



**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Curso de Graduação em Farmácia**

**Efeito relaxante de derivados *N*-sulfonilidrazônicos do rolipram
em traqueia de cobaia: investigação do mecanismo de ação do
LASSBio-1846**

Millena de Melo Medeiros

**João Pessoa–PB
2015**

Millena de Melo Medeiros

Efeito relaxante de derivados *N*-sulfonilidrazônicos do rolipram em traqueia de cobaia: investigação do mecanismo de ação do LASSBio-1846

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de **Bacharel em Farmácia**.

Orientadora:

Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

Colaboradores:

Prof. Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro (UFRJ)

Profa. Dra. Lídia Moreira Lima (UFRJ)

**João Pessoa/PB
2015**

M488e Medeiros, Millena de Melo.

Efeito relaxante de derivados N-sulfonilidrazônicos do rolipram em traqueia de cobaia: investigação do mecanismo de ação do LASSBio-1846 / Millena de Melo Medeiros. -- João Pessoa: [s.n.], 2015.

90f.: il. -

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva.

Colaboradores: Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro.

Lídia Moreira Lima.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Derivados do rolipram. 2. PKA. 3. Traqueia de cobaia.
4. Atividade relaxante. Fosfodiesterases.

BS/CCS/UFPB

CDU: 615.3(043.2)

Millena de Melo Medeiros

Efeito relaxante de derivados *N*-sulfonilidrazônicos do rolipram em traqueia de cobaia: investigação do mecanismo de ação do LASSBio-1846

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de **Bacharel em Farmácia**.

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora

**Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**

**Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora**

**Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador**

Dedicatórias

Aos meus amores, meus pais, Eraldo Medeiros de Almeida e Neuma Almeida de Melo. A vocês, agradeço imensamente pelo amor e pela dedicação, pela boa educação, por todos os valores transmitidos, mesmo na simplicidade, que me fizeram ser esta pessoa que sou. Sem vocês, nada seria.

À minha irmã Natália de Melo Medeiros, meu muito obrigado pelas palavras de apoio nos momentos difíceis, pelas risadas nos momentos de alegria, pelo amor e companheirismo ao longo dos anos.

À Edgard Barbosa Moreira Júnior, que além de namorado é amigo e companheiro de todas as horas. Obrigado pelo apoio, incentivo, atenção e paciência em todas as realizações dos meus sonhos e objetivos.

Aos meus avós Rafael José de Melo e Maria Almeida de Melo, por simplesmente me amarem de uma forma incondicional e inexplicável.

A vocês dedico.

Agradecimientos

GRATIDÃO! Esse é o sentimento que me vem no coração ao final dessa etapa da minha vida. Tantas foram as pessoas que contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Por isso hoje agradeço:

A Deus, que sempre esteve comigo. Quando as coisas pareciam que não dariam certo, Ele sempre me sustentou e me fez acreditar que tudo acabaria bem!

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, minha orientadora. Pelo exemplo de profissional, pelos grandes ensinamentos transmitidos dentro e fora das salas de aula. Pelo acolhimento em seu laboratório, pela confiança e oportunidade dada através da Iniciação Científica.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante pela dedicação, disponibilidade e colaboração na confecção deste trabalho.

Aos Professores Doutores Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro e Lídia Moreira Lima, pela gentileza em ceder a substância para o objeto de estudo deste trabalho.

Aos Professores Doutores Robson Cavalcante Veras e Bárbara Viviana de Oliveira Santos por aceitarem participar desta importante etapa na minha formação e pelas contribuições a este trabalho, assim como a Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves, por aceitar à suplência e pelas contribuições ao trabalho escrito.

A todos os Professores do Curso de Graduação em Farmácia, em especial a: Adalberto Coelho, Alba Caiaffo, Bagnólia Araújo, Francisca Inês, João Vianney, Leônia Batista e Zélia Braz que quando simplesmente deveriam ser professores, foram mestres, transmitindo seus conhecimentos e experiências e que, quando mestres, foram amigos, sempre inspirando e incentivando.

A todos os colegas e amigos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do CCS/UFPB, entre eles: Alana Cristina Costa, Aline de Freitas Brito, Ana Caroline de Lima Silva, Bárbara Cavalcanti, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Giuliana Amanda de Oliveira, Giulyane Targino Aires Moreno, Iara Leão Luna de Souza, Indyra Duarte Alencar Figueiredo, José Lucas Ferreira Marques Galvão, Kimã Barbosa Meira, Layanne Cabral da Cunha Araújo, Luiz Henrique César Vasconcelos, Maria da Conceição Correia Silva, Renata de Souza Sampaio, Sarah Rebeca Dantas Ferreira pela ajuda, amizade e convivência. Em especial, à Italo Rossi Roseno Martins, Joedna Cavalcante Pereira

e Paula Benvindo Ferreira por toda ajuda na realização desse trabalho, apoio científico e de bancada.

A todos os amigos da eterna turma: “2010.2”, pela amizade e companheirismo durante esses 5 anos. Pela boa convivência, pelos momentos de descontração, pelas conversas e brincadeiras na espera das aulas, pelos conhecimentos compartilhados e materiais cedidos para as diversas xerox. A amizade de muitos de vocês irei levar pra sempre, em especial: Adrielle Severo, Daiane Farias, Josymara Trajano, Lays Cristina, Leonardo Saldanha, Richard Couras, Rodrigo Formiga, Stephane Flaviane e Thércio Rosas.

Aos funcionários da Coordenação e do Departamento de Farmácia, Odaíza Nunes, Evandro Matos e Newton Marinho, em especial Odaíza pela dedicação e compromisso.

Aos técnicos de laboratório Maria de Fátima Carvalho, Renata Medeiros e Uytacira Veloso, pela ajuda e ensinamentos durante as aulas.

Ao José Crispim Duarte pela competência e auxílio técnico nos mais variados problemas no laboratório e no biotério.

Ao Luís Cordeiro e ao Adriano Cordeiro pela colaboração no biotério e no laboratório, por sua prestatividade e dedicação.

À Mônica Rodrigues por sua alegria, bom humor, por manter nosso ambiente de trabalho/estudo sempre melhor para nossas tarefas diárias.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição responsável por minha formação profissional.

A toda minha família, tias, tios, primos e primas que sempre torceram pela realização de mais essa etapa.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Muito obrigada,

Millena de Melo Medeiros

Resumo

Visando contribuir com o desenvolvimento de novos medicamentos para tratar os sintomas de doenças das vias respiratórias foram sintetizados novos inibidores da PDE4 a partir do protótipo rolipram. Os novos derivados *N*-sulfonilidrazônicos só haviam sido testados em ensaios enzimáticos *in vitro*. Visando investigar os efeitos desses derivados em condições fisiológicas, escolheu-se a traqueia isolada de cobaia como modelo. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar um possível efeito relaxante de uma nova série de derivados do rolipram, inibidor de PDE4, bem como investigar o mecanismo de ação do derivado mais potente. Para tanto, dos cobaias foi isolada a traqueia, segmentada em anéis e conectada a um sistema de aquisição digital para obtenção dos dados. Inicialmente, realizou-se uma triagem farmacológica com 5 derivados (LASSBio-1846, 1847, 1848, 1849 e 1851). Todos os derivados relaxaram a traqueia de cobaia pré-contraída com carbacol, na presença ($pD_2 = 5,34 \pm 0,04$; $4,83 \pm 0,02$; $4,51 \pm 0,03$; $4,20 \pm 0,08$ e $4,70 \pm 0,06$, respectivamente) ou ausência de epitélio funcional ($pD_2 = 5,15 \pm 0,08$; $4,78 \pm 0,04$; $4,44 \pm 0,03$; $4,10 \pm 0,07$ e $4,85 \pm 0,08$, respectivamente). De acordo com esses valores, constatou-se que o LASSBio-1846 foi o mais potente, sendo este selecionado para a investigação do mecanismo de ação, em nível funcional. Tendo em vista a grande expressão dos receptores adrenérgicos- β_2 no músculo liso das vias aéreas, utilizou-se o propranolol, um bloqueador adrenérgico- β não seletivo para avaliar a participação desses receptores. Observou-se que houve desvio da curva de relaxamento do LASSBio-1846 para a direita ($pD_2 = 5,13 \pm 0,07$) com redução da potência em 1,7 vezes na presença do bloqueador, sugerindo a participação desse receptor no mecanismo de ação relaxante do derivado. A ativação de receptores adrenérgicos- β_2 leva a ativação da adenilil ciclase (AC). Com isso, decidiu-se investigar se essa enzima estaria envolvida no efeito relaxante do LASSBio-1846. Para tanto, utilizou-se a forskolina, um ativador de AC e evidenciou-se que a curva de relaxamento da forskolina na presença do derivado ($pD_2 = 6,46 \pm 0,05$) foi deslocada para a esquerda ($pD_2 = 7,56 \pm 0,12$), em cerca de 11 vezes, indicando potencialização do seu efeito, mostrando que o LASSBio-1846 poderia favorecer a ativação da AC. A ativação dessa enzima culmina com o aumento de cAMP, um importante nucleotídeo envolvido no relaxamento das vias aéreas e os níveis de cAMP são regulados pelas PDEs. Para avaliar o envolvimento dessas enzimas, utilizou-se aminofilina, um inibidor não seletivo de PDEs. A curva-concentração resposta à aminofilina ($pD_2 = 4,17 \pm 0,07$) foi desviada para a esquerda na presença do LASSBio-1846 ($pD_2 = 6,61 \pm 0,07$) com potencialização do efeito da aminofilina em aproximadamente 255 vezes, sugerindo que o efeito deste composto se dá por uma inibição de PDEs. O aumento de cAMP favorece a ativação de PKA, a proteína cinase efetora dessa via de relaxamento no músculo liso. A curva de relaxamento do LASSBio-1846 foi atenuada em 3 vezes na presença de H-89 ($pD_2 = 4,83 \pm 0,04$) um inibidor de PKA, sugerindo a participação dessa proteína. Sendo assim, pode-se sugerir que o LASSBio-1846 está ativando a via AC/cAMP/PKA para promover seu efeito relaxante em traqueia. Com base nesses dados, sugere-se que os derivados *N*-sulfonilidrazônicos avaliados possuem atividade relaxante em traqueia de cobaia de forma independente de epitélio, sendo o LASSBio-1846 o mais potente em relaxar esse órgão por inibir as PDEs e modular positivamente a via de transdução receptor β -AC-PKA.

Palavras-chave: derivados do rolipram. PKA. Traqueia de cobaia. Atividade relaxante. Fosfodiesterases.

Abstract

To contribute in development of new drugs to treat the symptoms of airway diseases were synthesized new PDE4 inhibitors from rolipram. The new *N*-sulfonilhidrazone derivatives had been only tested on *in vitro* enzymatic assays. To investigate their effects on physiological conditions, the guinea-pig trachea model was selected. Thus, the present study aimed to assess a possible relaxant action of a new series from rolipram, a PDE4 inhibitor, as well as elucidate the mechanism of action of the more potent derivative. Therefore, from guinea-pigs was isolated the trachea, sectioned into rings and connected to a digital acquisition system to obtain the data. Initially, a pharmacological screening was carried out with 5 derivatives (LASSBio-1846, 1847, 1848, 1849 and 1851). All compounds relaxed the guinea-pig trachea pre-contracted with carbachol in the presence ($pD_2 = 5.34 \pm 0.04$; 4.83 ± 0.02 ; 4.51 ± 0.03 ; 4.20 ± 0.08 e 4.70 ± 0.06 , respectively) or absence of functional epithelium ($pD_2 = 5.15 \pm 0.08$; 4.78 ± 0.04 ; 4.44 ± 0.03 ; 4.10 ± 0.07 e 4.85 ± 0.08 , respectively). According to the pD_2 values, LASSBio-1846 was the most potent derivative and, so, selected to the investigation of its mechanism of action, at functional level. Since, the β_2 -adrenergic receptor on airway smooth muscle, we used propranolol, a non-selective β -adrenergic blocker, to assess the participation of these receptors. The relaxation curve of LASSBio-1846 was shifted to the right ($pD_2 = 5.13 \pm 0.07$) with reduction of 1.7 folds on blocker presence, suggesting a participation of β_2 -adrenergic receptor on derivative induced relaxation. The β_2 -adrenergic receptor leads to an adenylyl cyclase (AC) activation, so we decided to evaluate its participation on LASSBio-1846 relaxation. Therefore, we used forskolin, an AC direct activator, and observed that the relaxation curve of forskolin ($pD_2 = 6.46 \pm 0.05$) was shifted to the left ($pD_2 = 7.56 \pm 0.12$) in the derivative presence, around 11 folds, indicating a potentiation of this effect and suggesting that LASSBio-1846 could favor the activation of AC. The AC activation leads to intracellular increase of cAMP, an important nucleotide involved on airway relaxation and cAMP levels are regulated to PDEs. To evaluate its participation, aminophylline, a non-selective PDEs inhibitor, was used. The concentration-curve response to aminophylline ($pD_2 = 4.17 \pm 0.07$) was shifted to the left in the presence of LASSBio-1846 ($pD_2 = 6.61 \pm 0.07$) with potentiation of this effect, around 255 folds, showing a PDEs inhibition. An elevation of cAMP leads to a PKA activation, the kinase protein effector of this relaxation pathway on smooth muscle. The LASSBio-1846 relaxation curve was shifted to the right, 3 folds, in the presence of H-89 ($pD_2 = 4.83 \pm 0.04$), a PKA inhibitor, suggesting the participation of this protein. Thus, LASSBio-1846 could be activating AC/cAMP/PKA pathway to promote airway smooth muscle relaxation. According to the data, the evaluated *N*-sulfonilhidrazone derivatives presented relaxant activity on guinea-pig trachea in an epithelium independent manner, and LASSBio-1846 was the most potent compound in induce relaxation due to PDEs inhibition and positive modulate of β -receptor-AC-PKA pathway.

Keywords: derivatives of rolipram. PKA. Guinea-pig trachea. Relaxant activity. phosphodiesterases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas do rolipram (A) e do LASSBio 448 (B).....	31
Figura 2 – Planejamento estrutural geral das séries I e II como inibidores de PDE4 análogos de LASSBio-448.....	31
Figura 3 – Rotas sintéticas empregadas na obtenção dos compostos <i>N</i> -sulfonamídicos da série I (17a-f; 18a-f) (A) e <i>N</i> -sulfonilidrazônicos da série II (19a-e; 20a-e) (B)	32
Figura 4 – Estruturas químicas dos LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851.....	33
Figura 5 – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional	45
Figura 6 – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional	47
Figura 7 – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1848 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional	49
Figura 8 – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1849 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional	51
Figura 9 – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1851 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional... ..	53
Figura 10 – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1846 em anéis de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M de propranolol.....	57
Figura 11 – Registros representativos do efeito relaxante da forskolina em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M do LASSBio-1846.....	60
Figura 12 – Registros representativos do efeito relaxante da aminofilina em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M do LASSBio-1846.	63

Figura 13 – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1846 sobre os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M de H-89	66
Figura 14 – Esquema representativo do mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1846 em traqueia de cobaia	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito relaxante do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraindo com 10^{-6} M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional	46
Gráfico 2 – Efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraindo com 10^{-6} M de CCh na presença (●) e na ausência (○) de epitélio funcional	48
Gráfico 3 – Efeito relaxante do LASSBio-1848 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraindo com 10^{-6} M de CCh na presença (▲) e na ausência (△) de epitélio funcional	50
Gráfico 4 – Efeito relaxante do LASSBio-1849 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraindo com 10^{-6} M de CCh na presença (▼) e na ausência (▽) de epitélio funcional	52
Gráfico 5 – Efeito relaxante do LASSBio-1851 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraindo com 10^{-6} M de CCh na presença (◆) e na ausência (◇) de epitélio funcional	54
Gráfico 6 – Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (■) e na presença (□) de 10^{-6} M do propranolol em anéis de traqueia de cobaia.....	58
Gráfico 7 – Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (★) e na presença (★) do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobaia	61
Gráfico 8 – Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (✕) e na presença (✕) do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobaia	64
Gráfico 9 – Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (■) e na presença (○) de 10^{-6} M do H-89 em anéis de traqueia de cobaia.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de pD_2 dos LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio 1849 e LASSBio-1851 na presença e na ausência de epitélio funcional em traqueia de cobaia.....	55
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

[(Ca²⁺)₄-CaM]	complexo cálcio-calmodulina
[Ca²⁺]_c	concentração citosólica de Ca ²⁺
[K⁺]_e	concentração extracelular de potássio
AA	ácido araquidônico
AC	ciclase de adenilil
ACh	acetilcolina
AMF	aminofilina
AMP	monofosfato de adenosina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
CaM	calmodulina
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
Ca_v	canais de cálcio dependentes de voltagem
CCh	carbacol
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
DAG	diacilglicerol
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
GPCR	receptor acoplado à proteína G
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
GTP	trifosfato de guanosina
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IP₃ R	receptor de IP ₃
LASSBio[®]	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
NO	óxido nítrico
OVA	ovalbumina

pD₂	logaritmo negativo, na base 10, da concentração molar de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
PDE	fosfodiesterase
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase dependente de cAMP
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLC	fosfolipase C
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
sGC	ciclase de guanilil solúvel
V_m	potencial de membrana

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3 OBJETIVOS	34
3.1 Geral	35
3.2 Específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Material	37
4.1.1 Substâncias-teste	37
4.1.2 Animais.....	37
4.1.3 Drogas e reagentes	37
4.1.4 Soluções nutritivas	38
4.1.5 Equipamentos	38
4.2 Métodos	39
4.2.1 Preparação das soluções-estoque das substâncias-teste.....	39
4.2.2 Preparação dos anéis de traqueia de cobaia	39
4.2.3 Triagem farmacológica	39
4.2.3.1 Efeito dos derivados sintéticos do rolipram sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaia	40
4.2.4. Investigação do mecanismo de ação, em nível funcional, do LASSBio-1846 em traqueia de cobaia	40
4.2.4.1 Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do propranolol	40
4.2.4.2 Investigação da participação da via AC/cAMP/PKA.....	41
4.2.4.2.1 Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1846.....	41
4.2.4.2.2 Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1846.....	41
4.2.4.2.3 Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do H-89.....	42
4.3 Análise estatística	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Triagem farmacológica	44

5.1.1 Efeito dos derivados sintéticos do rolipram sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaia.....	44
5.2 Investigação do mecanismo de ação, em nível funcional, do LASSBio-1846 em traqueia de cobaia.....	56
5.2.1 Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do propranolol	56
5.2.2 Investigação da participação da via AC/cAMP/PKA.....	59
5.2.2.1 Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1846	59
5.2.2.2 Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1846	62
5.2.2.3 Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do H-89.....	65
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXO	88
Anexo A: Certidão de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	89

1 Introdução

O processo de descoberta de novos fármacos caracteriza-se por múltiplos fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentarem os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico e seguro. É pensando nesse processo de planejamento, que a química medicinal estuda as razões moleculares da ação dos fármacos e a relação entre a estrutura química e a atividade biológica/farmacológica (BARREIRO, 2002).

