiva de 0.76(Figura 3A). Quando avaliados os modelos separadamente é possível observar aumento da heterogeneidade dos valores de redução de

DHES para o modelo clínico com um $\rho = 0.64$. (Figura 3B). A heterogeneidade diminuiu quando avaliado apenas o modelo pré-clínico e o efeito de correlação aumenta ($\rho = 0.92$) (Figura 3C).

Figura 3 - Correlação e metaregressão do efeito entre a concentração de GSK2256294 e a inibição da formação de DHETS para os estudos elegíveis.

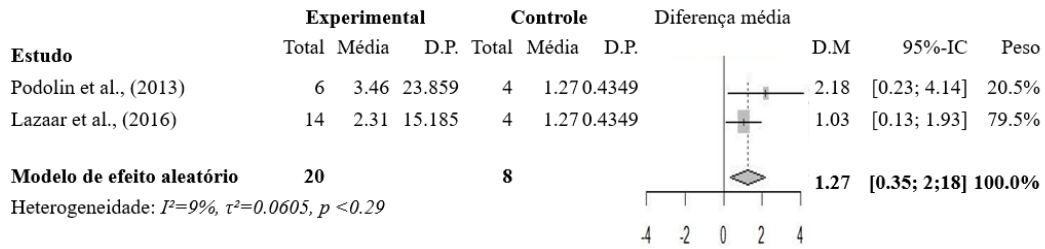


Nota: Em A, avaliação associada entre estudo pré-clínico (PODOLIN *et al.*, 2013) e estudo clínico (LAZAAR *et al.*, 2016) da correlação entre efeito e concentração de GSK2256294 na inibição de formação de DHETS. Em B e C, avaliações separadas para cada modelo de estudo. O teste de Spearman foi utilizado para avaliar possíveis correlações. Sendo o nível de significância utilizado de 5%.

A epóxido hidrolase solúvel participa na conversão de leukotoxina para leukotoxina-diol, com reconhecida atividade inflamatória. A relação entre estes dois compostos possibilita a percepção da atividade enzimática e a situação inflamatória do modelo avaliado. Assim foi verificada a sumarização dos efeitos da relação de leukotoxina e leukotoxina-diol em modelo de inflamação pulmonar sob a atividade do GSK2256294 (Figura 4). A junção dos efeitos de

GSK2256294 na relação de leukotoxina por leukotoxina-diol entre os modelos clínicos e pré-clínicos demonstrou baixa heterogeneidade ($I^2 = 9\%$) com um efeito médio de aumento da relação de 27% (IC = 0.35 a 2.18) (Figura 4).

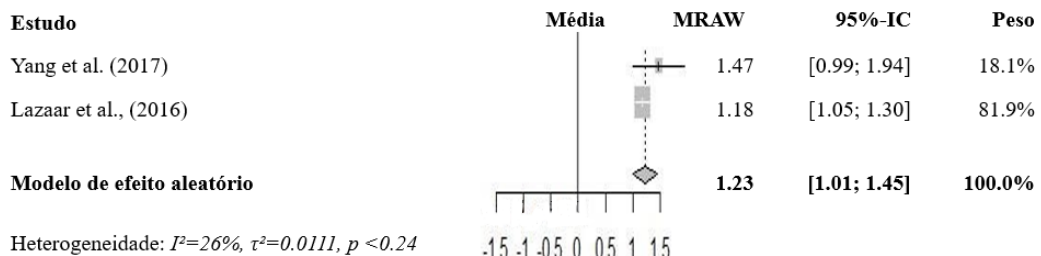
Figura 4 - Distribuição média da relação leukotoxina por leukotoxina-diol em modelos pré-clínico e clínico para avaliação de inflamação pulmonar após intervenção com GSK2256294.



Nota: A amostragem, as médias e os desvios padrões para os efeitos na relação de leukotoxina por leukotoxina-diol foram obtidos dos estudos elegíveis e agrupados. O modelo de efeito aleatorizado foi utilizado. O nível de significância utilizado foi de 5%.

O efeito do GSK2256294 no fluxo sanguíneo associado à bradicinina em estudo clínico de lesão pulmonar de pacientes fumantes também foi determinado (Figura 5). O fluxo sanguíneo foi avaliado nos estudos elegíveis com o uso de 300mg de bradicinina na presença ou ausência de GSK2256294. A relação entre os efeitos (fluxo sanguíneo sem GSK2256294 pelo fluxo sanguíneo com GSK2256294, ambos sob efeito de bradicinina). Foi possível observar uma modulação do fluxo sanguíneo, já nos indivíduos que não realizaram o uso de GSK2256294 o aumento foi em média 23% (IC = 1.01 a 1.45) do fluxo sanguíneo em relação aos indivíduos que não utilizaram o GSK2256294 (Figura 5).