Uma classe de drogas que é alvo constante na busca por novos membros, com maior eficácia e seletividade, é a dos inibidores de fosfodiesterases (PDEs). Essas enzimas foram descritas pela primeira vez em 1962 pelo Earl Sutherland e seus colaboradores, logo após a descoberta do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). As PDEs são enzimas metalofosfo-hidrolases que através da hidrólise, inativam os nucleotídeos, cAMP e monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), em 5'-monofosfatos de adenosina (AMP) e de guanosina (GTP), respectivamente. Além disso, estas enzimas também desempenham um papel crítico na regulação indireta da sinalização de diversas vias do metabolismo intracelular (SUTHERLAND; RALL, 1958; BUTCHER; SUTHERLAND, 1962; BEAVO, 1995; CHUNG, 2006).

São conhecidos 11 grupos de isoformas de PDEs (PDE1-PDE11). Essa nomenclatura foi estabelecida de acordo com os genes dos quais são produtos, suas propriedades bioquímicas, regulação e sensibilidade a agentes farmacológicos (BEAVO, 1995). A família da PDE4 merece destaque dentre as famílias de PDEs mais estudadas. Ela é subdividida em quatro isoformas: PDE4 A-D, sendo as isoformas A, B e D as mais importantes no processo asmático, visto que sua distribuição se dá em células inflamatórias, tais como, células T e B, eosinófilos, neutrófilos, células endoteliais, células epiteliais e músculo liso das vias aéreas, enquanto que a isoforma C é encontrada no sistema nervoso central (SNC), músculo esquelético, testículos e pulmões de fetos humanos (HOUSLAY et al., 1998; DALPIAZ; GIOVANNONI, 2000; SPINA, 2000; ESSAYAN, 2001; BARBER et al., 2004; CHUNG, 2006; LUGNIER, 2006; KODIMUTHALI et al., 2008).

Considerando a base inflamatória de algumas doenças, como a asma, e a participação de diferentes citocinas na sua fisiopatologia, vários pesquisadores tem tentado desenvolver fármacos anti-inflamatórios tão efetivos quanto os corticosteroides, porém com menos efeitos indesejáveis. Diante disso, os inibidores

de PDE4 vêm sendo amplamente estudados (SUTHERLAND; RALL, 1957). Alguns dos inibidores de PDE4 de segunda geração são promissores, levando a acreditar que, existirá mais de um grupo terapêutico efetivo e com menos efeitos colaterais para o tratamento da asma (BUNDSCHUH et al., 2001; LEICHTL et al., 2002).

Nesse contexto, o rolipram, que é o protótipo dos inibidores seletivos de PDE4, apresentou ação antidepressiva, anti-inflamatória, imunossupressora e antitumoral, e ainda, demonstrou uma melhora na função pulmonar. Porém, devido aos efeitos colaterais, como aumento de secreção gástrica, diarreia, cefaleia, náuseas e êmese, que provavelmente se deu devido à presença de isoformas de PDE4 no SNC, sua utilização para fins terapêuticos foi interrompida (WACHTEL, 1983; SEMMLER; WACHTEL; ENDRES, 1993; SOMMER et al., 1995; GIOVANNONI, 2000; CHEN et al., 2002; DAL PIAZ; GIEMBYCZ, 2002; HOUSLAY, SCHAFFER, ZHANG, 2005; HALPIN, 2008; WHITAKER et al., 2008).

Dessa forma, o rolipram tornou-se uma importante ferramenta farmacológica na busca por novos inibidores de PDE4, a partir de modificações na sua estrutura química. A problemática de diversos representantes da classe dos inibidores da PDE4, como o rolipram, apresentarem efeitos colaterais gerou grandes dúvidas na comunidade científica quanto à possibilidade de um dia estes inibidores se tornarem fármacos. Porém, a falta de alternativas efetivas para o tratamento de doenças de cunho respiratório estimulou os pesquisadores, visando à descoberta de novos inibidores de PDE4 mais seguros. Este esforço foi recompensado, com a aprovação do roflumilaste para uso no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), na qual os inibidores de PDE4 tem se mostrado extremamente eficazes (GIEMBYCZ; FIELD, 2010; DE AZEVEDO; KÜMMERLE, 2015).

Os inibidores de PDE4 são opções terapêuticas para diversos agravos de saúde, como por exemplo, a hipertensão pulmonar, a disfunção erétil, a DPOC e a asma. Esta última pode ser definida como uma desordem inflamatória crônica das vias aéreas nas quais muitas células e elementos celulares estão envolvidos. A inflamação crônica e a hiperatividade das PDEs, que causam uma hiper-responsividade das vias aéreas, presentes na asma, levam a episódios recorrentes de chiado, falta de ar, aperto no peito e tosse. Esses episódios são associados com obstrução generalizada do fluxo aéreo que pode ser reversível espontaneamente ou, muitas vezes, somente com tratamento (MASOLI; FABIAN;

HOLD, 2004; PAGE; SPINA, 2012). Essa inflamação crônica das vias aéreas, bem como a disfunção do músculo liso desempenham papéis importantes no estabelecimento e progressão da doença, conseqüentemente, os medicamentos anti-inflamatórios e broncodilatadores são utilizados extensivamente não só para o tratamento da asma, mas também para as outras doenças que acometem o trato respiratório (LIU et al., 2013).

Diante disso, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio[®]) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sintetizou uma série de compostos inibidores de PDE4, a partir de modificações estruturais no composto arilsulfonamídico, o LASSBio-448, preservando o grupo farmacofórico, tendo como precursor o rolipram (MONTANA et al., 1998; CARDOZO, 2010; NUNES, 2013). A partir do LASSBio-448 duas novas séries foram planejadas, a série I composta por derivados *N*-sulfonamídicos e a série II por *N*-sulfonilidrazônicos.

Dessa forma, nesse trabalho, teve-se como objetivo avaliar um possível efeito relaxante de derivados da série II, bem como caracterizar o mecanismo de ação do derivado de maior potência e eficácia relaxante em traqueia de cobaia.

2 Revisão bibliográfica

Nos últimos anos é crescente o desenvolvimento da química medicinal, área que promove a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos e de inovações terapêuticas, por meio da interdisciplinaridade entre a química e a biologia. Essa área preocupa-se com a invenção, o planejamento, a identificação, a preparação de compostos biologicamente ativos e a interpretação do mecanismo de ação em nível molecular, além da relação estrutura-atividade e do estudo do seu metabolismo (VERMUTH et al., 1998; BARREIRO, 2009).

Um marco na história da química medicinal foi a síntese do ácido acetilsalicílico realizada por Felix Hoffman em 1897, a partir da modificação estrutural do ácido salicílico. Porém, a primeira síntese intencional foi realizada em 1910, onde o alemão Paul Erlich modificou moléculas químicas para obter os fármacos salvarsan e neosalvarsan, utilizados no tratamento da sífilis (PALMEIRA-FILHO; PAN, 2003). Assim, a partir do planejamento racional de fármacos, tornou-se possível elencar alvos moleculares que podem ser investigados pela química medicinal (YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001; LIMA, 2007).

Dentre a diversidade de alvos moleculares que podem ser sítio de ação de fármacos planejados racionalmente, destacam-se as PDEs. Essa superfamília de enzimas desempenham um papel fundamental na degradação dos níveis dos nucleotídeos cíclicos cAMP e cGMP (BROWN, 2007).

Essas enzimas são ubíquas (OMORI; KOTERA, 2007), distribuídas pelos mais variados tecidos do organismo, a exemplo dos rins, testículos, cérebro, próstata, retina, músculo esquelético, linfócitos T, monócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, plaquetas, tecido adiposo, coração, endotélio, músculos lisos, vias aéreas, dentre outros (DAL PIAZ; GIOVANNONI, 2000; ESSAYAN, 2001; LUGNIER, 2006; KODIMUTHALI et al., 2008).

De acordo com os genes que regulam sua expressão, propriedades bioquímicas, regulação e sensibilidade a agentes farmacológicos, essa superfamília de enzimas pode ser subdividida em 11 famílias, PDE1-11, que por sua vez, dividem-se em isoformas e, dependendo da afinidade pelos nucleotídeos cíclicos, podem ser classificadas como inespecífica ou específica pelos os substratos cAMP ou cGMP (BEAVO, 1995; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011).

As famílias de PDE4, 7 e 8 têm preferência por hidrolisar cAMP, já PDE5, 6 e 9 são específicas para hidrólise de cGMP. Sendo que a maior parte da hidrólise do

cAMP em uma célula se deve à família PDE4 (CONTI, 2003). As famílias de PDE1, assim como as famílias de PDE2, 3, 10 e 11 reconhecem cAMP e cGMP como substrato, porém têm eficácias catalíticas ligeiramente diferentes. Algumas dessas isoformas são estimuladas ou inibidas na presença desses nucleotídeos, como ocorre com a família de PDE2, estimulada por cGMP, e PDE3, inibida por cGMP (VIEIRA, 2009).

A família das PDE4, por exemplo, é responsável pelo regulamento de funções pulmonares desempenhadas por nervos sensoriais, epitélio e músculo liso das vias aéreas (BENDER; BEAVO, 2006; CHUNG, 2006). Alguns inibidores seletivos dessa família de fosfodiesterase (rolipram, cilomilaste e roflumilaste) foram desenvolvidos para tratar problemas do trato respiratório, tais como DPOC e asma (MORETTO et al., 2015).

O fato da PDE4 estar envolvida com o controle dos níveis de cAMP, o qual está envolvido na modulação de processos inflamatórios e possuir distribuição variada no corpo humano, faz com que esta seja umas das famílias mais estudadas. Esse fato criou oportunidades e ao mesmo tempo desafios, para programas de desenvolvimento de fármacos (DE AZEVEDO; KÜMMERLE, 2015).

A asma é um distúrbio inflamatório crônico das vias aéreas inferiores associada à hiper-reatividade brônquica, limitação variável do fluxo aéreo e hipersensibilidade das vias aéreas. Clinicamente, essa doença caracteriza-se por um aumento da reatividade (hiper-responsividade brônquica) das vias aéreas a variados estímulos, com conseqüente obstrução ao fluxo aéreo, de caráter recorrente e tipicamente reversível, sendo uma condição multifatorial determinada pela interação de fatores genéticos e ambientais (BATEMAN et al., 2008).

Mundialmente a asma possui uma prevalência de cerca de 300 milhões de casos, com estimativas sugerindo que a prevalência global dessa doença terá um crescimento de cerca de 50% por cada década (WHO, 2015). A prevalência de asma no Brasil é estimada em 20 milhões de pacientes acometidos, sendo que em 2011 o DATASUS registrou 160 mil internações em todas as idades, o que coloca essa doença como a quarta causa de internações no Brasil, e a taxa de mortalidade entre 1998 e 2007 foi de 1,52 por 100.000 habitantes (SBPT, 2012).

Em virtude de novos conhecimentos sobre os mecanismos patogênicos da asma, fármacos que haviam sido colocados em posição secundária, voltaram a ser

destaque. Por muito tempo, as metilxantinas constituíram o tratamento mais comum da asma em todo o mundo. No entanto, o desenvolvimento de broncodilatadores, mais potentes e seguros (β 2-agonistas inaláveis) fez declinar seu uso. Da mesma forma, o possível efeito anti-inflamatório da teofilina (inibidora de PDE não seletiva) voltou a colocá-la sob o foco de discussão (VASSALO; LIPSKY, 1998). Pode-se dizer que os estudos visando definir o valor dos inibidores de PDE4 no tratamento da asma resultam da retomada da teofilina, sob outra perspectiva (SUTHERLAND; RALL, 1957).

Atualmente a terapia antiasmática, basicamente, se limita a broncodilatadores adrenérgicos e fármacos anti-inflamatórios que apresentam especificidade, eficácia, duração de ação e segurança comprovadas através da farmacologia clássica e química medicinal (HOLGATE, 2011). De forma complementar, tem-se ainda o uso de anti-histamínicos, anticolinérgicos, antileucotrienos e inibidores de fosfodiesterases que propiciam um relaxamento direto das vias aéreas. No entanto, apresentam diversos efeitos colaterais e os pacientes continuam a sofrer exacerbações de asma. Apesar de serem usados há décadas com reconhecido sucesso, comprometendo e reduzindo significativamente a qualidade de vida destes pacientes (JANSSEN; KILLIAN, 2006).

Embora sua utilização tenha diminuído devido à introdução dos broncodilatadores e glicocorticoides, a teofilina tem sido utilizada no tratamento da asma e DPOC desde 1930. A teofilina em associação com corticosteroides é indicada como segunda e terceira linha de escolha terapêutica para o tratamento da asma e em combinação com broncodilatadores de longa ação na DPOC (SULLIVAN, 1994; WEINBERGER; HENDELES, 1996; RENNARD, 2004; SPINA, 2008).

Devido ao seu efeito broncodilatador, os agonistas dos receptores adrenérgicos- β são outra classe terapêutica utilizada, sendo esses receptores encontrados nos pulmões e presentes na superfície muscular, do epitélio, glândulas serosas e mucosas, pneumócitos, fibroblastos e músculo liso vascular deste órgão. O salbutamol e o fenoterol são alguns exemplos dos medicamentos desta classe (WALDECK, 2002; GIEMBYCZ; NEWTON, 2006; HUGHES et al., 2011).

Pode-se citar também o uso de fármacos anticolinérgicos ou antimuscarínicos e os anti-inflamatórios, os glicocorticoides. Os receptores muscarínicos dos tipos M_1

e M₃ estão localizados nas vias respiratórias humanas e quando estimulados promovem a broncoconstrição e estimulam a secreção de muco. Desta maneira, os antagonistas dos receptores muscarínicos atuam basicamente na inibição deste processo de broncoconstrição das vias aéreas. Como exemplos de anticolinérgicos disponíveis para o tratamento têm-se os brometos de ipratrópio e de tiotrópio (BARNES, 2004; MOULTON; FRYER, 2011; NGKELO; ADCOCK, 2013).

Além disso, alguns pacientes são resistentes às terapias vigentes, necessitando assim de novos agentes terapêuticos para o tratamento e controle do quadro asmático, a exemplo da asma grave, que foi definida pela Sociedade Respiratória Europeia juntamente com a Sociedade Torácica Americana como "aquela que requer tratamento com associação de doses elevadas de corticosteroide inalados além de um segundo controlador e/ou corticosteroides sistêmicos para impedi-lo de tornar-se descontrolada ou permanecer descontrolada". Apenas 5-10% dos pacientes asmáticos sofrem de asma grave, porém ela é responsável por uma grande parte dos custos de cuidados de saúde e morbidade associadas com a essa doença (MOORE, 2007; CHUNG et al., 2014; DANIELSSON et al., 2014).

Como citado acima, o músculo liso das vias aéreas é alvo constante de várias classes terapêuticas, visando o seu relaxamento, o que propiciaria uma melhora no quadro sintomático das doenças respiratórias. De maneira geral, o modelo experimental de músculo liso é de extrema relevância para a descoberta de novas drogas que o regulem e, conseqüentemente, possam vir a contribuir para o tratamento de doenças como asma ou DPOC ou que sejam utilizadas como ferramentas para ensaios farmacológicos no músculo liso.

No músculo liso, a causa primária para a produção da contração consiste no aumento na concentração citosólica de cálcio livre ($[Ca^{2+}]_c$) (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). A regulação funcional da $[Ca^{2+}]_c$, para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de membrana (V_m), e o fármaco-mecânico, que ocorre com a ligação de um agonista ao seu respectivo receptor (REMBOLD, 1996).

A despolarização da membrana associada ao aumento da concentração extracelular de potássio ($[K^+]_e$) ou ainda indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores, caracteriza o acoplamento eletromecânico, devido à abertura

de canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) e, conseqüentemente, o influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) promovendo uma resposta contrátil (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos fármaco-mecânicos da contração incluem: 1) aumento de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) por ligação do agonista com o receptor ativando o sistema efetor proteína $G_{q/11}$ -fosfolipase C. O IP_3 liga-se a um receptor de IP_3 (IP_3R) permitindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares que favorecerá a formação do complexo cálcio-calmodulina ($4Ca^{2+}$ -CaM) disparando o início do mecanismo contrátil (REMBOLD, 1996); 2) aumento do influxo de Ca^{2+} através da abertura do Ca_v por um mecanismo que não envolve mudança no potencial de membrana e 3) liberação do Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} através de receptores de rianodina (RyR) (sensíveis à cafeína) presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

Sendo o aumento na $[Ca^{2+}]_c$ a causa que leva à contração, conseqüentemente seu relaxamento se dá por diminuição dos níveis deste íon no citosol (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Esta diminuição na $[Ca^{2+}]_c$ pode ocorrer por um mecanismo eletromecânico, caracterizado pela repolarização (ou hiperpolarização) da membrana, ou pelo mecanismo fármaco-mecânico, que se dá pela ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM; BROPHY, 2001).

O acoplamento eletromecânico de relaxamento é caracterizado pela abertura de canais de potássio, que desempenham um papel chave na regulação do potencial de repouso da membrana e na excitabilidade celular. A contração no músculo liso depende então do balanço entre o aumento da condutância ao íon potássio (K^+), que gera uma repolarização/hiperpolarização, e a diminuição de sua condutância que leva a uma despolarização (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996).

Os mecanismos de relaxamento do músculo liso via acoplamento fármaco-mecânico pode ocorrer via receptores acoplados a proteína G (GPCRs), acoplado à proteína G_s , cuja subunidade α ativa a ciclase de adenilil (AC) que converte o ATP em cAMP. A geração do óxido nítrico (NO) é outra via que leva ao relaxamento caracterizado por esse acoplamento. O NO é um fator relaxante derivado do endotélio/epitélio, pelos nervos e pelas células musculares lisas, que ao estimular a ciclase de guanilil solúvel (sGC), induz a formação de cGMP a partir do GTP (PEREZ-ZOGHBI; BAI; SANDERSON, 2010; BERRIDGE, 2012).

As proteínas cinases dependentes de cAMP (PKA) e de cGMP (PKG) fosforilam vários substratos, levando a: 1) ativação de canais de K^+ , que indiretamente, inibem os Ca_v ; 2) inibição direta dos Ca_v , (REMBOLD, 1996); 3) ao aumento da cinética da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA); 4) inibição do trocador Na^+/Ca^{2+} (BLAUSTEIN, 1989); 5) inativação dos IP_3R (WOODRUM; BROPHY, 2001); 6) inibição da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), impedindo a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) (REMBOLD, 1996);

De maneira complementar, as PDEs favorecem a contração muscular ao hidrolisar nucleotídeos cíclicos, com a inibição dessas enzimas, elevam os níveis intracelulares de cAMP, que é o segundo mensageiro mais importante na via de sinalização relaxante no músculo liso das vias aéreas (KNOX; TATTERSFIELD, 1995), bem como do cGMP (CHUNG, 2006). Dessa forma, as PDEs tornam-se importantes alvos para o desenvolvimento de fármacos que possam vir a ser utilizados no tratamento de doenças que envolvam o músculo liso respiratório.

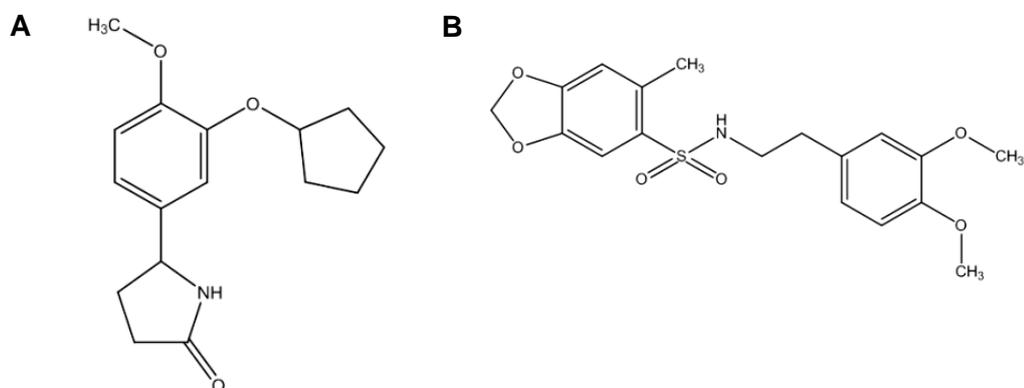
Nessa perspectiva, foi planejado e desenvolvido o rolipram, um potente e seletivo inibidor da PDE4, apresentando 100 vezes mais seletividade por esta isoforma com relação às outras PDEs (HATZELMANN et al., 2010; KUMMERLE et al., 2012; MAURICE et al., 2014).

O rolipram, que curiosamente foi planejado como um composto antidepressivo (SCHWABE et al., 1976; WACHTEL, 1982) mostrou-se ser um inibidor promissor da hidrólise do cAMP em tecidos cerebrais e um eficaz modulador da atividade anti-inflamatória e imunológica (LUGNIER et al., 1983; KOMAS et al., 1989; SANZ; CORTIJO; MORCILLO, 2005). Assim como outros inibidores de PDE4 de primeira geração, o rolipram apresentou efeitos colaterais indesejados como náuseas, vômitos e diarreia. Porém, o grande potencial anti-inflamatório destes compostos serviu de incentivo a pesquisadores de universidades e indústrias, o que acabou levando ao desenvolvimento de inibidores de PDE4 mais seletivos e avançados como o roflumilaste e o cilomilaste, ditos inibidores da PDE4 de segunda geração (MOKRY; MOKRA, 2013; MAURICE et al., 2014).

Através do planejamento racional de novos inibidores de PDE4 desenvolvidos a partir do rolipram, o LASSBio[®] (Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas/UFRJ) objetivou contribuir para a obtenção de novas drogas para o

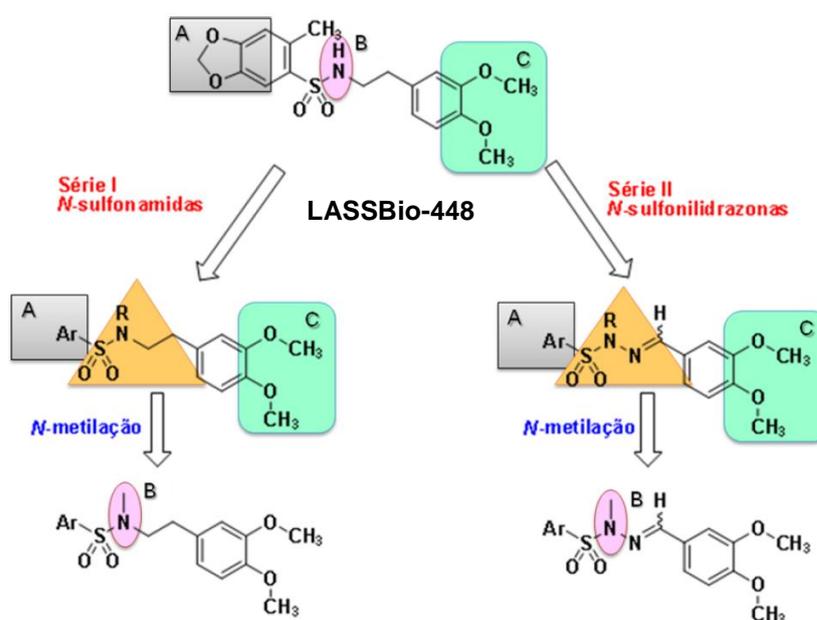
tratamento dos sintomas associados às doenças do trato respiratório, a exemplo da DPOC e da asma, buscando compostos eficientes e com efeitos colaterais mais brandos. Dos compostos ativos desenvolvidos, baseando-se na simplicidade estrutural, escolheu-se o composto LASSBio-448 (Figura 1 e 2), seletivo para as isoformas de PDE4, para planejar e desenvolver outras duas séries de novos compostos químicos, a série I, com 12 compostos *N*-sulfonamídicos (17a-f e 18a-f) e a série II, com 10 compostos *N*-sulfonilidrazônicos (19a-e e 20a-e), variando-se a natureza dos radicais arilas ligados a função sulfonamida (Figura 3) (NUNES, 2013).

Figura 1 – Estruturas químicas do rolipram (A) e do LASSBio-448 (B).



Fonte: NUNES, 2013.

Figura 2 – Planejamento estrutural geral das séries I e II como inibidores de PDE4 análogos de LASSBio-448.

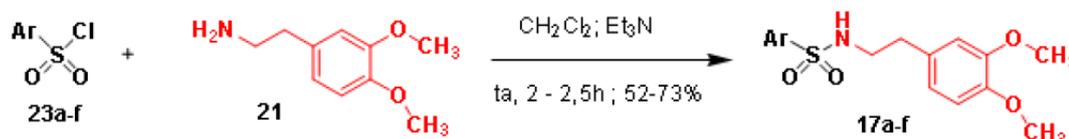


Fonte: NUNES, 2013.

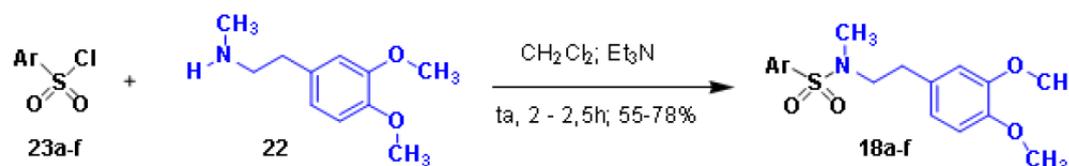
Figura 3: Rotas sintéticas empregadas na obtenção dos compostos *N*-sulfonamídicos da série I (17a-f; 18a-f) (A) e *N*-sulfonilidrazônicos da série II (19a-e; 20a-e) (B).

A

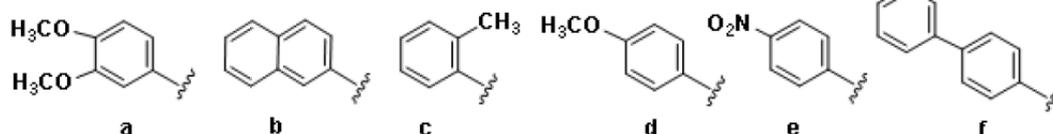
Sulfonamídicos



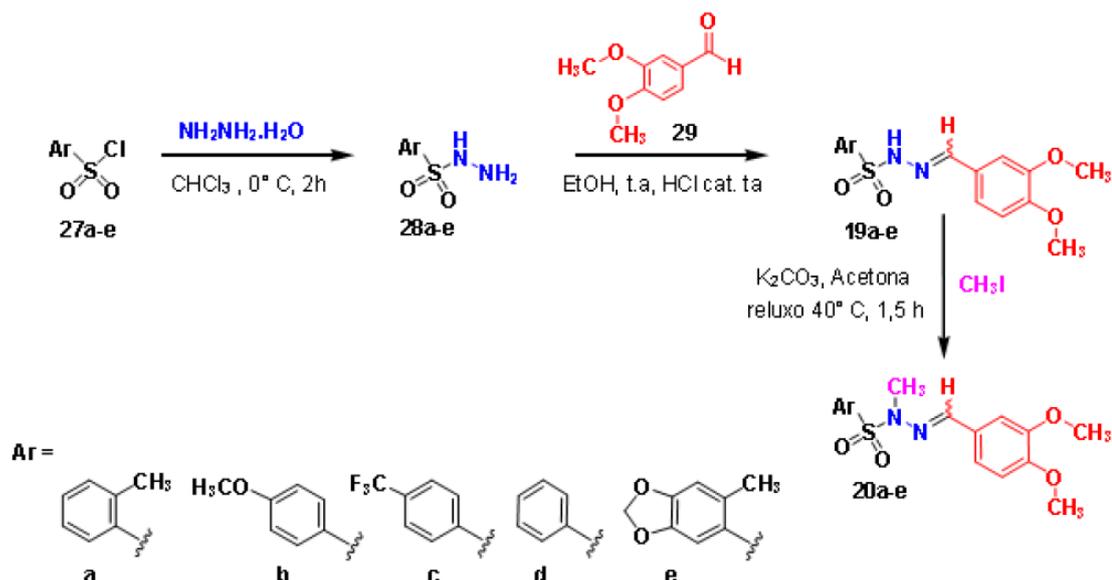
***N*-metil-sulfonamídicos**



Ar =



B

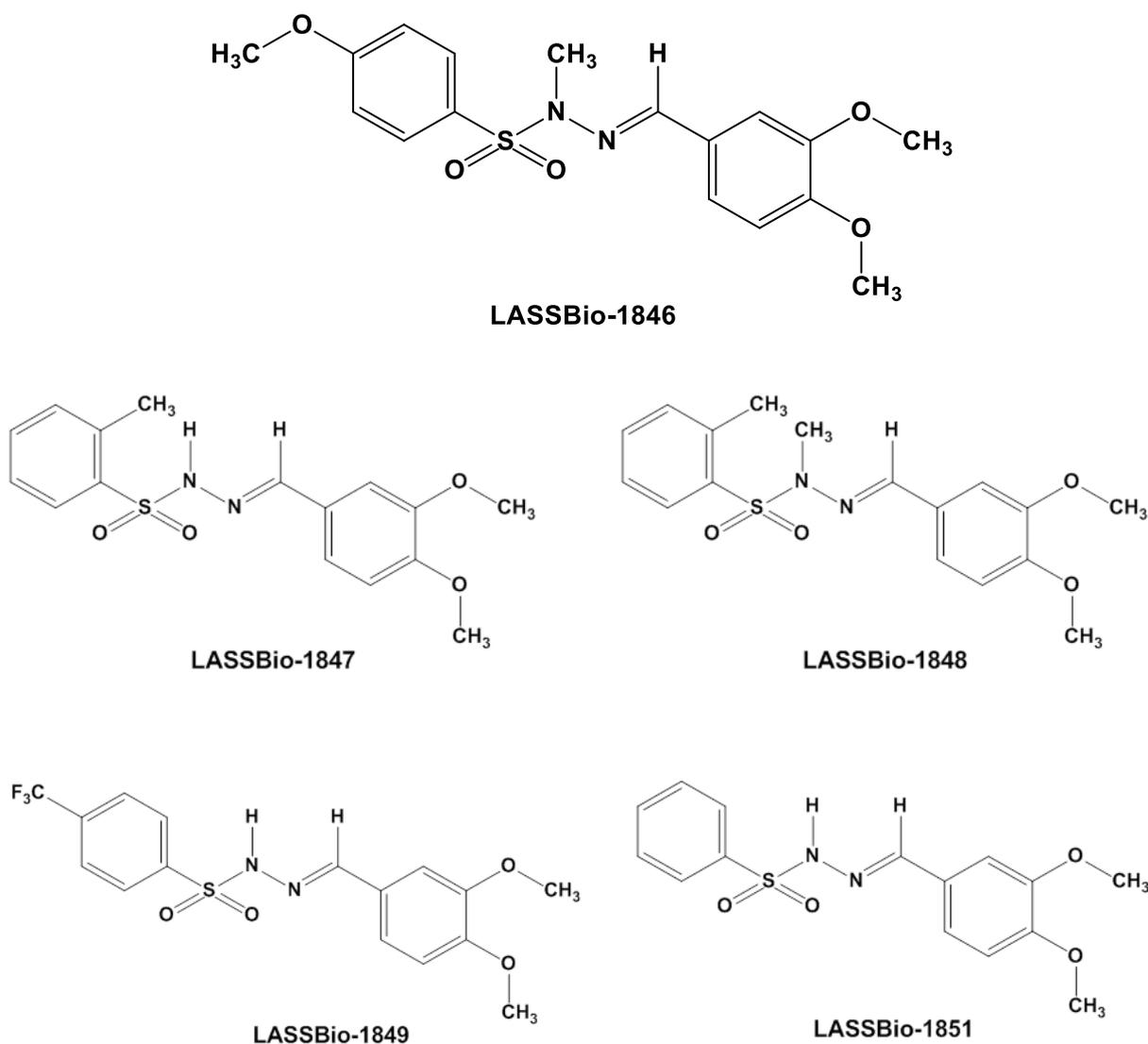


Fonte: NUNES, 2013.

Diversas atividades farmacológicas *in vitro* foram descritas para o LASSBio-448, como: diminuição da êmese em camundongos, inibidora de PDE4 bovina, atividade inibitória moderada frente às isoformas A, B e C de PDE4 humana e diminuição da hiper-reatividade das vias aéreas em modelo murino de asma (NUNES, 2013).

Nessa perspectiva, com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de novos compostos com potencial terapêutico na asma ou que possam ser utilizados como ferramenta farmacológica, decidiu-se avaliar um possível efeito relaxante de 5 derivados obtidos na série II, os LASSBio-1846, 1847, 1848, 1849 e 1851 (Figura 4), em modelo experimental de músculo liso das vias aéreas de traqueia de cobaia. E em seguida, realizar um estudo mais detalhado que possa caracterizar o mecanismo de ação, em nível funcional, do derivado que apresentar o melhor perfil farmacológico.

Figura 4 – Estruturas químicas dos LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851.



Fonte: NUNES, 2013.

3 Objetivos

3.1 Geral

Investigar um possível efeito relaxante de uma série de derivados *N*-sulfonilidrazônicos do rolipram, sendo eles: LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851 sobre a traqueia de cobaia, além de determinar o mecanismo de ação do composto mais potente, em nível funcional.

3.2 Específicos

- ✓ Determinar e comparar as potências e eficácias relaxantes relativas dos cinco derivados *N*-sulfonilidrazônicos em traqueia de cobaia, na presença e ausência de epitélio funcional.

- ✓ Avaliar o mecanismo de ação relaxante do derivado *N*-sulfonilidrazônico de maior potência e eficácia relativas, analisando em nível funcional:
 - A modulação do receptor adrenérgico- β ;
 - O envolvimento da AC;
 - A participação de PDEs e de nucleotídeos cíclicos;
 - A ativação da PKA.

4 Material e métodos

4.1 Material

4.1.1 Substâncias-teste

Os derivados LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851 de massas moleculares 364,4, 334,1, 348,1, 388,1 e 320,1 u.m.a, respectivamente, foram gentilmente cedidos pelos professores Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro e Dra. Lídia Moreira Lima do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio[®]/UFRJ).

4.1.2 Animais

Eram utilizadas cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando entre 300-500 g provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Antes dos experimentos, os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Presence[®]) com acesso a água *ad libitum*, ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 6-18 h. Todos os procedimentos experimentais eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais, submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB sob número de certidão 0610/11 (Anexo A).

4.1.3 Drogas e Reagentes

O sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), o cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), a glicose ($C_6H_{12}O_6$), o cloreto de sódio (NaCl), o bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), o cloreto de potássio (KCl), o hidróxido de sódio (NaOH), o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e o ácido clorídrico (HCl) foram obtidos da Vetec (Brasil). Estas substâncias, exceto a $C_6H_{12}O_6$, o $NaHCO_3$ e o NaCl eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque que eram mantidas sob refrigeração.

O álcool etílico absoluto foi obtido da Merck (Brasil). O cloridrato de carbamilcolina (CCh), o ácido araquidônico (AA), a aminofilina, a forskolina e o propranolol foram obtidos da Sigma-Aldrich. O H-89 foi obtido da Cayman Chemical Company. Estas substâncias eram mantidas em um “freezer” à temperatura de -20 °C, dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto o AA e o H-89 que eram dissolvidos em etanol absoluto.

A mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) foi adquirida da White Martins (Brasil).

4.1.4 Solução nutritiva

De acordo com os experimentos realizados, era utilizada a solução nutritiva ajustada ao pH 7,4 com HCl ou NaOH 1N e gaseificada com mistura carbogênica, cuja composição está descrita abaixo:

Krebs Normal (mM): NaCl 118,0; KCl 4,6; MgSO₄ 5,7; KH₂PO₄ 1,1; CaCl₂ 2,5; Glicose 11,0; NaHCO₃ 25,0.

4.1.5 Equipamentos

Para o registro das contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL), modelo BOI-04, e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05 acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.1.6 para aquisição dos dados e ANCAD para análise. O sistema contém uma bomba termostática modelo BT-60 que controla a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos junto a AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Os valores de pH eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG2000 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil). As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AY 220 e os animais em balança semianalítica modelo BG 4001 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das soluções-estoque das substâncias-teste

Os derivados eram solubilizados em Cremophor[®] (3%) e diluídos em água destilada para obtenção das soluções-estoque (10^{-2} M) que eram estocadas em geladeira a uma temperatura de 4 °C, rediluídas em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final de Cremophor[®] nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v). Nesta concentração, o Cremophor[®] é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo no órgão estudado, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores. As concentrações dos derivados eram utilizadas sempre em múltiplos de 3. Na triagem farmacológica eram testadas as concentrações 3×10^{-5} M e 10^{-4} M e quando esse efeito era superior a 50 e 75%, respectivamente, diminuía-se as concentrações até aquela de efeito 0% a fim de se obter uma curva concentração-resposta.