Figura 5 - Efeito do GSK2256294 no fluxo sanguíneo associado à bradicinina em estudo clínico de lesão pulmonar de pacientes fumantes.



Nota: O efeito médio do GSK2256294 foi estabelecido após a determinação média da relação entre grupo controle (sem GSK2256294 com 300mg de bradicinina) e grupo tratado com GSK2256294 (mais 300mg de bradicinina). A sumarização foi realizada com o uso de modelo aleatorizado e os intervalos de confiança foram determinados. O nível de significância considerado foi de 5%.

6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A maior limitação do trabalho se dá em virtude ao baixo número de artigos que relacionados diretamente ao tema investigado recuperados nos bancos de dados.

7 DISCUSSÃO

Os ácidos epóxieicosatrienóico (EETs), produtos da epóxigenação do ácido araquidônico pelas enzimas do citocromo P450, exercem efeitos anti-inflamatórios. No entanto os EETs são metabolizados pela cicloxigenase (COX) e pela β -oxidação, mas majoritariamente são convertidos em dióis pela epóxido hidrolase solúvel (sEH). A inibição farmacológica das sEH inibe a inflamação quando reduz a expressão da molécula de adesão de células endoteliais induzida por citocinas e quimiocinas, assim prevenindo a adesão de leucócitos às paredes vasculares e tecidos por um mecanismo que envolve a inibição de NF-kB (NORWOOD *et al.*,2010; WANG *et al.*,2012).

Diante disso, Wang e colaboradores (2012) compararam em modelos experimentais a eficácia de diferentes tipos de inibidores da epóxido hidrolase solúveis (sEHI), como a do ácido sEHI t-TUCB (trans-4- {4- [3- (4-trifluorometoxi-fenil) -ureido] -ciclohexiloxi } -benzóico) e o inibidor da fosfodiesterase-4 (PDE4) para reduzir a lesão pulmonar e a inflamação após a exposição subaguda à fumaça de cigarro e nesses animais foi observada uma proporção de EETs / Dióis significativamente diminuída, o que implica na expressão da atividade da sEH.

Associado a esse fator, acredita-se que os tecidos e células do pulmão que expressam níveis elevados de sEH seriam mais suscetíveis à leukotoxina do que aqueles com níveis baixos da enzima que, por sua vez, estariam mais relacionados à leukotoxina-diol, sendo responsável pela toxicidade pulmonar (ZHENG *et al.*,2001).

Nos estudos de Balgoma e colaboradores (2016) foi avaliado aumento nos mediadores lipídicos da via CYP derivada do ácido linoleico, bem como produtos derivados do ácido araquidônico da tromboxano sintase e 5-LOX em fumantes com DPOC em estágio inicial em comparação com fumantes com função pulmonar normal. 94 mediadores lipídicos derivados das vias citocromo-P450 lipoxigenase e cicloxigenase foram analisados por cromatografia líquida-espectrometria de massa e os condutores mais fortes foram os produtos epóxidos derivados do citocromo P450 do ácido linoleico (leukotoxinas) e seus correspondentes produtos derivados da epóxido hidrolase solúvel (sEH) (leukotoxina-dióis). Sugerindo um mecanismo pelo qual o citocromo-P450 associado a células caliciformes e a atividade de sEH produzem níveis elevados de leukotoxina-diol, a qual desempenha papel putativo nas manifestações clínicas da DPOC em um subfenótipo de doença dominado por mulheres. Indo ao encontro aos dados coletados, referentes aos estudos clínicos (LAZAAR *et al.*,2016) e pré-clínicos (PODOLIN *et al.*,2013;) utilizando o GSK2256294, foi observado a redução da conversão do leukotoxina para o leukotoxina-diol em modelos experimentais e em humanos.

Com o intuito de realizar descobertas promissoras para o tratamento da inflamação pulmonar diversos estudos clínicos e pré-clínicos têm sido realizados, no entanto são necessários dados que expliquem os achados que incluem diferenças significativas entre os resultados nos níveis de inibição das sEH dos encontrados *in vitro* e *in vivo* (PODOLIN *et al.*,2013) e apenas *in vivo* (LAZAAR *et al.*,2016). Uma possível resposta é a registrada por Capozzi e colaboradores (2016) que mostraram diferentes desfechos dos efeitos relacionados à inibição de sEH, vez que os resultados *in vivo* foram significativamente melhores que os resultados *in vitro*.

Caso parecido ocorre em estudos pré-clínicos comparados aos estudos clínicos como nos dados de AN e colaboradores (2021) em que foi observado que, apesar da utilização de um sEHI ser segura na fase 1 do ensaio, não conseguiu mostrar um nível comercial de eficácia no ensaio de fase 2 em humanos, pois não mimetizou os bons efeitos apresentados em animais. O oposto demonstrado pelo GSK2256294, o qual apesar de uma pequena diferença entre os resultados interespecies, mostrou-se bastante positivo em humanos.