4.2.2 Preparação dos anéis de traqueia de cobaia

Os cobaias eram eutanasiados por deslocamento cervical, seguido da secção dos vasos cervicais. Em seguida a traqueia era retirada e limpa de todo o tecido conjuntivo e adiposo, posteriormente era dividida em segmentos, contendo 3-4 anéis de cartilagem cada. Esses segmentos eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável em cubas de banho para órgãos isolados contendo solução nutritiva de Krebs e sob tensão de 1 g. Estes tecidos eram mantidos a uma temperatura de 37 °C, gaseificados com carbogênio e permaneceram em repouso durante 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos.

4.2.3 Triagem farmacológica

4.2.3.1 Efeito dos derivados sintéticos do rolipram sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaia

A obtenção dos órgãos era realizada de acordo com o item 4.2.2. Após o período de estabilização, uma primeira contração era induzida pela adição de 10^{-6} M de CCh à cuba. A integridade do epitélio da traqueia era verificada pela adição de AA à cuba na concentração de 10^{-4} M (DEVILLIER et al., 1988), durante a fase tônica da primeira resposta induzida por CCh, onde anéis que obtiveram relaxamentos superiores a 50% (em relação a força de contração inicial) eram considerados com epitélio funcional. Anéis de traqueia sem epitélio eram obtidos através da retirada do mesmo por atrito com uma haste envolta em algodão e embebida com solução de Krebs. A retirada do epitélio era confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de AA à cuba ou quando este relaxamento era inferior a 10%, este anel era considerado sem epitélio funcional (TSCHIRHART et al., 1987). Os segmentos eram mantidos em repouso durante 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos.

Após o período de estabilização, investigou-se o efeito relaxante de cada derivado (LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851) sobre a traqueia de cobaia pré-contraída por CCh, onde eram obtidas duas contrações tônicas de magnitudes similares induzidas por 10^{-6} M do agonista supracitado e consideradas como controle e, durante a fase tônica da segunda resposta, os compostos eram adicionados, individualmente, de maneira cumulativa à cuba. Os experimentos eram realizados tanto na ausência quanto na presença de epitélio funcional.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo CCh, sendo os valores de pD_2 (logaritmo negativo, na base 10, da concentração molar de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo) obtidos por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta de cada derivado.

4.2.4 Investigação do mecanismo de ação, em nível funcional, do LASSBio-1846 em traqueia de cobaia

4.2.4.1 Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de propranolol

A traqueia era montada conforme o item 4.2.2. Após o período de estabilização, 10^{-6} M de propranolol, um bloqueador adrenérgico- β não seletivo (BILOIKOVÁ; BAUER; KOLENA, 1987), era pré-incubado por 20 minutos e uma resposta contrátil com CCh era induzida. Após a estabilização do componente tônico dessa contração, o LASSBio-1846, era adicionado à cuba em concentrações crescentes de maneira cumulativa e seu efeito relaxante era registrado. O efeito do LASSBio-1846 era avaliado na ausência do propranolol e tomado como controle. Os valores de pD_2 do LASSBio-1846 foram comparados como descrito anteriormente.

4.2.4.2 Investigação da participação da via AC/cAMP/PKA

4.2.4.2.1 Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1846

A traqueia era montada conforme o item 4.2.2. Após o período de estabilização, o LASSBio-1846 era pré-incubado por 20 minutos na concentração que mais se aproxime ao seu valor de pD_2 e uma resposta contrátil com CCh era induzida. Após a estabilização do componente tônico dessa contração, a forskolina (10^{-11} – 10^{-6} M), um ativador de ciclase de adenilil (BROOKER; PEDONE; BAROVSKY, 1983), era adicionado à cuba em concentrações crescentes de maneira cumulativa e seu efeito relaxante era registrado. O efeito da forskolina era avaliado na ausência do LASSBio-1846 e tomado como controle. Os valores de pD_2 da forskolina foram calculados e comparados como descrito anteriormente.

4.2.4.2.2 Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1846

A traqueia era montada conforme o item 4.2.2, em seguida as preparações eram expostas por 20 minutos ao LASSBio-1846 na concentração que mais se aproxime ao seu valor de pD_2 e uma segunda resposta contrátil ao CCh era realizada. Após a estabilização dessa segunda contração, durante a sua fase tônica e sustentada, a aminofilina, um inibidor não seletivo de PDEs (LIU et al., 2003), era adicionada à cuba de maneira cumulativa e seus efeitos relaxantes registrados. O

efeito da aminofilina foi avaliado em experimentos concomitantes na ausência do LASSBio-1846. Foram comparados os valores de pD_2 da aminofilina na ausência e presença do derivado.

4.2.4.2.3 Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do H-89

A traqueia era montada conforme o item 4.2.2., e após o período de estabilização, era incubado por 30 minutos 10^{-6} M de H-89, inibidor seletivo de PKA (IRIÉ-N'GUESSAN et al., 2011) e uma resposta contrátil com CCh era induzida. Após a estabilização do componente tônico dessa contração, o LASSBio-1846 era adicionado à cuba em concentrações crescentes de maneira cumulativa e seu efeito relaxante era registrado. O efeito do LASSBio-1846 era avaliado na ausência do H-89 e tomado como controle. Os valores de pD_2 do LASSBio-1846 foram comparados como descrito anteriormente.

4.3 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste *t* ou análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. A hipótese nula foi rejeitada quando o valor de $p < 0,05$. O pD_2 foi calculado por regressão não linear para todos os experimentos realizados. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, U.S.A.).

5 Resultados

5.1 Triagem farmacológica

5.1.1 Efeito dos derivados sintéticos do rolipram sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaia

O LASSBio-1846 (10^{-8} – 3×10^{-5} M, n = 5), foi eficaz e equipotente em relaxar os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh, na presença ($pD_2 = 5,34 \pm 0,04$) e na ausência ($pD_2 = 5,15 \pm 0,08$) de epitélio funcional (Figura 5A e B, Gráfico 1, Tabela 1).

O LASSBio-1847 (10^{-8} – 10^{-4} M, n = 5) relaxou os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh, na presença ($pD_2 = 4,83 \pm 0,02$) e na ausência ($pD_2 = 4,78 \pm 0,04$) de epitélio funcional de maneira eficaz e equipotente (Figura 6A e B, Gráfico 2, Tabela 1).

O LASSBio-1848 (10^{-8} – 3×10^{-4} M, n = 5) relaxou os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh, na presença ($pD_2 = 4,51 \pm 0,03$) e na ausência ($pD_2 = 4,44 \pm 0,03$) de epitélio funcional de maneira eficaz e equipotente (Figura 7A e B, Gráfico 3, Tabela 1)

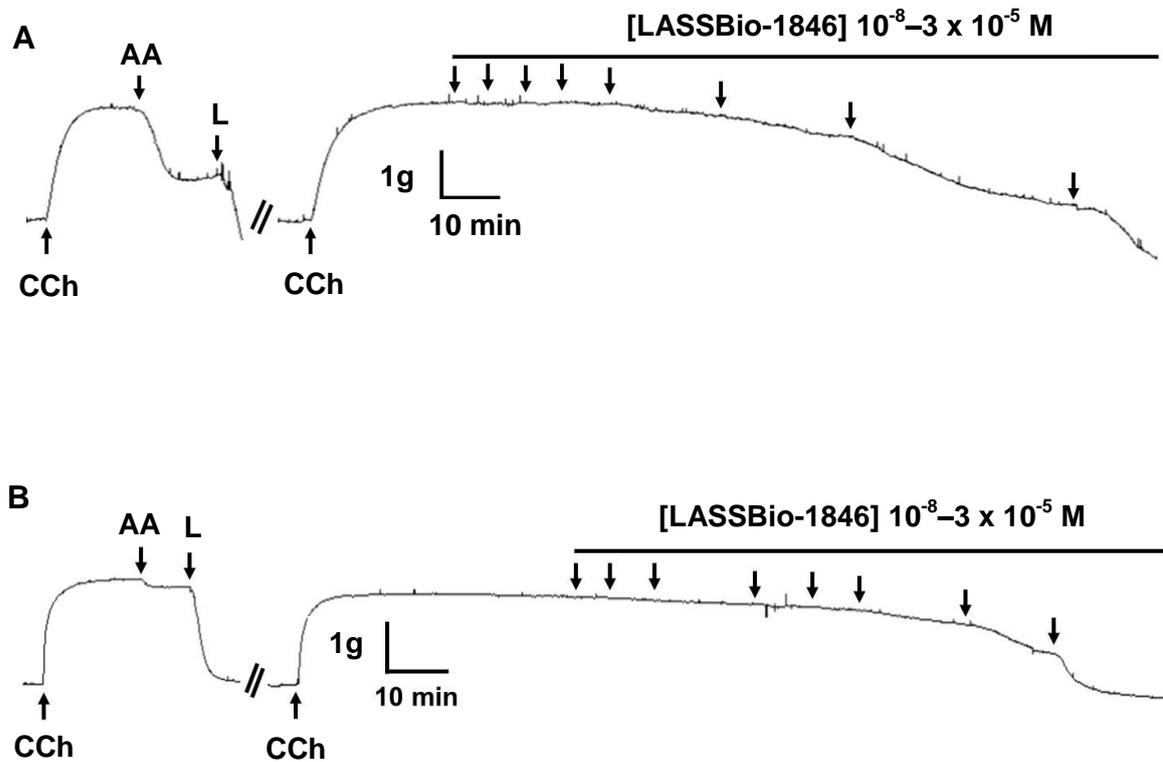
O LASSBio-1849 (10^{-8} – 3×10^{-4} M, n = 5) relaxou os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh, na presença ($pD_2 = 4,20 \pm 0,08$) e na ausência ($pD_2 = 4,10 \pm 0,07$) de epitélio funcional, de maneira equipotente. Porém, na presença de epitélio funcional, apresentou menor eficácia farmacológica ($E_{max} = 70,93 \pm 3,34\%$) quando comparado com os demais derivados, que atingiram 100% de eficácia relaxante (Figura 8A e B, Gráfico 4, Tabela 1).

O LASSBio-1851 (10^{-8} – 10^{-4} M, n = 5), relaxou os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh, na presença ($pD_2 = 4,70 \pm 0,06$), respectivamente) e na ausência ($pD_2 = 4,85 \pm 0,08$) de epitélio funcional, de maneira eficaz e equipotente (Figura 9A e B, Gráfico 5, Tabela 1).

Com base nos valores de pD_2 , o LASSBio-1846 mostrou-se o derivado mais potente em relaxar a traqueia na presença e na ausência de epitélio funcional.

A resposta do órgão ao CCh foi revertida em até duas horas após a lavagem da preparação (dados não mostrados).

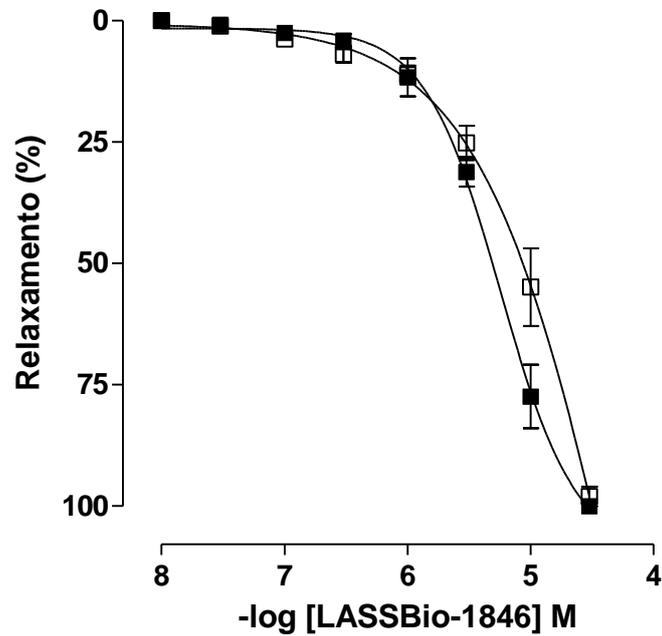
Figura 5 - Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobra pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



As setas para baixo sob a barra representam a adição acumulativa do LASSBio-1846 nas concentrações de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} e 3×10^{-5} M (A e B). CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

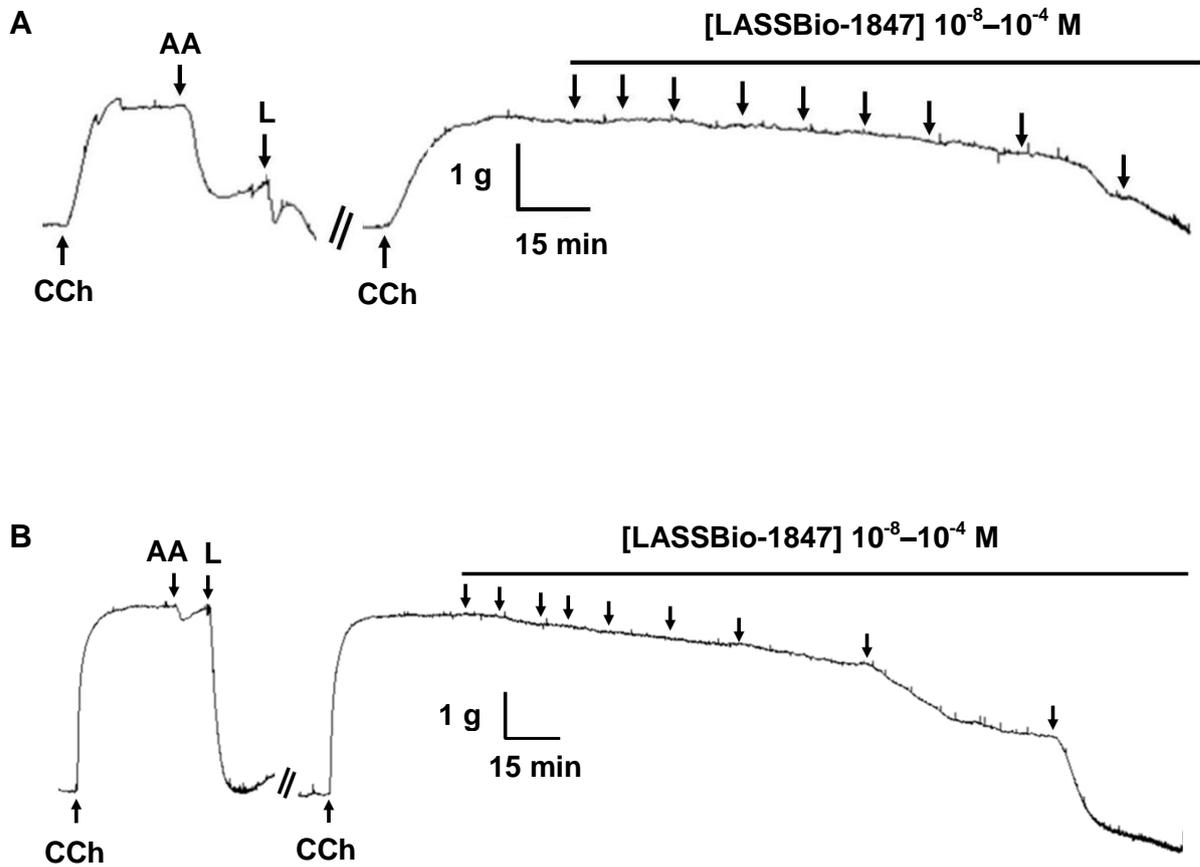
Gráfico 1 – Efeito relaxante do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, $n = 5$.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

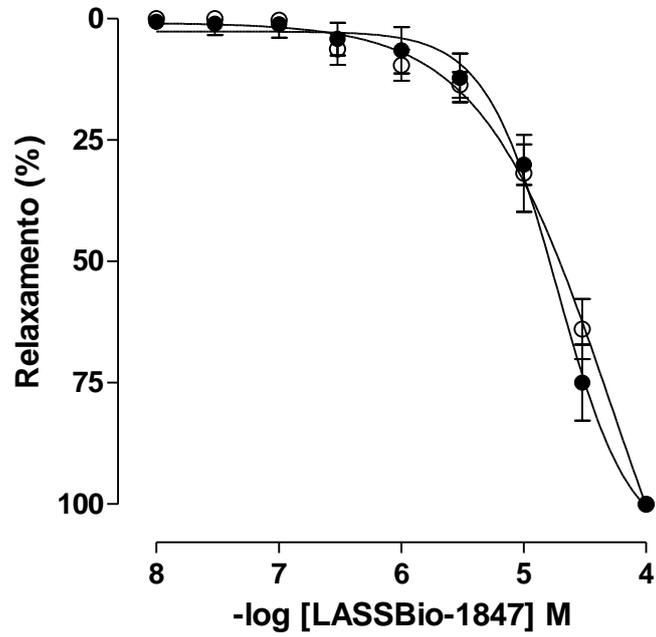
Figura 6 - Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobra pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1847 nas concentrações de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} e 10^{-4} M (A e B). CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