O tratamento da DPOC com compostos anti-inflamatórios permanece um desafio devido à complexidade da inflamação e comorbidades relacionadas. Atualmente, nenhuma terapia reverte efetivamente a doença, portanto minimizar sua progressão é uma estratégia terapêutica alternativa, sendo que a redução do estresse oxidativo e da inflamação pode melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida (RODRIGUES *et al.*,2021).

O estresse oxidativo como o gerado pela exposição da fumaça do tabaco é uma das principais causas da patogênese da DPOC, desencadeando apoptose, remodelação da matriz extracelular, inativação de inibidores de protease, secreção de muco, ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), ativação de proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), remodelação da cromatina e transcrição de gene pró-inflamatório (RODRIGUES *et al.*,2021).

Nesse sentido, os moduladores da cascata do ácido araquidônico tem sido foco de pesquisas para tratamentos de inflamação há décadas. Além dos conhecidos inibidores duplos de 5-lipoxigenase e ciclooxigenase-2, desenvolvimentos muito recentes são discutidos, especialmente, os inibidores de múltiplos alvos que interferem na via do citocromo P450 por meio da inibição da epóxido hidrolase solúvel, que parecem oferecer uma nova oportunidade para o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014; ONTKO *et al.*,2021).

Os estudos clínicos com inibidores de sEH são limitados. O inibidor seletivo de sEH AR9281 (Arete Pharmaceuticals) mostrou melhorar a função endotelial em modelos animais e também inibição da atividade enzimática e uma diminuição modesta nos dihidroxi lipídeos em

um estudo clínico em indivíduos saudáveis. Um estudo de fase 2 para avaliar os efeitos sobre a pressão arterial e o metabolismo da glicose em pacientes com hipertensão moderada e tolerância à glicose diminuída foi encerrado (NCT00847899). Outros inibidores de sEH (sEHI) foram testados em modelos animais de doença inflamatória para aumentar os níveis de EET / EDP e mitigar a inflamação (LAZAAR *et al.*,2016; ONTKO *et al.*,2021).

O GSK2256294 é um potente inibidor de forte ligação, mas reversível, de sEH. [Tendo se apresentado como um método terapêutico racional para elevar os níveis de epóxido e reduzir a inflamação. Utilizado em alguns estudos, demonstrou uma possível diminuição da expressão de citocinas, modulando as vias que convergem em transcrição dependente de NFκB (CAPOZZI *et al.*,2016; ONTKO *et al.*,2021) achado esse que corrobora no uso da droga como um potencial terapêutico nos casos de DPOC.

8 CONCLUSÃO

O GSK2256294 é capaz de reduzir em ambos os modelos de estudo, clínico e pré-clínico, a enzima epóxido hidrolase solúvel, mas com maior efetividade em estudos clínicos. Além disso, colabora na atividade anti-inflamatória tanto mediada pela via dos eicosatrienoicos, quanto pela redução de DHETS e Leukotoxina-diol; também auxilia no controle do fluxo sanguíneo. Contudo, o presente estudo demonstrou que o GSK2256294 é um fármaco promissor no controle das manifestações deletérias observadas na inflamação pulmonar, no entanto, devido ao baixo número de artigos recuperados nos bancos de dados, mais estudos são necessários para garantir firmeza das evidências e permitir desvendar outras rotas de atividades biológicas mediadas pelo GSK2256294.

REFERÊNCIAS

AGHASAFARI, P.; GEORGE, U.; PIDAPARTI, R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. **Inflammation Research**, v. 68, n. 1, p. 59–74, 1 jan. 2019.

AN, G., Lee, K.S.S., Yang, J. and Hammock, B.D. (2021), Target-Mediated Drug Disposition—A Class Effect of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors. **The Journal of Clinical Pharmacology**, 61: 531-537. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcph.1763>. Acesso em: 23 out. 2021.

ARANGO. Bioestatística Teórica e Computacional. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 3. ed. (17 julho 2009), 2009.

BAGDONAS, E. *et al.*, Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 10, p. 995–1013, 2 jun. 2015.

BALGOMA, D. *et al.*, Linoleic acid-derived lipid mediators increase in a female-dominated subphenotype of COPD. **European Respiratory Journal**, v. 47, n. 6, p. 1645–1656, 1 jun. 2016.

BANKS, E. *et al.*, Tobacco smoking and risk of 36 cardiovascular disease subtypes: fatal and non-fatal outcomes in a large prospective Australian study. **BMC Medicine**, v. 17, n. 1, p. 128, 3 jul. 2019.

BARNES, P. J. Inflammatory endotypes in COPD. **Allergy**, v. 74, n. 7, p. 1249–1256, 2019.

BEDNAREK, D. *et al.*, The effect of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs on the cellular immunity of calves with experimentally-induced local lung inflammation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, n. 1, p. 1–15, 1 out. 1999.