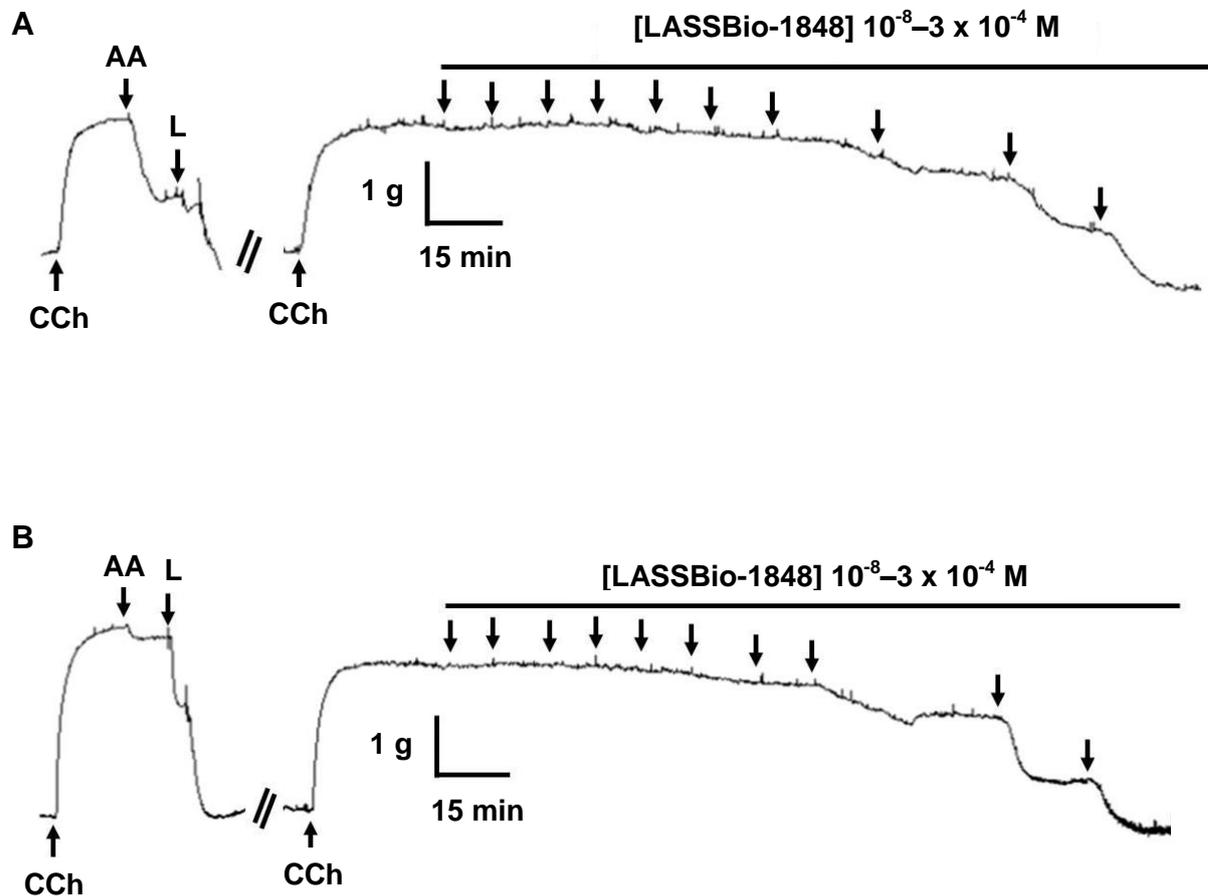
Gráfico 2 – Efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (●) e na ausência (○) de epitélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, $n = 5$.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

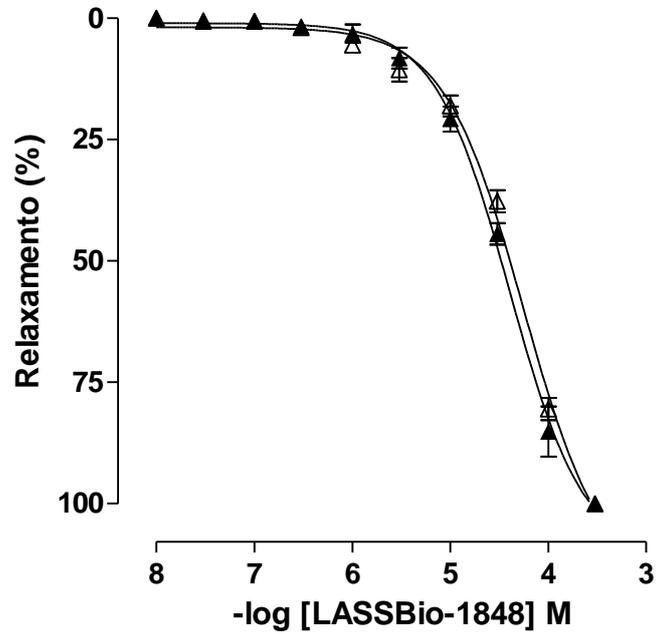
Figura 7 - Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1848 em anéis de traqueia de cobraia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1848 nas concentrações de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} e 3×10^{-4} M (A e B). CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

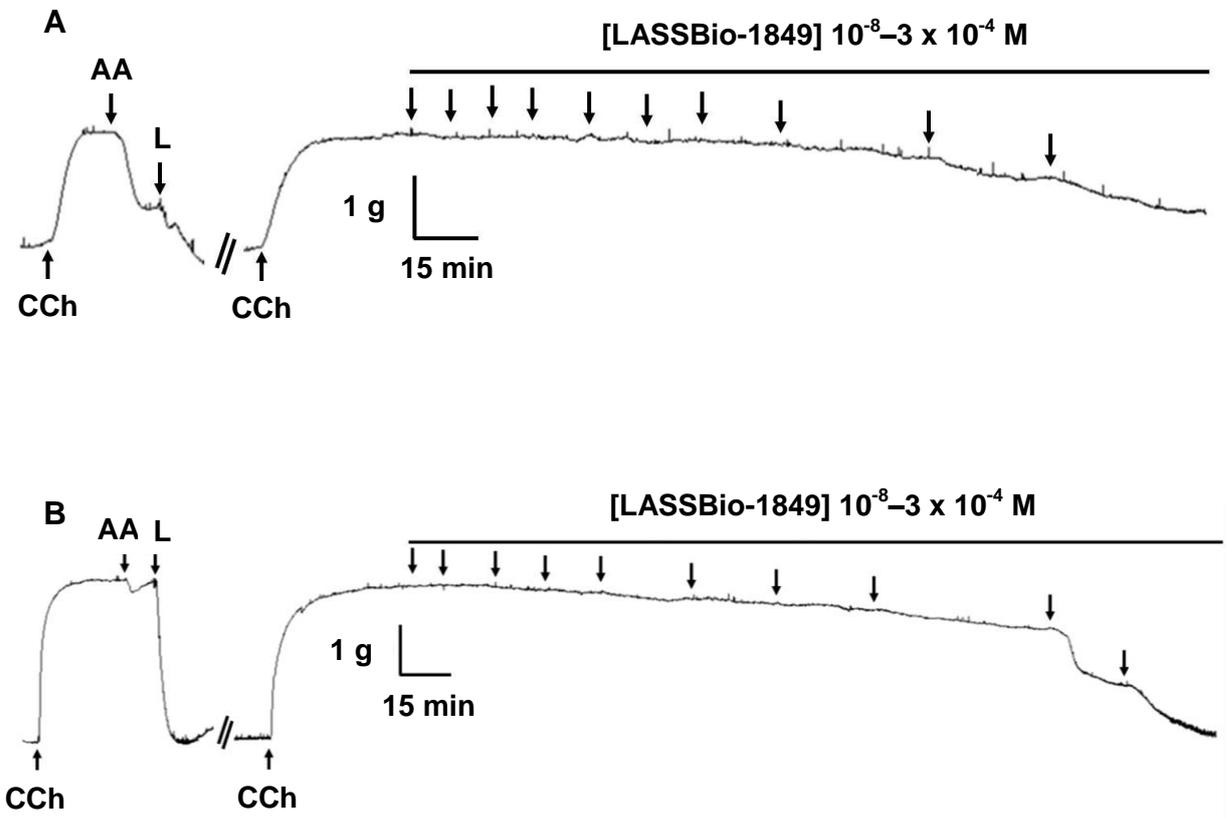
Gráfico 3 – Efeito relaxante do LASSBio-1848 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (\blacktriangle) e na ausência (\triangle) de epitélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, $n = 5$.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

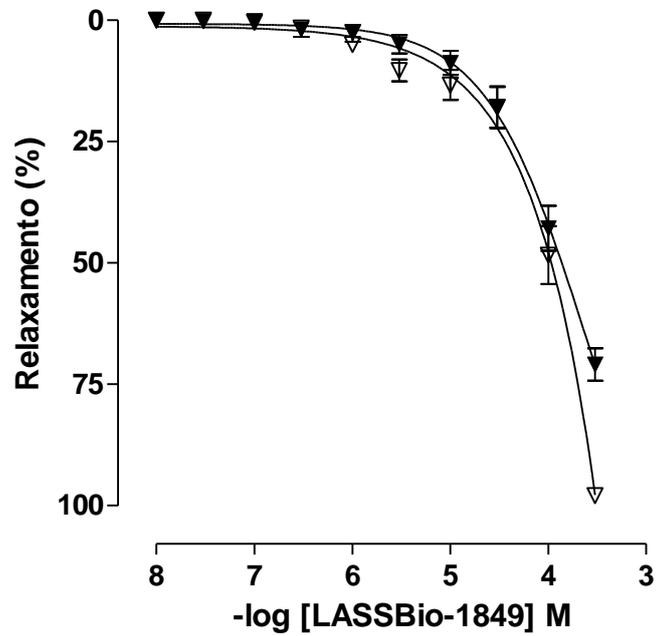
Figura 8 - Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1849 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1849 nas concentrações de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} e 3×10^{-4} M (A e B). CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

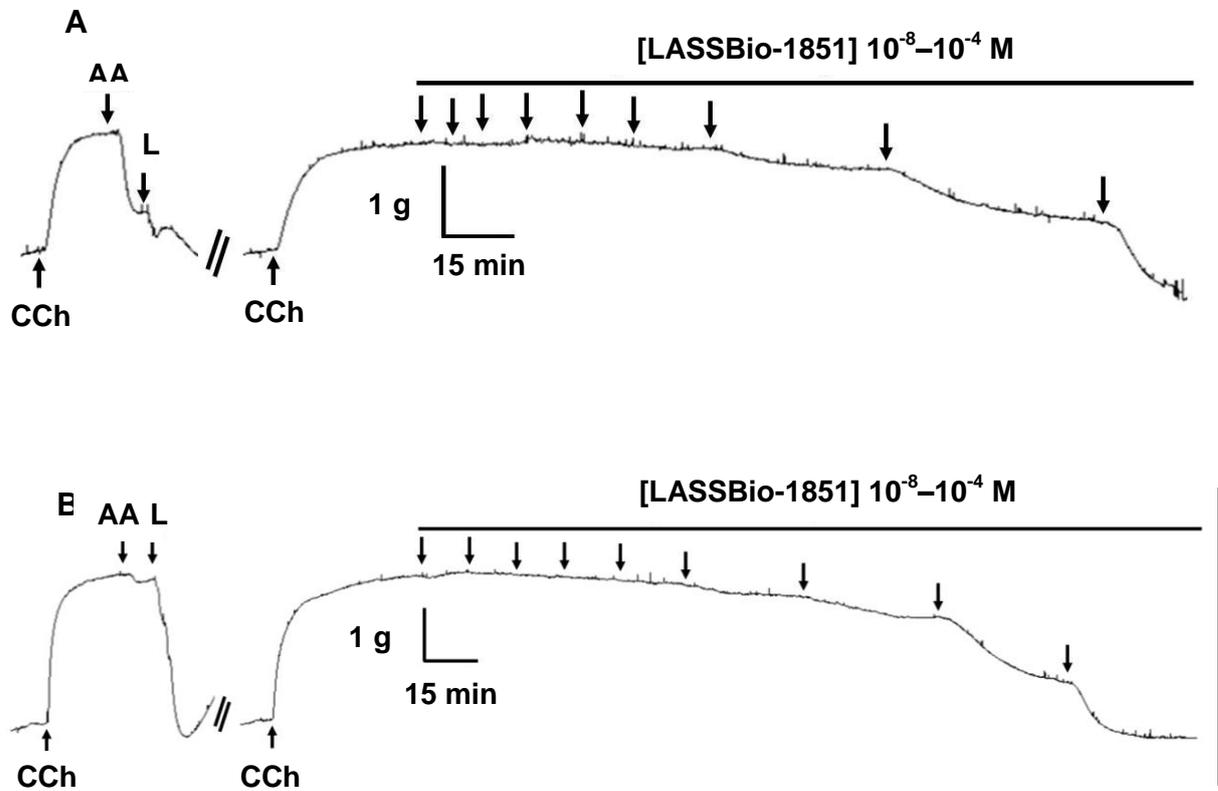
Gráfico 4 – Efeito relaxante do LASSBio-1849 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (\blacktriangledown) e na ausência (∇) de epitélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, $n = 5$.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

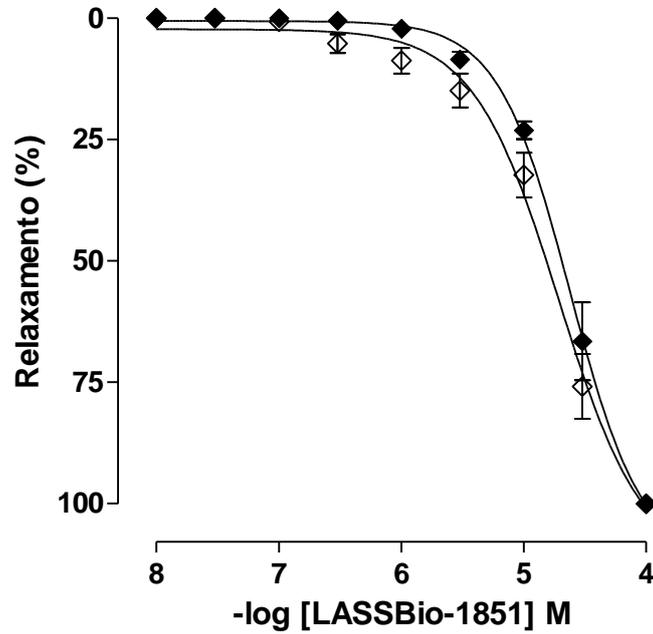
Figura 9 - Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1851 em anéis de traqueia de cobra pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1851 nas concentrações de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} e 10^{-4} M (A e B). CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

Gráfico 5 – Efeito relaxante do LASSBio-1851 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (◆) e na ausência (◇) de epitélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, $n = 5$.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

Tabela 1 – Valores de pD_2 dos LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851 na presença e na ausência de epitélio funcional em traqueia de cobaia.

LASSBio	pD_2	
	E+	E-
1846	5,34 ± 0,04 ^{***}	5,15 ± 0,08 ^{*,**,***}
1847	4,83 ± 0,02 ^{###}	4,78 ± 0,04 ^{#,###}
1848	4,51 ± 0,03 ^{££}	4,44 ± 0,03 ^{£,££}
1849	4,20 ± 0,08 ^{¥¥¥}	4,10 ± 0,07 ^{¥¥¥}
1851	4,70 ± 0,06	4,85 ± 0,08

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. E(+): ^{***} $p < 0,001$ [1846 vs. 1847/1848/1849/1851]; ^{###} $p < 0,001$ [1847 vs. 1848/1849]; ^{££} $p < 0,01$ [1848 vs. 1849]; ^{¥¥¥} $p < 0,001$ [1849 vs. 1851];

E(-): ^{*} $p < 0,05$ [1846 vs. 1851]; ^{**} $p < 0,01$ [1846 vs. 1847]; ^{***} $p < 0,001$ [1846 vs. 1848/1849]; [#] $p < 0,05$ [1847 vs. 1848]; ^{###} $p < 0,001$ [1847 vs. 1849]; [£] $p < 0,05$ [1848 vs. 1849]; ^{££} $p < 0,01$ [1848 vs. 1851]; ^{¥¥¥} $p < 0,001$ [1849 vs. 1851].

Fonte: MEDEIROS, 2015.

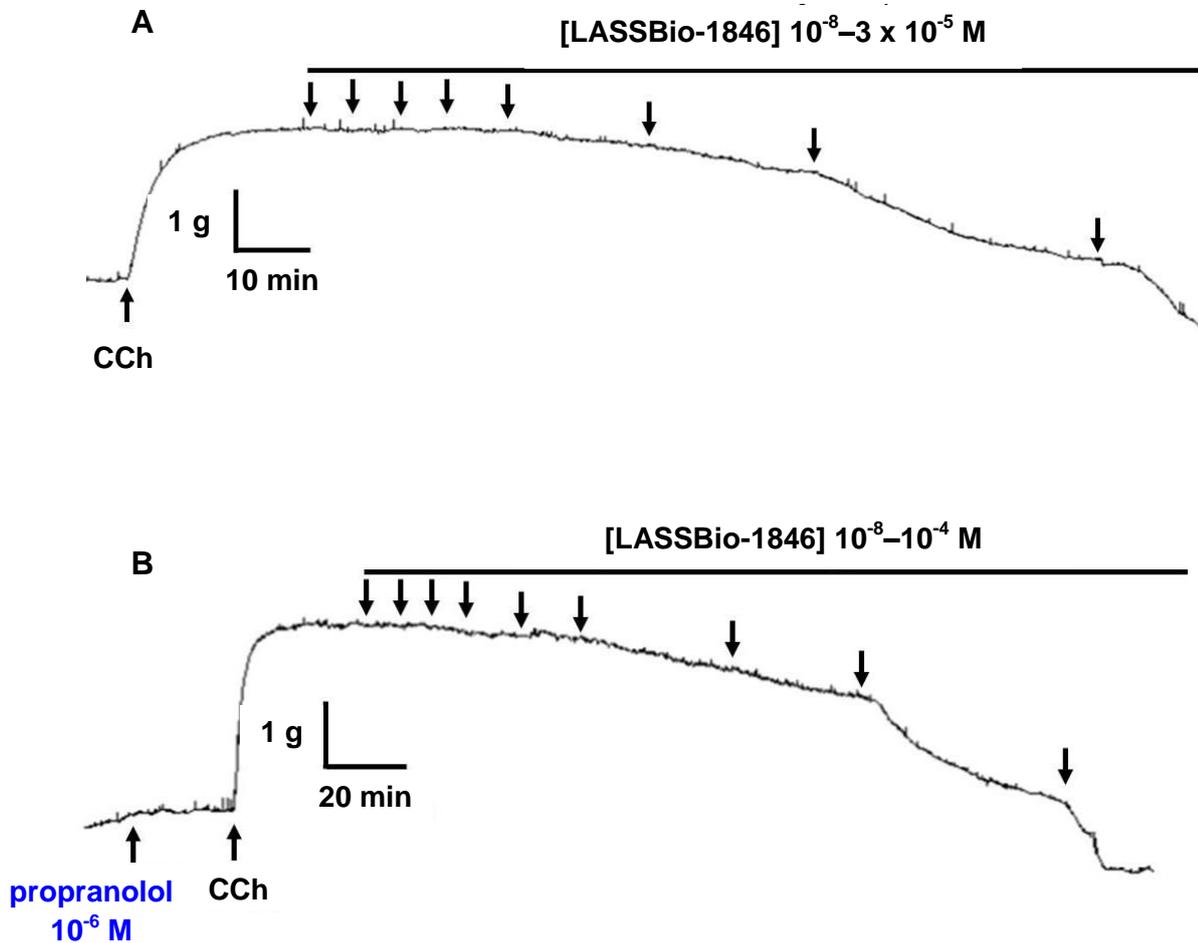
5.2 Investigação do mecanismo de ação, em nível funcional, do LASSBio-1846 em traqueia de cobaia

5.2.1 Participação dos receptores adrenérgicos- β

5.2.1.1 Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de propranolol

O LASSBio-1846 relaxou os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na ausência ($pD_2 = 5,34 \pm 0,04$) e na presença ($pD_2 = 5,13 \pm 0,07$) de 10^{-6} M de propranolol (Figura 10, Gráfico 6). No entanto, na presença do bloqueador, a potência relaxante do LASSBio-1846 foi reduzida em 1,7 vezes. A concentração do LASSBio-1846 para produzir E_{max} passou de 3×10^{-5} M na ausência do propranolol, para 10^{-4} M na presença do bloqueador.

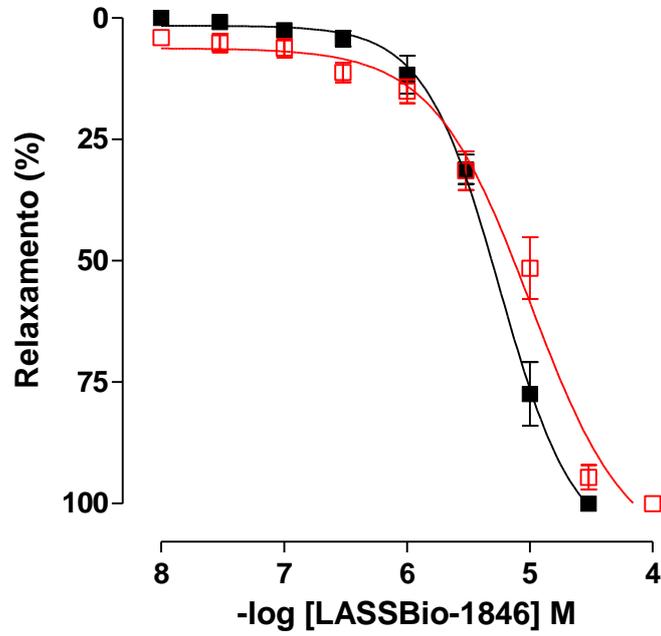
Figura 10 - Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M de propranolol.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1846 nas concentrações de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} e 3×10^{-5} (A) e 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} e 10^{-4} M (B). CCh = carbacol, L = lavagem.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

Gráfico 6 - Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (■) e na presença (□) de 10^{-6} M do propranolol em anéis de traqueia de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, $n = 5$.

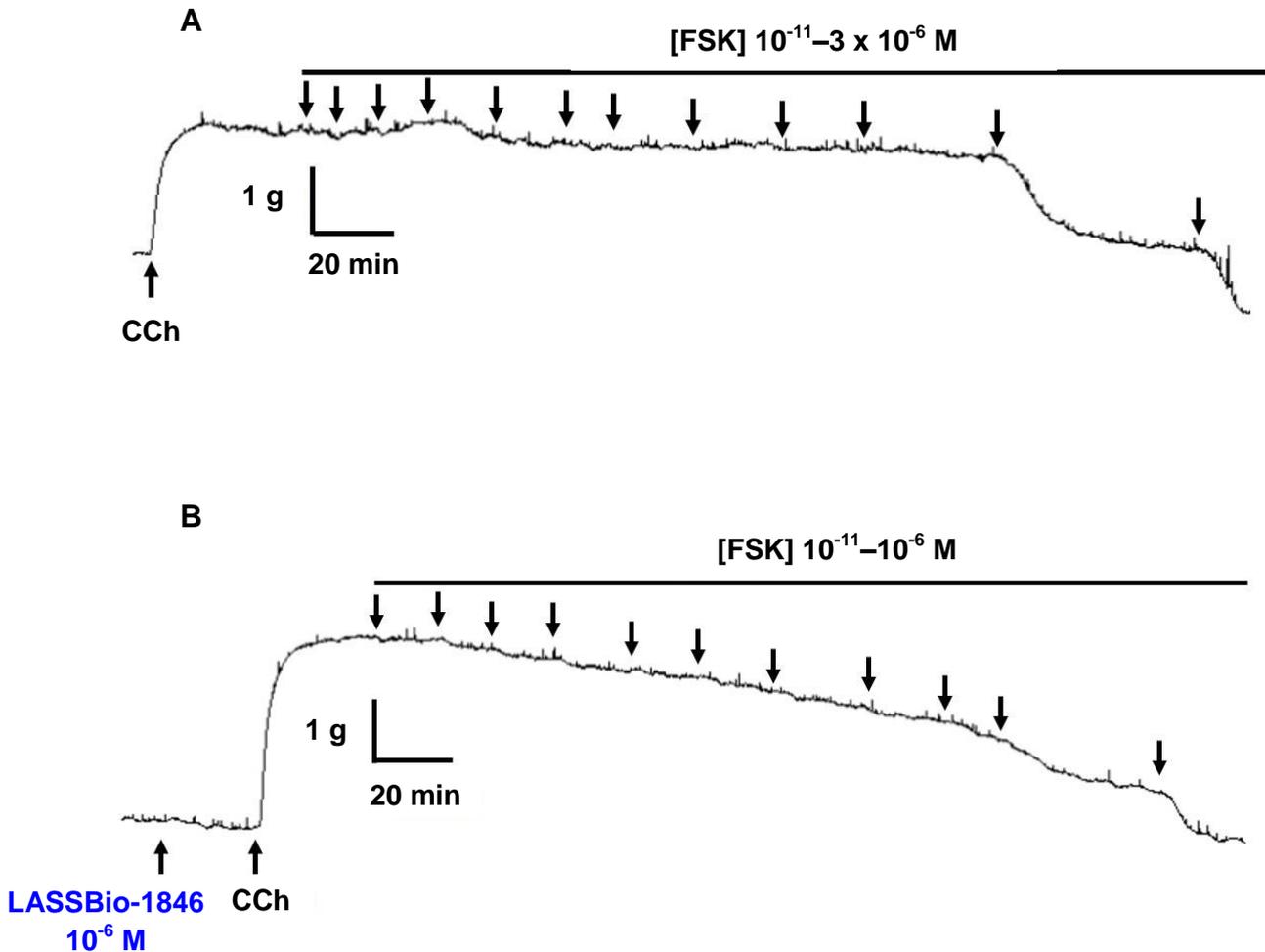
Fonte: MEDEIROS, 2015.

5.2.2 Investigação da participação da via AC/cAMP/PKA

5.2.2.1 Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1846

A forskolina (10^{-11} – 10^{-6} M, n=5) relaxou os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na ausência ($pD_2 = 6,46 \pm 0,05$) e na presença ($pD_2 = 7,56 \pm 0,12$) de 10^{-6} M do LASSBio-1846 (Figura 11, Gráfico 7). Com base nos valores de pD_2 pode ser observado que o LASSBio-1846 aumentou a potência relaxante da forskolina em cerca de 11 vezes. A concentração da forskolina para produzir E_{max} passou de 3×10^{-6} M na ausência do LASSBio-1846, para 10^{-6} M na presença do derivado.

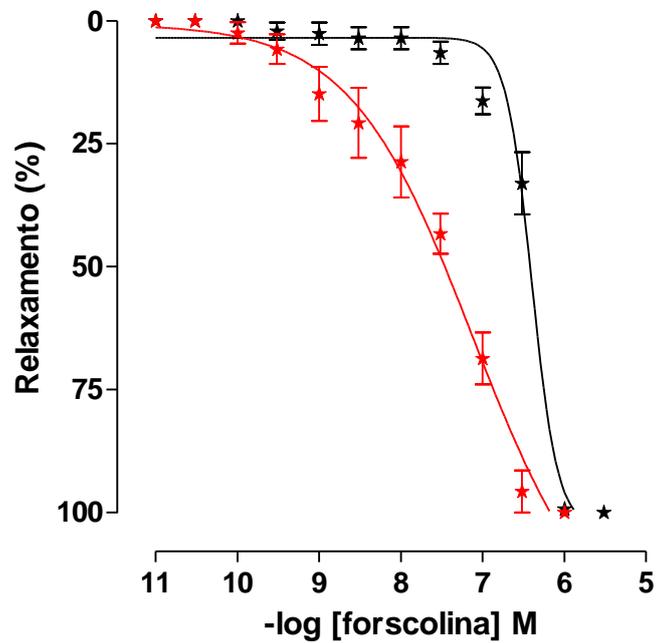
Figura 11 - Registros representativos do efeito relaxante da forskolina em anéis de traqueia de cobraia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M do LASSBio-1846.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa da forskolina nas concentrações de 10^{-11} ; 3×10^{-11} ; 10^{-10} ; 3×10^{-10} ; 10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} e 3×10^{-6} M (A) e 10^{-11} ; 3×10^{-11} ; 10^{-10} ; 3×10^{-10} ; 10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} e 10^{-6} (B). CCh = carbacol, L = lavagem, FSK = forskolina.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

Gráfico 7 – Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (★) e na presença (★) do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, $n = 5$.

Fonte: MEDEIROS, 2015

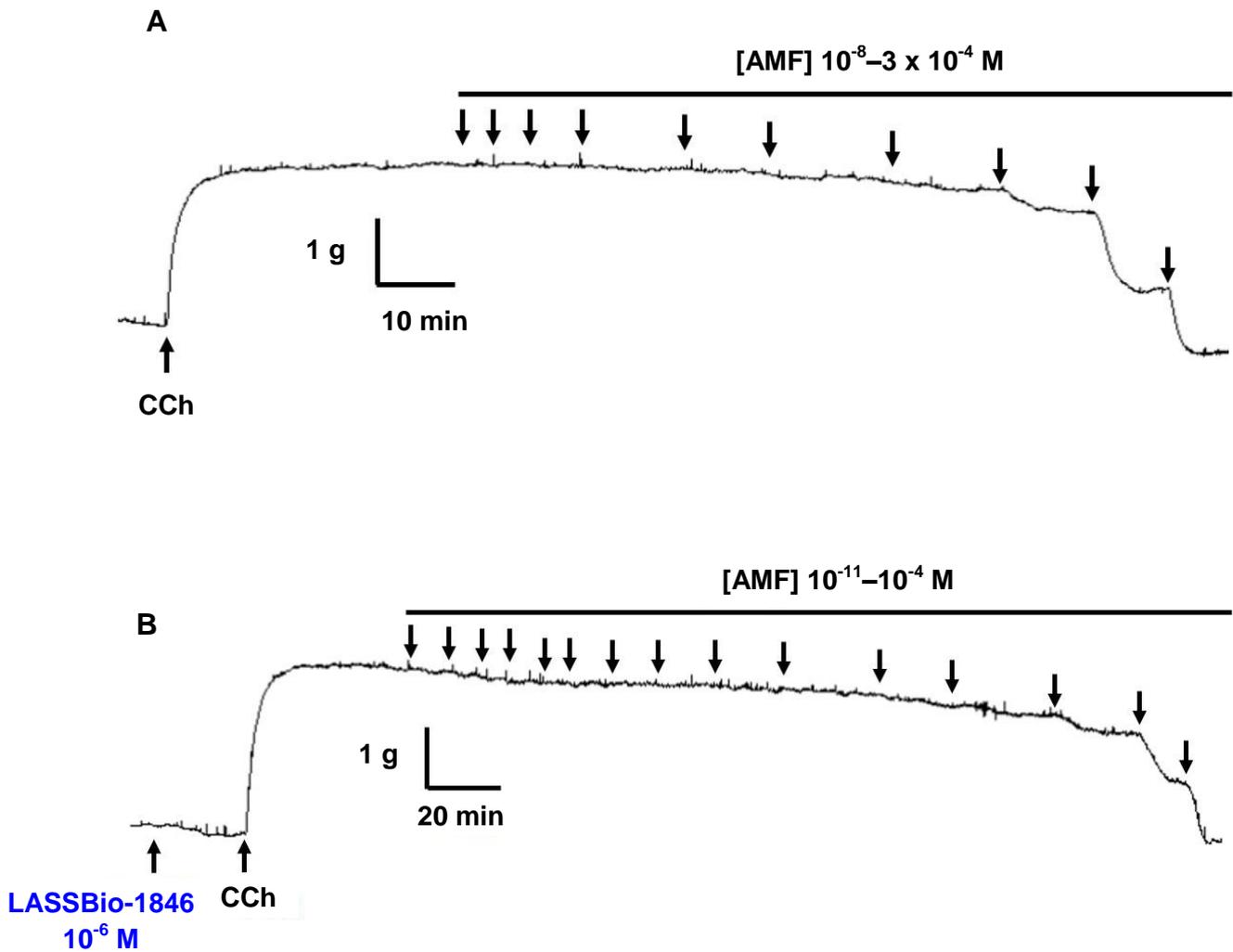
5.2.2.2 Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1846

A aminofilina relaxou os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh ($pD_2 = 4,17 \pm 0,07$) na faixa de concentração de 10^{-8} à 3×10^{-4} M (Figura 12A, Gráfico 8).

Na presença do LASSBio-1846, a aminofilina relaxou os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh, porém com uma maior faixa de concentração de 10^{-11} à 10^{-4} M ($pD_2 = 6,61 \pm 0,07$) (Figura 12B, Gráfico 8).

A curva de relaxamento da aminofilina na presença de 10^{-6} M do derivado foi desviada para a esquerda cerca de 255 vezes, quando comparada com a curva controle e a concentração da aminofilina para produzir E_{max} passou de 3×10^{-4} M na ausência do LASSBio-1846, para 10^{-4} M na presença do derivado.

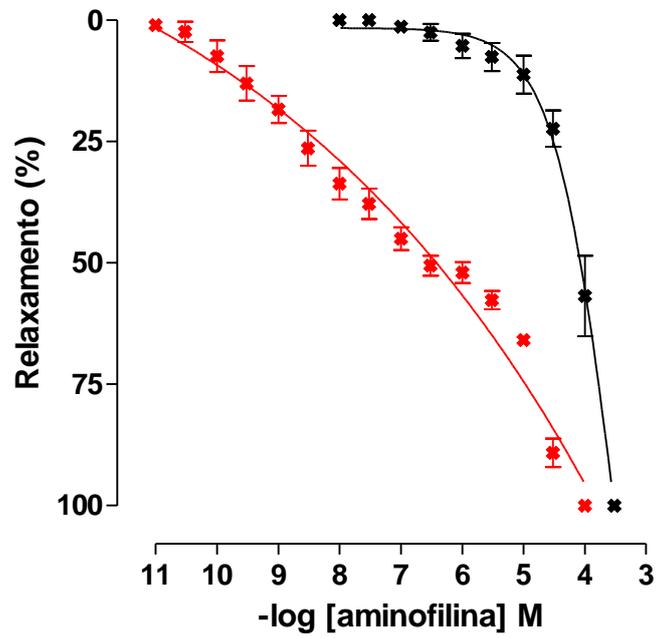
Figura 12 - Registros representativos do efeito relaxante da aminofilina em anéis de traqueia de cobraia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M do LASSBio-1846.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa da aminofilina nas concentrações de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} e 3×10^{-4} M (A) e 10^{-11} ; 3×10^{-11} ; 10^{-10} ; 3×10^{-10} ; 10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} e 10^{-4} (B). CCh = carbacol, L = lavagem, AMF = aminofilina.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

Gráfico 8 – Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (✖) e na presença (✖) do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobaia.



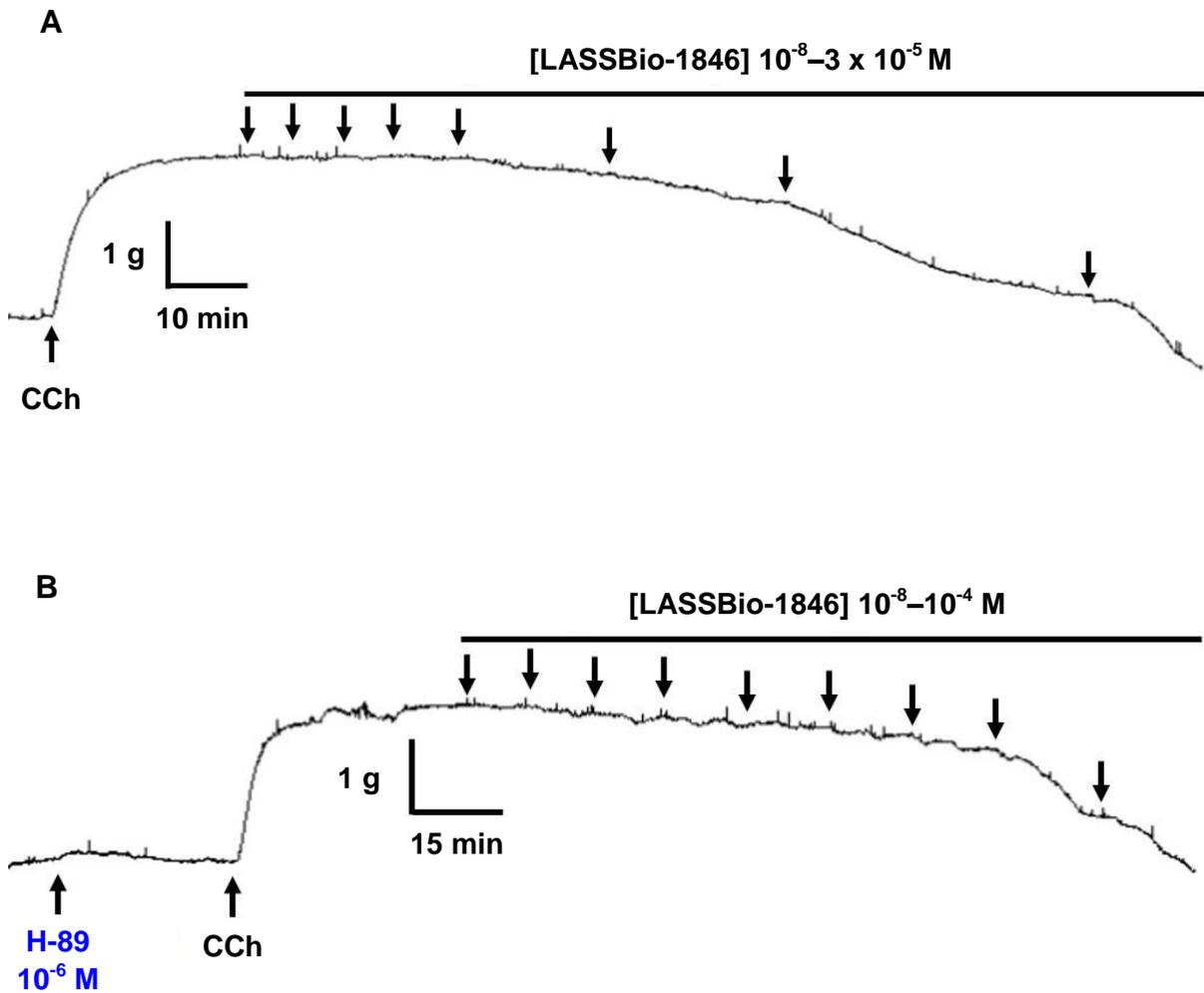
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, $n = 5$.