BELYANSKAYA, S. L., Ding, Y., Callahan, J. F., Lazaar, A. L., & Israel, D. I. (2017). Discovering Drugs with DNA-Encoded Library Technology: From Concept to Clinic with an Inhibitor of Soluble Epoxide Hydrolase. **ChemBioChem**, 18(9), 837–842. doi:10.1002/cbic.201700014.

BU, T.; WANG, L. F.; YIN, Y. Q. How Do Innate Immune Cells Contribute to Airway Remodeling in COPD Progression? **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 15, p. 107–116, 10 jan. 2020.

BZÓWKA, M. *et al.*, Computational insights into the known inhibitors of human soluble epoxide hydrolase. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 8, p. 1914–1921, 1 ago. 2021.

CAPOZZI, M. E. *et al.*, Epoxygenated Fatty Acids Inhibit Retinal Vascular Inflammation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 39211, 14 dez. 2016.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 75, n. 1, p. 50–83, mar. 2011.

CASTELINO, F. V. Lipids and eicosanoids in fibrosis: emerging targets for therapy. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 649–655, nov. 2012.

CELEJEWSKA-WÓJCIK, N. *et al.*, <p>Eicosanoids and Eosinophilic Inflammation of Airways in Stable COPD</p>. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 16, p. 1415–1424, 25 maio 2021.

CHAN, S. M. H. *et al.*, Pathobiological mechanisms underlying metabolic syndrome (MetS) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): clinical significance and therapeutic strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 198, p. 160–188, jun. 2019.

Chan, S. M. H., Selemidis, S., Bozinovski, S., & Vlahos, R. (2019). **Pathobiological mechanisms underlying metabolic syndrome (MetS) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): clinical significance and therapeutic strategies**. *Pharmacology & therapeutics*, 198, 160–188.

DING, Y. *et al.*, Discovery of soluble epoxide hydrolase inhibitors through DNAencoded library technology (ELT). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 116216, 1 jul. 2021.

Diseases in Nepal: Evidence from a Nationally Representative Population-Based Study</p>. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 16, p. 1109–1118, 20 abr. 2021.

FERRERA, M. C.; LABAKI, W. W.; HAN, M. K. Advances in Chronic Obstructive. **Annu Rev Med**. 2021 Jan 27;72:119-134.

FORSSLUND, H. *et al.*, Gender differences in the T-cell profiles of the airways in COPD patients associated with clinical phenotypes. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 12, p. 35–48, 20 dez. 2016.

FREEMAN, C. M.; CURTIS, J. L. Lung Dendritic Cells: Shaping Immune Responses throughout Chronic Obstructive Pulmonary Disease Progression. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 56, n. 2, p. 152–159, fev. 2017.

Grey matters: a practical tool for searching health-related grey literature [Internet]. Ottawa: CADTH; 2018. Available from: <https://www.cadth.ca/resources/finding-evidence>.

HAEGGSTROM JZ, RINALDO-MATTHIS A, WHEELLOCK CE, WETTERHOLM A. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. **Biochem Biophys Res Commun**.2010;396(1):135-9.

HARRIS, T. R. *et al.*, Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates hepatic fibrosis and endoplasmic reticulum stress induced by carbon tetrachloride in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 286, n. 2, p. 102–111, 15 jul. 2015.

HIGGINS, J. P. T.; THOMPSON, S. G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. **Statistics in Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1539–1558, 2002.

HOOIJMANS, C. R. *et al.*, SYRCLE’s risk of bias tool for animal studies. **BMC medical research methodology**, v. 14, p. 43, 26 mar. 2014.

IMIG JD. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. **Physiol Rev.** 2012;92(1):101-30.

IMIG, J. D. Epoxyeicosanoids in Hypertension. **Physiological research**, v. 68, n. 5, p. 695–704, 25 out. 2019.

IYER, A. *et al.*, Pharmacological Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase Ameliorates Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. e758614, 10 out. 2011.

JASPER, A. E. *et al.*, Understanding the role of neutrophils in chronic inflammatory airway disease. **F1000Research**, v. 8, p. F1000 Faculty Rev-557, 2019.

Karki KB, Poudyal A, Shrestha N, *et al.*, Factors Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Diseases in Nepal: Evidence from a Nationally Representative Population-Based Study. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.** 2021;16:1109-1118.

KIM, H. S. *et al.*, The arachidonic acid metabolite 11,12-epoxyeicosatrienoic acid alleviates pulmonary fibrosis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 53, n. 5, p. 864–874, 14 maio 2021.

KODANI, S. D.; HAMMOCK, B. D. The 2014 Bernard B. Brodie Award Lecture— Epoxide Hydrolases: Drug Metabolism to Therapeutics for Chronic Pain. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 5, p. 788–802, maio 2015.