Fonte: MEDEIROS, 2015

5.2.2.3 Efeito do LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do H-89

A curva de relaxamento do LASSBio-1846 foi desviada para a direita na presença de 10^{-6} M de H-89, um inibidor de PKA. Os valores de pD_2 do LASSBio-1846 passaram de $5,34 \pm 0,04$ na ausência do H-89, para $4,83 \pm 0,04$ na presença do inibidor (Figura 13A e B, Gráfico 9). Na presença do inibidor, a potência relaxante do LASSBio-1846 foi reduzida cerca de 3 vezes. A concentração do derivado para produzir E_{max} passou de 3×10^{-5} M na ausência do H-89, para 10^{-4} M na presença do inibidor.

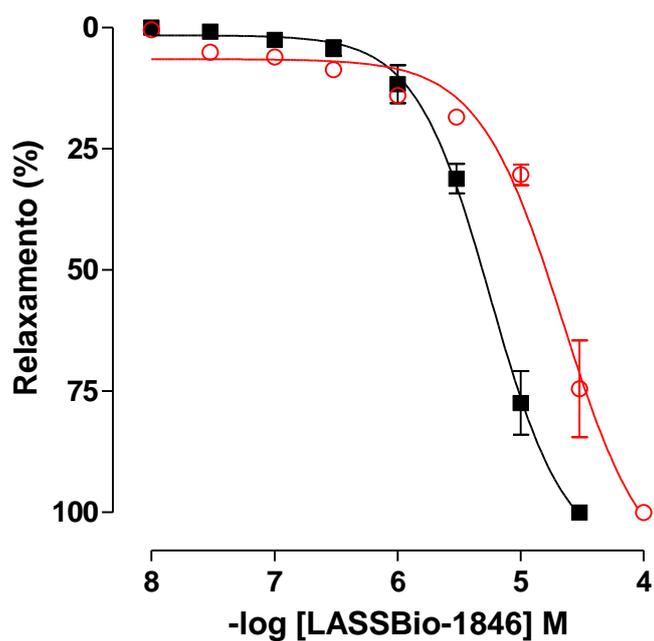
Figura 13 - Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1846 sobre os anéis de traqueia de cobraia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M de H-89.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1846 nas concentrações de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} e 3×10^{-5} (A) e 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} e 10^{-4} M e (B). CCh = carbacol, L = lavagem.

Fonte: MEDEIROS, 2015.

Gráfico 9 – Efeito da LASSBio-1846 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (■) e na presença (○) de 10^{-6} M do H-89 em anéis de traqueia de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, $n = 3-5$.

Fonte: MEDEIROS, 2015

6 Discussão

Na investigação do possível efeito relaxante dos derivados *N*-sulfonilidrazônicos, evidenciou-se que os LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851 relaxaram a traqueia de cobaia de maneira significativa e independente dos fatores derivados do epitélio, e que dentre esses derivados, o LASSBio-1846 foi o que apresentou uma maior potência relaxante. Diante disso, prosseguiu-se com a investigação do mecanismo de ação espasmolítica do LASSBio-1846. Constatou-se que o mesmo envolve a participação dos receptores adrenérgicos- β , inibição das PDEs, o que estaria elevando os níveis de cAMP levando à modulação positiva da AC, promovendo assim a ativação da PKA.

O presente estudo iniciou-se com uma colaboração entre o Laboratório de Farmacologia Funcional “Professor George Thomas” (LFF) e o LASSBio[®] da UFRJ que vêm contribuindo com a pesquisa de novos inibidores de PDE4 por meio de um planejamento racional destes. Estes foram concebidos a partir do rolipram, um protótipo inibidor de PDE4, descrito na literatura por Montana et al, 1998., visando contribuir no desenvolvimento de novos medicamentos para tratar os sintomas de doenças respiratórias, a exemplo da asma, de uma forma eficiente e que reduzissem os efeitos indesejáveis do protótipo (NUNES, 2013).

Os derivados foram planejados como inibidores de PDE4, com seletividade para cAMP. A série dos derivados sulfonamídicos funcionalizados, foi avaliada quanto a sua capacidade em inibir a PDE4 bruta. Os resultados demonstraram que quase todos os derivados testados, com exceção de três compostos, inibiram a PDE4 bovina, na mesma ordem de magnitude que o composto de referência, o rolipram (NUNES, 2013).

A atividade enzimática é medida *in vitro*, sob condições que, muitas vezes não se assemelham as *in vivo*. As condições escolhidas são geralmente um pH ótimo, concentrações saturadas de substrato, e a uma temperatura que é conveniente controlar (SCOPEs, 2002). Mesmo com essas condições, as enzimas no meio celular íntegro sofrem modulação de componentes celulares, diferentemente do que ocorre quando essas estão isoladas, dessa forma, mesmo que os derivados tenham apresentado efeito inibidor sobre a PDE4, faz-se necessário uma comprovação dessa atividade em experimentos em um meio que melhor mimetize as condições fisiológicas. Diante disso, realizou-se a triagem

farmacológica com cinco compostos da série II (LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio 1848, LASSBio-1849 e LASSBio 1851), visando à atividade relaxante em traqueia de cobaia.

Os ensaios farmacológicos mostraram que todos os derivados *N*-sulfonilidrazônicos testados apresentaram efeito relaxante em traqueia de cobaia, entretanto, apenas o composto LASSBio-1849 apresentou uma menor eficácia farmacológica na presença de epitélio funcional quando comparado com os demais compostos. Observou-se também que os derivados LASSBio-1847, -1848, -1849 e -1851 apresentaram potências relaxantes similares tanto na presença como na ausência de epitélio funcional. No entanto, o LASSBio-1846 demonstrou maior potência relaxante em relação aos outros compostos testados, sendo também equipotente tanto na presença como na ausência de epitélio funcional (Gráficos 1-5).

Nas vias aéreas, a modulação do tônus basal e a reatividade do músculo liso pode ocorrer por meio da liberação de fatores relaxantes derivados do epitélio (HASHIBA et al., 1999), tais como óxido nítrico (NO) (NIJKAMP et al., 1993) e prostaglandinas (FARMER et al., 1987). Assim, a priori, descarta-se a participação desses fatores no efeito relaxante dos derivados testados no músculo liso das vias aéreas de cobaia, uma vez que não foi observado diferença na potência farmacológica tanto na presença como na ausência do epitélio na traqueia de cobaia. Assim, tendo o LASSBio-1846 mostrado-se como o derivado mais promissor dentre os 5 testados, decidiu-se investigar o seu mecanismo de ação relaxante em traqueia de cobaia.

Nas células do músculo liso da traqueia, o subtipo de receptor adrenérgico- β mais expresso é o receptor adrenérgico- β_2 , que possui um papel importante na manutenção do tônus neste órgão (MONTANO; BAZAN-PERKINS, 2005). Esta visão é apoiada pelos seguintes elementos: 1) as três catecolaminas que produzem relaxamento do músculo liso das vias aéreas são classificados em potência como isoprenalina > adrenalina > noradrenalina (LANDS et al., 1967; NAGATOMO; KOIKE, 2000; TANAKA et al., 2005); 2) os receptores adrenérgicos- β_2 são ricamente expressos em músculo liso das vias aéreas (BARNES, 1993; NIJKAMP, 1993; JOHNSON, 1998; NAGATOMO; KOIKE, 2000); 3) agonistas de receptores adrenérgicos- β_2 seletivos são amplamente utilizados para o tratamento de asma e relaxam de maneira efetiva o músculo liso (BRITTAIN et al., 1968; WALDECK,

2002). O efeito final decorrente da ativação de receptores adrenérgicos- β_2 depende da ativação da AC, conseqüente aumento nos níveis de cAMP e ativação da PKA, sendo o cAMP o principal segundo mensageiro responsável pela modulação negativa da contratilidade neste músculo (TANAKA; HORINOUCI; KOIBE, 2005).

Tendo em vista a grande expressão dos receptores adrenérgicos- β_2 no músculo liso das vias aéreas, bem como sua contribuição na manutenção do tônus desse órgão, decidiu-se avaliar a participação dos mesmos no mecanismo relaxante do LASSBio-1846 utilizando o propranolol, um bloqueador adrenérgico- β não seletivo. De acordo com o Gráfico 6 pode-se constatar que houve desvio da curva de relaxamento do LASSBio-1846 para a direita, com redução da potência em 1,7 vezes na presença do bloqueador, sugerindo a participação desse receptor no mecanismo de ação relaxante desse derivado.

Fisiologicamente, o conteúdo citosólico de cAMP, um importante segundo mensageiro capaz de ocasionar o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas, pode ser elevado pela ativação da AC. Essa enzima apresenta cerca de 9 isoformas diferentes. A ativação de receptores adrenérgicos- β_2 com agonistas como a isoprenalina produz diferentes concentrações de cAMP, fato esse que se deve à expressão de diferentes isoformas da AC nos diferentes tecidos (MANOLOPOULOS; SAMET; LELKES, 1995). Uma importante questão que se coloca a respeito das isoformas da AC é a de como estas são ativadas. Todas as isoformas podem ser ativadas pela forskolina, um ativador direto dessa enzima (MANOLOPOULOS; SAMET; LELKES, 1995), que é um diterpeno do tipo labdano isolado de *Coleus forskohlii* (Laminaceae) (HANKS; HUNTER, 1995).

Existem evidências de substâncias capazes de modular indiretamente a abertura de canais de K^+ (BOLOTINA et al., 1994; FINN; GRUNWALD; YAU, 1996; GRIBKOFF; STARRETT; DWORETZKY, 2001; LIU et al., 2003; DENSON et al., 2005), algumas delas, como a forskolina leva a abertura desses canais por fosforilação via PKA (MASON et al., 2002; WINKLHOFER et al., 2003). Uma vez que a forskolina induz um relaxamento das vias aéreas pela ativação da AC, e conseqüente elevação do conteúdo citosólico de cAMP, decidiu-se investigar se essa etapa da produção de cAMP estaria envolvida na ação relaxante do LASSBio-1846.

Nessa perspectiva, se o LASSBio-1846 atuasse modulando positivamente a AC ou a via desencadeada pela ativação dessa enzima, seria observado um efeito relaxante mais pronunciado da forskolina na presença desse derivado. E foi o que se evidenciou no Gráfico 7, onde a curva de relaxamento à forskolina foi deslocada para a esquerda, indicando potencialização do seu efeito, em cerca de 11 vezes, na presença do derivado, mostrando que o LASSBio-1846 pode estar favorecendo a ativação da AC, ou a via “downstream” de relaxamento a qual a AC faz parte, para assim promover seu efeito relaxante sobre a musculatura lisa traqueal de cobaia.

O cAMP pode atuar ligando-se diretamente e ativando canais iônicos na membrana plasmática, no entanto, o seu principal mecanismo de ação é via ativação da PKA, um efetor capaz de fosforilar inúmeros substratos (WALSH; VAN PATTEN, 1994; HANKS; HUNTER, 1995). Por sua vez, a PKA é uma enzima organizada na forma de um tetrâmero com duas subunidades regulatórias (R) e duas subunidades catalíticas (C), na forma R_2C_2 . Após a ligação do cAMP nas subunidades R da PKA, ocorre a sua dissociação e a ativação das subunidades catalíticas (FRANCIS; CORBIN, 1994).

Substâncias que tem a capacidade de aumentar o conteúdo intracelular de nucleotídeos cíclicos têm seu efeito relaxante potencializado por meio da inibição das PDEs nos mais variados tecidos, devido ao acúmulo do conteúdo de cAMP e/ou cGMP (BENDER; BEAVO, 2006; LUGNIER, 2006). Uma forma de investigar de maneira indireta a participação de nucleotídeos cíclicos, em nível funcional, no efeito relaxante de uma droga teste, é a utilização de inibidores de PDEs, como a aminofilina (JENNE, 1992; LIU et al., 2003). Dessa maneira, para verificar se o LASSBio-1846 atuaria inibindo as PDEs, avaliou se o derivado apresentaria efeito sinérgico com a aminofilina, um inibidor não seletivo das PDEs.

Assim se o LASSBio-1846 estivesse inibindo essas enzimas, se esperaria um efeito mais pronunciado da aminofilina na presença dessa substância, do que na sua ausência, conforme foi observado. No Gráfico 8, a curva de relaxamento à aminofilina foi deslocada para a esquerda, na presença do LASSBio-1846, com potencialização do efeito da aminofilina em aproximadamente 255 vezes, sugerindo que o efeito deste composto se dá por uma possível inibição de PDEs. Esses resultados corroboram o fato do LASSBio-1846 ter sido sintetizado como inibidor de

PDE4, assim a ação sinérgica estaria dando-se pela inibição conjunta tanto da PDE4, pelo derivado, como das demais isoformas de PDEs, por parte da aminofilina.

Um dos paradigmas canônicos da sinalização celular é que a PKA é a principal molécula efetora na via de sinalização desencadeada pelo receptor adrenérgico- β_2 /AC/cAMP (MORGAN et al., 2014), sendo dessa forma, um elemento chave no processo de relaxamento do músculo liso das vias aéreas. Nesse intuito, se o LASSBio-1846 estivesse favorecendo a ativação da PKA, a curva de relaxamento do mesmo seria atenuada na presença de H-89, um inibidor da PKA (IRIÉ-N'GUESSAN et al., 2011). Assim, observou-se no Gráfico 9 que a curva de relaxamento ao derivado foi desviada para a direita, na presença do inibidor, com diminuição da potência relaxante do derivado em cerca de 3 vezes. Assim, até o momento, todos os achados sugerem que o mecanismo de ação do LASSBio-1846 envolve a modulação positiva da PKA, via inibição das PDEs, para assim levar ao relaxamento das vias aéreas em cobaia. No entanto, o fato do inibidor da PKA não ter abolido o efeito relaxante do composto avaliado, nos leva a hipotetizar que outras vias ou outros passos da via AC/cAMP/PKA possam estar contribuindo para essa ação relaxante.

Estudos têm demonstrado que o desenvolvimento de uma única molécula bifuncional no tratamento da asma e de outras doenças que necessitam de uma associação de medicamentos, como por exemplo, a asma, a DPOC e as doenças autoimunes, a citar, a artrite reumatoide, para o alívio dos sintomas, pode ser interessante no sentido de que facilita a adesão e pode otimizar o tratamento desses pacientes. Além disso, diminui a probabilidade de interações medicamentosas que pode ocorrer com essa combinação terapêutica. No caso das desordens que acometem o trato respiratório, é muito comum se ter um tratamento baseado na combinação de agonistas adrenérgicos- β_2 com inibidores de PDE, onde ambos atuam por meio da modulação de cAMP (SELDON; MEJA; GIEMBYCZ, 2005; TANNHEIMER et al., 2012 a, b).

Em consonância com o exposto e de acordo com os resultados obtidos, o LASSBio-1846 apresentaria o perfil de uma molécula multialvo, atuando sobre os componentes da via desencadeada pelo segundo mensageiro cAMP, em especial a AC e as PDEs, levando ao relaxamento das vias aéreas. E ainda, o fato de não ter observado-se um deslocamento maior da curva de relaxamento do derivado

avaliado na presença do inibidor da PKA, nos leva a hipotetizar que outras vias ou outros pontos da via AC/cAMP/PKA estivessem contribuindo para a ação relaxante do LASSBio-1846.

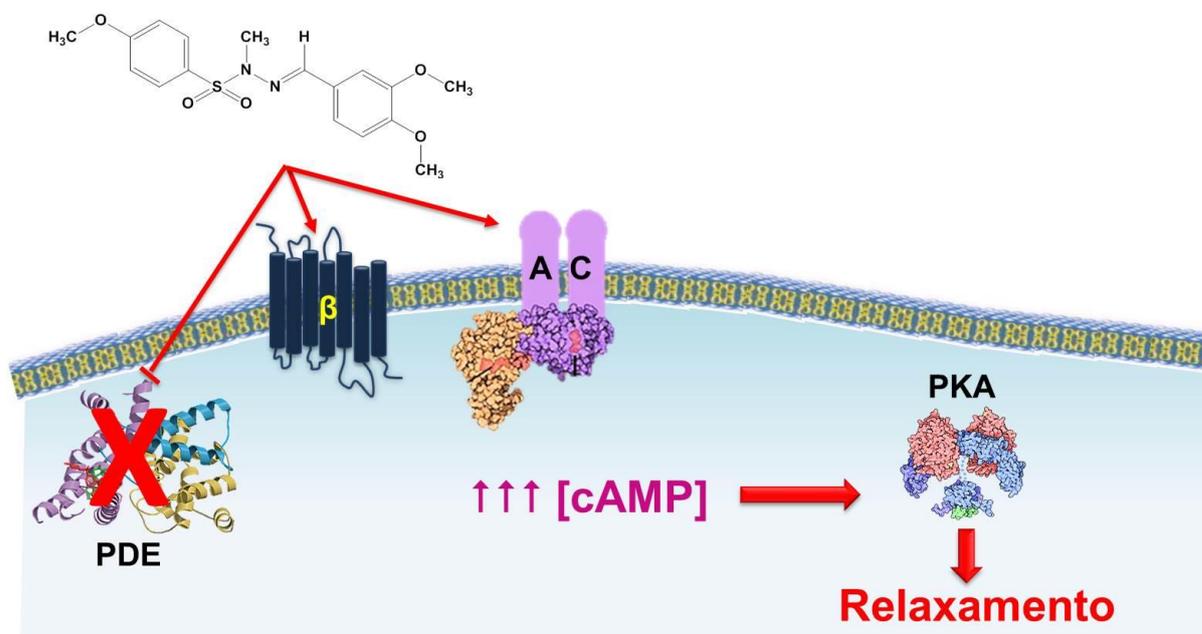
Em suma, os dados apresentados nesse trabalho demonstraram pela primeira vez, que o LASSBio-1846 modula a via que regula o conteúdo citosólico de cAMP, em especial dos receptores adrenérgicos- β , AC, PDEs e PKA culminando com o relaxamento do músculo liso de traqueia de cobaia, não se descartando ainda a participação de outras vias não investigadas no presente estudo. Por fim, o LASSBio-1846 se mostra como uma substância promissora para se dar prosseguimento aos estudos e, futuramente, ser utilizado como uma ferramenta terapêutica para desordens respiratórias ou arcabouço para o desenvolvimento de outras moléculas de interesse medicinal.

7 Conclusões

Neste trabalho de investigação da atividade relaxante dos derivados *N*-sulfonilidrazônicos do rolipram e do mecanismo de ação do derivado LASSBio-1846 em traqueia de cobaia, pode-se concluir, em nível funcional, que:

- ✓ Os LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851 apresentam efeito relaxante em traqueia de cobaia pré-contraída com CCh;
- ✓ O LASSBio-1846 apresenta maior potência relaxante em musculatura lisa das vias aéreas de cobaia;
- ✓ O mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1846:
 - Não depende de fatores relaxantes derivados do epitélio traqueal;
 - Envolve a participação dos receptores adrenérgicos- β ;
 - Envolve a inibição das PDEs e a modulação positiva da via AC/PKA.