LAZAAR, A. L. *et al.*, Pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse event profile of GSK2256294, a novel soluble epoxide hydrolase inhibitor. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 81, n. 5, p. 971–979, maio 2016.

LEE, J.; TANEJA, V.; VASSALLO, R. Cigarette Smoking and Inflammation. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 2, p. 142–149, fev. 2012.

LIANG, Y. *et al.*, Therapeutic potential and mechanism of *Dendrobium officinale* polysaccharides on cigarette smoke-induced airway inflammation in rat. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112101, 1 nov. 2021.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A. *et al.*, Formaldehyde induces lung inflammation by an oxidant and antioxidant enzymes mediated mechanism in the lung tissue. **Toxicology Letters**, v. 207, n. 3, p. 278–285, 15 dez. 2011.

LITTELL, J. H.; CORCORAN, J.; PILLAI, V. **Systematic Reviews and Meta-Analysis**. New York: Oxford University Press, 2008.

Liu, J., Chen, S. J., Hsu, S. W., Zhang, J., Li, J. M., Yang, D. C., Gu, S., Pinkerton, K. E., & Chen, C. H. (2021). MARCKS cooperates with NKAP to activate NF-κB signaling in smoke-related lung cancer. **Theranostics**, 11(9), 4122–4136.

LUGG, S. T. *et al.*, Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease. **Thorax**, v. 77, n. 1, p. 94–101, 1 jan. 2022.

MADANI, A. *et al.*, Immune-regulating effects of exercise on cigarette smoke-induced inflammation. **Journal of Inflammation Research**, v. 11, p. 155–167, 24 abr. 2018.

MARNETT LJ. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annu Ver Pharmacol Toxicol.* 2009;49:265-90.

MEIRER, K.; STEINHILBER, D.; PROSCHAK, E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: interfering with multiple pathways. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 83–91, jan. 2014.

Moldoveanu, B., Otmishi, P., Jani, P., Walker, J., Sarmiento, X., Guardiola, J., Saad, M., & Yu, J. (2009). Inflammatory mechanisms in the lung. **Journal of inflammation research**, 2, 1–11.

Montero, P.; Milara, J.; Roger, I.; Cortijo, J. Role of JAK/STAT in Interstitial Lung Diseases; Molecular and Cellular Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6211.

MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 37–58, 2013.

Mortaz, E., Folkerts, G., & Redegeld, F. (2011). Mast cells and COPD. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, 24(4), 367–372.

NORWOOD, S. *et al.*, Epoxyeicosatrienoic acids and soluble epoxide hydrolase: potential therapeutic targets for inflammation and its induced carcinogenesis. **American Journal of Translational Research**, v. 2, n. 4, p. 447–457, 22 jul. 2010.

ONTKO, C. D. *et al.*, Cytochrome P450-epoxygenated fatty acids inhibit Müller glial inflammation. **Scientific Reports**, v. 11, p. 9677, 6 maio 2021.

PAGE, M. J. *et al.*, The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **BMJ**, v. 372, p. n71, 29 mar. 2021.

Peters, M., Peters, K., & Bufe, A. (2019). **Regulation of lung immunity by dendritic cells: Implications for asthma, chronic obstructive pulmonary disease and infectious disease.** *Innate immunity*, 25(6), 326–336.

Poto, R.; Loffredo, S.; Palestra, F.; Marone, G.; Patella, V.; Varricchi, G. Angiogenesis, Lymphangiogenesis, and Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Few Certainties and Many Outstanding Questions. **Cells** 2022, 11, 1720.

Rahman I. (2006). Antioxidant therapies in COPD. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, 1(1), 15–29.

Rand, A. A., Rajamani, A., Kodani, S. D., Harris, T. R., Schlatt, L., Barnych, B., Passerini, A. G., & Hammock, B. D. (2019). Epoxyeicosatrienoic acid (EET)-stimulated angiogenesis is mediated by epoxy hydroxyeicosatrienoic acids (EHETs) formed from COX-2. **Journal of lipid research**, 60(12), 1996–2005.

- REITSMA, M. B. *et al.*, Spatial, temporal, and demographic patterns in prevalence of smoking tobacco use and attributable disease burden in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 397, n. 10292, p. 2337–2360, 19 jun. 2021.
- RODRIGUES, S. DE O. *et al.*, Mechanisms, Pathophysiology and Currently Proposed Treatments of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Pharmaceuticals** (Basel, Switzerland), v. 14, n. 10, p. 979, 26 set. 2021.
- Roger, I.; Milara, J.; Montero, P.; Cortijo, J. The Role of JAK/STAT Molecular Pathway in Vascular Remodeling Associated with Pulmonary Hypertension. **Int. J. Mol. Sci.** 2021, 22, 4980.
- SALEK-ARDAKANI, S. *et al.*, Differential Regulation of Th2 and Th1 Lung Inflammatory Responses by Protein Kinase C θ . **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 10, p. 6440–6447, 15 nov. 2004.
- Sasso, O., Wagner, K., Morisseau, C., Inceoglu, B., Hammock, B. D., & Piomelli, D. (2015). Peripheral FAAH and soluble epoxide hydrolase inhibitors are synergistically antinociceptive. **Pharmacological research**, 97, 7–15.
- SEGAL, L. N. *et al.*, Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 1–11, 4 abr. 2016.
- Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N. Novel anti-inflammatory--pro-resolving mediators and their receptors. **Curr Top Med Chem.** 2011;11(6):629-47.
- Spector, A. A., & Norris, A. W. (2007). Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. **American journal of physiology. Cell physiology**, 292(3), C996–C1012.
- STERNE, J. A. C. *et al.*, RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 366, p. 14898, 28 ago. 2019.
- Strzelak, A., Ratajczak, A., Adamiec, A., & Feleszko, W. (2018). Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. **International journal of environmental research and public health**, 15(5), 1033.
- Sudhahar, V., Shaw, S., & Imig, J. D. (2010). Epoxyeicosatrienoic acid analogs and vascular function. **Current medicinal chemistry**, 17(12), 1181–1190.
- Theodorakopoulou, M. P., Alexandrou, M. E., Bakaloudi, D. R., Pitsiou, G., Stanopoulos, I., Kontakiotis, T., & Boutou, A. K. (2021). Endothelial dysfunction in COPD: a systematic review and meta-analysis of studies using different functional assessment methods. **ERJ open research**, 7(2), 00983-2020.
- Trindade-da-Silva, C. A., Clemente-Napimoga, J. T., Abdalla, H. B., Rosa, S. M., Ueira-Vieira, C., Morisseau, C., Verri, W. A., Jr, Montalli, V. A. M., Hammock, B. D., & Napimoga, M. H. (2020). Soluble epoxide hydrolase inhibitor, TPPU, increases regulatory T

cells pathway in an arthritis model. **FASEB journal**: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 34(7), 9074–9086.

Tripathi, N., Paliwal, S., Sharma, S., Verma, K., Gururani, R., Tiwari, A., Verma, A., Chauhan, M., Singh, A., Kumar, D., & Pant, A. (2018). Discovery of Novel Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors as Potent Vasodilators. **Scientific reports**, 8(1), 14604.

van der Vliet A. (2008). NADPH oxidases in lung biology and pathology: host defense enzymes, and more. **Free radical biology & medicine**, 44(6), 938–955.

VIECHTBAUER, W. Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package. **Journal of Statistical Software**, v. 36, p. 1–48, 5 ago. 2010.

WANG, L. *et al.*, Use of a Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor in Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 46, n. 5, p. 614–622, 1 maio 2012.

Williams, J. M., Murphy, S., Burke, M., & Roman, R. J. (2010). 20-hydroxyeicosatetraenoic acid: a new target for the treatment of hypertension. **Journal of cardiovascular pharmacology**, 56(4), 336–344.

Wong, J., Magun, B. E., & Wood, L. J. (2016). Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, 11, 1391–1401.

Yang L, Cheriyan J, Gutterman DD, *et al.*, Mechanisms of Vascular Dysfunction in COPD and Effects of a Novel Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor in Smokers. **Chest**. 2017;151(3):555-563.

ZHENG, J. *et al.*, Leukotoxin-diol: a putative toxic mediator involved in acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 434–438, out. 2001.

ANEXO A - Avaliação da qualidade metodológica do ensaio clínico elegíveis (Robbis 2)

ESTUDO – CRUZADO E RANDOMIZADO

Categorias	Aili L. Lazaar, 2016	Lucy Yang, 2017
	Domínio 1	algumas preocupações
Domínio 2	algumas preocupações	Baixo risco
Domínio 3	Baixo risco	algumas preocupações
Domínio 4	Baixo risco	Baixo risco
Domínio 5	Baixo risco	Baixo risco
Classificação	algumas preocupações	algumas preocupações

ANEXO B - Avaliação da qualidade metodológica do estudo pré-clínico elegível (Syrclé)

Estudo - Categorias pré-clínicas

Patricia L. Podolin, 2013

Domínio 1	1
Domínio 2	0.5; 0.5 e 1
Domínio 3	0
Domínio 4	e 1
Domínio 5	0.5
Domínio 6	0
Domínio 7	0
Domínio 8	1; 0.5; 1 e 1
Domínio 9	0.5 e 1
Domínio 10	1; 0.5; 1. 0 e 1

Classificação Moderado risco de viés

Classificação: 0- Alto risco de viés; 0.5- moderado risco de viés; 1- Baixo risco de viés.

ANEXO C - Comprovante de submissão

05/01/2023 03:44

Email – Wellington Francisco Rodrigues – Outlook

[IJMS] Manuscript ID: ijms-2174999 - Submission Received

Editorial Office <ijms@mdpi.com>

Qui, 05/01/2023 03:36

Para: Wellington Rodrigues <wellington.frodrigues@hotmail.com>

Cc: Alberto Gabriel Borges Felipe <albertogabrielborges@gmail.com>; Ana Paula Lazarin Bernardes <anapaulalazarin@academico.unifimes.edu.br>; Rodrigo Perissinotto <perissinotto@unifimes.edu.br>; Jamil Miguel-Neto <jamil.mn@hotmail.com>; Wellington Francisco Rodrigues <pos-doc.wellingtonrodrigues@uftm.edu.br>; Carlo Jose Freire Oliveira <carlo.oliveira@uftm.edu.br>

Dear Dr. Rodrigues,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: International Journal of Molecular Sciences

Manuscript ID: ijms-2174999

Type of manuscript: Systematic Review

Title: Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors are Promising in Preclinical and

Clinical Studies on Smoking-Mediated Inflammatory Lung Diseases and Chronic

Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review with Meta-Analysis

Authors: Alberto Gabriel Borges Felipe, Ana Paula Lazarin Bernardes, Rodrigo

Perissinotto, Jamil Miguel-Neto, Wellington Francisco Rodrigues *, Carlo Jose

Freire Oliveira

Received: 5

January 2023 E-mails:

albertogabrielborges@gmail.com, anapaulalazarin@academico.unifimes.edu.br, perissinotto@unifimes.edu.br, jamil.mn@hotmail.com,

pos-doc.wellingtonrodrigues@uftm.edu.br,

carlo.oliveira@uftm.edu.br Submitted to section: Molecular Pathology, Diagnostics, and Therapeutics,

https://www.mdpi.com/journal/ijms/sections/Pathology_Diagnostics_Therapeutics New Advance on Inflammation and Repair in Respiratory Diseases

https://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/6MG1C12XUH

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/63824a4e57e23aa47d5d4bc945bbe9fd

The following points were confirmed during submission:

1. IJMS is an open access journal with publishing fees of 2500 CHF for an accepted paper (see <https://www.mdpi.com/about/apc/> for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (<https://www.mdpi.com/journal/ijms/apc>). See <https://www.mdpi.com/about/openaccess> for more information about open access publishing.

<https://outlook.live.com/mail/0/inbox/id/AQMkADAwATYwMAItYTU2Yi00MWMwLTAwAi0wMAoARgAAA6prlwnwNHIGtIUgLF9qGKcHANPxngNdC...> 1/2 05/01/2023 03:44 Email – Wellington Francisco Rodrigues – Outlook

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously received a discount code or if your institute is participating in the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP), for more information see <https://www.mdpi.com/about/ioap>. If you have been granted any other special discounts for your submission, please contact the IJMS editorial office.

2. I understand that:

a. If previously published material is reproduced in my manuscript, I will provide proof that I have obtained the necessary copyright permission.

(Please refer to the Rights & Permissions website: <https://www.mdpi.com/authors/rights>).

b. My manuscript is submitted on the understanding that it has not been published in or submitted to another peer-reviewed journal. Exceptions to this rule are papers containing material disclosed at conferences. I confirm that I will inform the journal editorial office if this is the case for my manuscript. I confirm that all authors are familiar with and agree with submission of the contents of the manuscript. The journal editorial office reserves the right to contact all authors to confirm this in case of doubt. I will provide email addresses for all authors and an institutional e-mail address for at least one of the co-authors, and specify the name, address and e-mail for invoicing purposes.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the IJMS editorial office at ijms@mdpi.com

Kind regards,
IJMS Editorial Office
St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Switzerland
E-Mail: ijms@mdpi.com
Tel. +41 61 683 77 34
Fax: +41 61 302 89 18

*** This is an automatically generated email ***

ANEXO D - Artigo submetido



Article

Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors are Promising in Preclinical and Clinical Studies on Smoking-Mediated Inflammatory Lung Diseases and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review with Meta-AnalysisAlberto Felipe ^{1†}, Camila B Miguel ^{1,2†}, Ana Bernardes ^{2†}, Rodrigo Perissinotto ², Carlos A Trindade-da-Silva ³, Melissa C Martins-de-Abreu ², Jamil Miguel-Neto ², and Wellington F Rodrigues ^{1,4*}, Carlo Oliveira ^{1,4},¹ Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Brazil.² Course of Medicine at University Center of Mineiros, Brazil.³ Institute and Research Center São Leopoldo Mandic, São Leopoldo Mandic Faculty, Brazil.⁴ Postgraduate Program in Tropical Medicine and Infectious Diseases, Federal University of Triângulo Mineiro, Brazil.

* Correspondence: wellingtonrodrigues@uftm.edu.br; Tel.: +55 034 99630-9185

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Evaluating the inflammatory enzymatic interactions related to pulmonary function collaborates to generate intervention indicators or prophylactic measures that improve patient prognosis. This study aimed to evaluate discrepancies between the effects of epoxide hydrolase inhibition by GSK2256294 in different models of pulmonary inflammation. We performed a secondary study in the scientific databases Medline/PubMed, Web of Science, SciELO, Cochrane Library, Embase, Academic Google, and gray literature. Two independent reviewers performed the searches of records published. The methodological quality and consistency of the evidence were analyzed. Different variables were compared by meta-analysis. We found 86 studies from different study bases, of which 4 were selected from the gray literature. After applying the eligibility criteria, 3 studies were classified and evaluated. Results showed that GSK2256294 reduced the soluble epoxide hydrolase enzyme in clinical and preclinical study models, with greater effectiveness in clinical studies, and contributed to anti-inflammatory activity mediated by the eicosatrienoic pathway by reducing dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETS) and Leukotoxin-diol. Our study demonstrated that GSK2256294 is a promising drug for controlling deleterious manifestations observed in lung inflammation. Further studies are needed to ensure the consistency of evidence and unravel other biological activities mediated by GSK2256294 in clinical and preclinical studies.

Keywords: enzymes; lung function; inflammation; clinical study; preclinical study.**Citation:** To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Smoking is a risk factor associated with chronic diseases related to cerebrovascular disease (CVA), malignant neoplasms of the lungs, mouth, larynx, pharynx, acute coronary disease (angina and infarction), and chronic obstructive pulmonary disease. Globally, tobacco causes more than seven million deaths per year. In addition to smoking, several pathophysiological changes are associated with inflammatory lung diseases, including central obesity and metabolic syndromes [1], leading to chronic inflammation and endothelial dysfunction [2].

Inflammatory lung diseases have several modulation pathways, including T-helper type 2 (Th2) responses, observed in hypersensitivity-mediated diseases and several other Th1, Th17, and Th22 profiles, with the participation of adaptive and innate immune cells [3,4,5]. Although primary factors initiate the diseases, different responses are mediated by distinct enzymatic activities [6,7].

In inflammatory lung diseases, airflow limitation caused by the inflammatory response to inhaled toxins, often cigarette smoke, results in oxidative stress, chronic hypoxia, arterial stiffness, endothelial dysfunction, an imbalance between vasodilator and vasoconstrictor substances, alterations in the levels of pro-inflammatory cytokines, inflammation, and senescence of endothelial cell factors. Therefore, techniques such as venous occlusion plethysmography, forearm flow-mediated dilation, and biomarkers have been used to assess endothelial and peripheral function in individuals with pulmonary inflammation [8] and the consequent alteration of the pulmonary vascular endothelium.

Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) are hyperpolarizing factors derived from the endothelium, resulting from arachidonic acid metabolism by cytochrome P450 epoxygenases [9], which are factors that control vasomotor tone [10], inhibit the nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway activation by modulating potassium channels, and have anti-apoptotic effects on endothelial cells and anti-inflammatory properties [11,12]. In plants and animals, epoxide hydrolases convert epoxide diols into diols by hydrolysis. In mammals, soluble epoxide hydrolase (sEH) is responsible for arachidonic acid metabolism derivatives, the EETs. sEH converts EETs into dihydroxy eicosatrienoic acids (DHETs) [13].

Increased sEH activity may represent more advanced inflammation as observed to obese patients and smokers with coronary artery disease, where the concentrations exhibit a lowest EET/DHET ratio [2]. EETs are also produced in lung epithelial cells; patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) may experience loss of function [2,14].

GSK2256294 is a potent and selective sEH inhibitor discovered by DNA-encoded Chemical Libraries technology based on a combinatorial mixture of oligonucleotides [15]. GSK2256294 has been tested in preclinical and randomized clinical trials, potentially affecting pulmonary and systemic endothelial function [13] and attenuating pulmonary inflammation caused by cigarette smoke. The inhibition of sEH prevents the initiation and maintenance of the pulmonary inflammatory response and promotes its resolution [2,16,17]. Strategies for enzymatic inhibition to control inflammatory diseases include using steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs [18,19].

Evidence on the activity of GSK2256294 in the inhibition and resolution of the pulmonary inflammatory response has been raised [2,16,17]. Evaluation in an experimental model indicated that the inhibition of sEH and TSEs is regulated, attenuating inflammation and emphysema secondary to smoking with an improvement of metabolic syndrome and pulmonary function [20]. Strategies to inhibit enzymes that promote inflammation and tissue damage are already widely used, such as anti-inflammatories [19]. However, studies on biomolecules with greater selectivity and efficacy are still necessary. Therefore, this study aimed to evaluate the effectiveness of GSK2256294 and the discrepancies between the effects of epoxide hydrolase inhibition by GSK2256294 in different models of pulmonary inflammation.

2. Results