Figura 14 - Esquema representativo do mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1846 em traqueia de cobaia



Fonte: MEDEIROS, 2015.

Referências

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A., Guide to receptors and channels (GRAC), 5th edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. S1-S324, 2011.

BARBER, R.; BAILLIE, G. S.; BERGMANN, R.; SHEPHERD, M. C.; SEPPER, R.; HOUSLAY, M. D.; HEEKE, G. V., Differential expression of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in inflammatory cells of smokers with COPD, smokers without COPD, and nonsmokers. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, n. 2, p. 332-343, 2004.

BARNES, P. J. The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease. **The American Journal of Medicine**, v. 20, p. 24, 2004.

BARNES, P. J. β -adrenoceptors on smooth muscle, nerves and inflammatory cells. **Life Sciences**, v. 52, p. 2101–2109, 1993.

BARREIRO, E. J., A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M., **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Editora ArtMed Ltda.: Porto Alegre, 2001.

BARREIRO, E.J., Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, Vol. 25 No. 6b, pp. 1172-1180, 2002.

BATEMAN, E. D.; HURD, S. S.; BARNES, P. J.; BOUSQUET, J.; DRAZEN, J. M.; FITZGERALD, M.; GIBSON, P.; OHTA, K.; O'BYRNE, P.; PEDERSEN, S. E.; PIZZICHINI, E.; SULLIVAN, S. D.; WENZEL, S. E.; ZAR H. J. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, v. 31, n. 1, p.143-178, 2008.

BEAVO, J. A., Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 4, p. 725-748, 1995.

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

BERRIDGE, M. J., Cell signalling pathways. In: Berridge, M.J. **Cell Signalling Biology**. Portland: Press Limited, p. 1-130, 2012.

BILOIKOVÁ, L.; BAUER, V.; KOLENA, J., The action of adrenoceptor agonists and antagonists on the guinea pig and dog trachea. **General Physiology and Biophysics**, v 6, p. 87-101, 1987.

BLAUSTEIN, M.P. Sodium/calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Curr. Top. Membr. Trans.**, p. 289-330, 1989.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.

BRAINARD, A. M.; KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 18, n. 3, p. 332-339, 2007.

BRITTAİN, R.T., FARMER, J.B., JACK, D., MARTIN, L.E. AND SIMPSON, W.T. α -[(t-Butylamino)methyl]-4-hydroxy-m-xylene- α 1, α 3-diol (AH.3365): a selective β -adrenergic stimulant. **Nature**, v. 219, p. 862– 863, 1968.

BROOKER G.; PEDONE C.; BAROVSKY K., Selective reduction of forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation by inhibitors of protein synthesis. **Science**, v. 220, p. 1169-1170, 1983.

BROWN, W. M. Treating COPD with PDE 4 inhibitors. **International Journal COPD**, v. 4, p. 517-533, 2007

BUNDSCHUH, D. S.; ELTZE, M.; BARSIG, J.; WOLLIN, L.; HATZELMANN, A.; BEUME, R. In vivo efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, p. 280-290, 2001.

BUTCHER, R. W.; SUTHERLAND, E. W. Adenosine 3',5'-phosphate in biológicas materials. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, p. 1244, 1962.

CARDOZO, S. V. S., Triagem e avaliação das propriedades antiasmáticas de novos derivados sulfonamídicos análogos do rolipram. **Dissertação (mestrado Farmacologia e Química Medicinal)** – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

CHEN, T. C.; WADSTEN, P.; SU, S.; RAWLINSON, N.; HOFMAN, F. M.; HILL, C. K.; SCHÖNTHAL, A. H., The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram induces expression of the cell cycle inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1), resulting in growth inhibition, increased differentiation, and subsequent apoptosis of malignant A-172 glioma cells. **Cancer Biology & Therapy**, v. 1, n. 3, p. 268-76, 2002.

CHUNG, K. F., Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 110-117, 2006.

CHUNG, K. F.; WENZEL, S. E.; BROZEK, J. L.; BUSH, A.; CASTRO, M.; STERK, P. J.; ADCOCK, I. M.; BATEMAN, E. D.; BEL, E. H.; BLEECKER, E. R.; BOULET, L. P.; BRIGHTLING, C.; CHANEZ, P.; DAHLEN, S. E.; DJUKANOVIC, R.; FREY, U.; GAGA, M.; GIBSON, P.; HAMID, Q.; JAJOUR, N. N.; MAUAD, T.; SORKNESS, R. L.; TEAGUE, W. G. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. **European Respiratory Journal**, v. 43, p. 343–373, 2014.

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

DAL PIAZ, V.; GIOVANNONI, M. P., Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for treatment of asthma and other pathologies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 463-480, 2000.

DANIELSSON, J.; YIM, P.; RINDERSPACHER, A.; FU, X. W.; ZHANG, Y.; LANDRY, D. W.; EMALA, C. W., Chloride channel blockade relaxes airway smooth muscle and potentiates relaxation by β -agonists. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 307, p. 273–282, 2014.

DE AZEVEDO, L. L.; KÜMMERLE, A. E.; Inibidores da PDE4: da Descoberta e Fracasso Anunciado ao seu Ressurgimento. **Revista Virtual de Química**, v.7, n. 2, p. 465-494, 2015.

DENSON, D. D.; LI, J.; WANG, X.; EATON, D. C. Activation of BK channels in GH3 cells by a c-PLA2-dependent G-protein signaling pathway. **Journal of Neurophysiology**, v. 93, n. 6, p. 3146-3156, 2005.

DEVILLIER, P.; ADVENIER, C.; DRAPEAU, G.; MARSAC, J. & REGOLI, D.; Comparison of the effects of epithelium removal and of an enkephalinase inhibitor on the neurokinin-induced contractions of guinea-pig isolated trachea. **British Journal of Pharmacology**, v. 94, n. 3, p. 675-684, 1988.

ESSAYAN, D. M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 5, p. 671-680, 2001.

FARMER, S. G.; HAY, D. W.; RAEBURN, D.; FEDAN, J. S. Relaxation of guinea-pig tracheal smooth muscle to arachidonate is converted to contraction following epithelium removal. **British Journal of Pharmacology**, v. 92, p. 231-236, 1987.

FINN, J. T.; GRUNWALD, M. E.; YAU, K. W. Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels: An Extended Family With Diverse Functions. **Annual Review of Physiology**, v. 58, n. 1, p. 395-426, 1996.

FRANCIS, S. H, CORBIN, J. D. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Annual Review of Physiology**, v. 56, p. 237-272, 1994.

GIEMBYCZ, M. A. 4D or not 4D – the emetogenic basis of PDE4 inhibitors uncovered, **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 548, 2002.

GIEMBYCZ, M. A.; NEWTON, R. Beyond the dogma: novel beta2-adrenoceptor signalling in the airways. **European Respiratory Journal**, v. 27, p. 1286, 2006.

GIEMBYCZ, M. A.; FIELD, S. K. Roflumilast: The first in class phosphodiesterase 4 inhibitor approved for the treatment of DPOC. **Journal of Drug Design, Development and Therapy**, v. 4, p. 147, 2010.

GRIBKOFF, V. K.; STARRETT, J. E.; DWORETZKY, S. I. Maxi-K Potassium Channels: Form, Function, and Modulation of a Class of Endogenous Regulators of Intracellular Calcium. **The Neuroscientist**, v. 7, n. 2, p. 166-177, 2001.

HALPIN, D. M. G. ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in DPOC. **International Journal of DPOC**, 3, 543, 2008.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB Journal**, v. 9, p. 576-596, 1995.

HASHIBA, K. M.; SATO, T.; HIROTA, K.; HASHIMOTO, Y.; MATSUKI, A. The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and beta-adrenoceptor activity. **Anesthesia & Analgesia**, v. 89, p. 191-196, 1999.

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

HOLGATE, S. T. Antihistamines in the treatment of asthma. **Clinical reviews in allergy immunology**, v. 12, p. 65-78, 1994.

HOLGATE, S. T. Pathophysiology of asthma: What has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.128 p.495-505, 2011.

HOUSLAY, M. D.; SULLIVAN, M.; BOLGER, G. B., The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions. **Advances in Pharmacology**, v. 44, p. 225-342, 1998.

HOUSLAY, M. D.; SCHAFER, P.; ZHANG, K. Y. J. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 1503-1519, 2005.

HUGHES, A. D.; CHIN, K. H.; DUNHAM, S. L.; JASPER, J. R.; KING, K. E.; LEE, T. W.; MAMMEN, M.; MARTIN, J.; STEINFELD, T. Discovery of muscarinic acetylcholine receptor antagonist and beta 2 adrenoceptor agonist (MABA) dual pharmacology molecules. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.21, p.1354, 2011.

IRIÉ-N'GUESSAN, G.; CHAMPY, P.; KOUAKOU-SIRANSY, G.; KOFF, A.; KABLAN, B. J.; LEBLAIS, V. Tracheal relaxation of five Ivorian anti-asthmatic plants: Role of epithelium and K⁺ channels in the effect of the aqueous-alcoholic extract of *Dichrostachys cinerea* root bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p 432-438, 2011.

JANSSEN, L. J.; KILLIAN, K. Airway smooth muscle as a target of asthma therapy:

history and new directions. **Respiratory Research**, v.7, p.123, 2006.

JENNE, J. Theophylline produces over-additive relaxation of canine tracheal smooth muscle when combined with beta-agonists: The dose-response relationship. **Pulmonary Pharmacology**, v. 5, n. 4, p. 239-249, 1992.

JOHNSON, M. The β -adrenoceptor. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, p. S146–S153, 1998.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In Bárány, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego: Academic Press, p. 203-219, 1996.

KNOX, A.J.; TATTERSFIELD, A.E., Airway smooth muscle relaxation. **Thorax**, v. 50, p. 894-901, 1995.

KODIMUTHALI, A.; JABARIS, S. S. L; PAL, M., Recent advances on phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 5471-5489, 2008.

KOMAS, N., LUGNIER, C., LE BEC, A., SERRADEIL- LE GAL, C., BARTHELEMY, G., STOCLET, J. C. Differential sensitivity to cardiotoxic drugs of cyclic AMP phosphodiesterases isolated from canine ventricular and sinoatrial-enriched tissues. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 14, p. 213, 1989.

KÜMMERLE, A. E.; SCHMITT, M.; CARDOZO, S. V; LUGNIER, C.; VILLA, P. LOPES, A. B.; ROMEIRO, N. C.; JUSTINIANO, H.; MARTINS, M. A. FRAGA, C. A. M.; BOURGUIGNON, J. J.; BARREIRO, E. J. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of N-Acylhydrazones and Novel Conformationally Constrained Compounds as Selective and Potent Orally Active Phosphodiesterase-4 Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 7525–7545, 2012.

LANDS, A. M.; ARNOLD, A.; MCAULIFF, J. P.; LUDUENA, F. P.; BROWN, T. G. JR. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. **Nature**, v. 214, p. 597–598, 1967.

LEICHTL, S.; SCHMID-WIRTITSCH, C.; BREDENBROKER, D.; RATHGEB, F.; WURST W. Dose-related efficacy of once-daily roflumilast, a new orally active selective phosphodiesterase-4 inhibitor in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, p. 185, 2002.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p.1456-1468, 2007.

LIU, A.; HUANG, L.; WANG, Z.; LUO, Z.; MAO, F.; SHAN, W.; XIE, J.; LAI, K.; LI, X., Hybrids consisting of the pharmacophores of salmeterol and roflumilast or phthalazinone: dual β_2 -adrenoceptor agonists-PDE4 inhibitors for the treatment of DPOC. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, p. 1548, 2013.

LIU, X. S.; XU, Y. J.; ZHANG, Z. X.; LI, C. Q.; YANG, D. L.; ZHANG, N.; NI. W.,

Isoprenaline and aminophylline relax bronchial smooth muscle by cAMP-induced stimulation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 5, p. 408-414, 2003.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 3, p. 366-398, 2006.

LUGNIER, C.; STIERLE, A.; BERETZ, A.; SCHOEFFTER, P.; LE BEC, A.; WERMUTH, C. G.; CAZENAVE, J. P.; STOCLET, J. C. Tissue and substrate specificity of inhibition by alkoxyaryl- lactams of platelet and arterial smooth muscle cyclic nucleotide phosphodiesterases relationship to pharmacological activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 113, p. 954, 1983.

MANOLOPOULOS, V. G.; SAMET, M. M.; LELKES, P. I. Regulation of the adenylyl cyclase signaling system in various types of cultured endothelial cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 57 p.590-598, 1995.

MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S. Global Initiative for Asthma (GINA) program: the global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, v. 59, p. 469–478, 2004.

MASON, H. S.; LATTEN, M. J.; GODOY, L. D.; HOROWITZ, B.; KENYON, J. L. Modulation of $Kv1.5$ currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. **Molecular Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 285-293, 2002.

MAURICE, D. H.; KE, H.; AHMAD, F.; WANG, Y.; CHUNG, J.; MANGANIELLO, V. C. Advances in targeting cyclic nucleotide fosfodiesterases. **Nature Reviews**, v.13, p. 290, 2014.

MOKRY, J.; MOKRA, D. Immunological aspects of phosphodiesterase inhibition in the respiratory system. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 187, p. 11, 2013.

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

MONTANO, L. M.; BAZAN-PERKINS, B.; Resting calcium influx in airway smooth muscle. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 83, n. 8-9, p. 717-23, 2005.

MOORE, W. C.; BLEECKER, E. R.; CURRAN-EVERETT, D.; ERZURUM, S. C.; AMEREDES, B. T.; BACHARIER, L.; CALHOUN, W. J.; CASTRO, M.; CHUNG, K. F.; CLARK, M. P.; DWEIK, R. A.; FITZPATRICK, A. M.; GASTON, B.; HEW, M.; HUSSAIN, I.; JARJOUR, N. N.; ISRAEL, E.; LEVY, B. D.; MURPHY, J. R.; PETERS, S. P.; TEAGUE, W. G.; MEYERS, D. A.; BUSSE, W. W.; WENZEL, S. E.; National Heart, Lung, Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Characterization of

the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 405–413, 2007.

MORETTO, N.; CARUSO, P.; BOSCO, R.; MARCHINI, G.; PASTORE, F.; ARMANI, E.; AMARI, G.; RIZZI, A.; GHIDINI, E.; FANTI, R.; CAPALDI, C.; CARZANIGA, L.; HIRSCH, E.; BUCCELLATI, C.; SALA, A.; CARNINI, C.; PATACCHINI, R.; DELCANALE, M.; CIVELLI, M.; VILLETTI, G.; FACCHINETTI, F., CHF6001, a novel highly potent and selective phosphodiesterase 4 inhibitor with robust anti-inflammatory activity and suitable for topical pulmonary administration. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, In press, 2015.

MORGAN, S. J.; DESHPANDE, D. A.; TIEGS, B. C.; MISIOR, A. M.; YAN, H.; HERSHFELD, A. V.; RICH, T. C.; PANETTIERI, R. A.; AN, S. S.; PENN, R. B. Agonist-mediated Relaxation of Airway Smooth Muscle Is Protein Kinase A-dependent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 33, p. 23065–23074, 2014.

MOULTON, B. C.; FRYER, A. D. Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and DPOC. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, p. 44, 2011.

NAGATOMO, T.; KOIKE, K. Recent advances in structure, binding sites with ligands and pharmacological function of β -adrenoceptors obtained by molecular biology and molecular modeling. **Life Sciences**, v. 66, p. 2419–2426, 2000.

NGKELO, A.; ADCOCK, I. M. New treatments for DPOC. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, p. 362, 2013.

NIJKAMP, F. P. β -Adrenergic receptors in the lung: an introduction. **Life Sciences**, v. 52, p. 2073–2082, 1993.

NUNES, I. K. C., Novos inibidores de fosfodiesterases 4 análogos de Lassbio-488 – desenho, síntese e análise comparativa de suas propriedades físico-químicas e cinéticas. **Tese (doutorado Farmacologia e Química Medicinal)** – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

OMORI, K.; KOTERA, J., Overview of PDEs and their regulation. **Circulation Research**, v. 100, n. 3, p. 309-327, 2007.

PAGE, C. P.; SPINA, D. Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, p. 275-286, 2012.

PALMEIRA-FILHO, P. L.; PAN, S. S. K., Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. **BNDES Setorial**, v. 1, n. 18, p. 3-22, 2003.

PEREZ-ZOGHBI, J. F.; BAI, Y.; SANDERSON, M. J., Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation by decreasing the frequency of agonist-induced Ca^{2+} oscillations. **The Journal of General Physiology**, v. 135, n. 3, p. 247-259, 2010.

- REMBOLD, C. M., Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány, M. **Biochemistry of Smooth Contraction**. San Diego: Academic Press, p. 227-239, 1996.
- RENNARD, S. I. Treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**, v. 364, p. 791, 2004.
- SANZ, M. J.; CORTIJO, J.; MORCILLO, E. J. PDE4 inhibitors as new antiinflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, p. 269, 2005.
- SBPT, Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma, **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, p. S1-S46, 2012.
- SCHWABE, U.; MIYAKE, M.; OHGAM Y.; DALY, J. W. 4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711): a potent inhibitor of adenosine cyclic 3' 5'-monophosphate phosphodiesterases in homogenates and tissue slices from rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 12, p. 900, 1976.
- SCOPES, K. R. Enzyme Activity and Assays, **Nature**, 2002.
- SELDON, P. M.; MEJA, K. K.; GIEMBYCZ, M. A. Rolipram, salbutamol and prostaglandin E2 suppress TNF α release from human monocytes by activating Type II cAMP-dependent protein kinase. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 18, p. 277-284, 2005.
- SEMMLER, J.; WACHTEL, H.; ENDRES, S., The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppresses tumor necrosis factor- α production by human mononuclear cells. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 409-413, 1993.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V., Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.
- SOMMER, N.; LÖSCHMANN, P. A.; NORTHOFF, G. H.; WELLER, M.; STEINBRECHER, A.; STEINBACH, J. P.; LICHTENFELS, R.; MEYERMANN, R.; RIETHMÜLLER, A.; FONTANA, A., The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis. **Nature Medicine**, v. 1, n. 3, p. 244-248, 1995.
- SPINA, D. PDE4 inhibitors: current status. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, p. 308, 2008.
- SPINA, D., The potential of PDE4 inhibitors in asthma or COPD. **Current opinion in investigational drugs**, v. 1, p. 204-213, 2000.
- SULLIVAN, P.; BEKIR, S.; JAFFAR, Z.; PAGE, C.; JEFFERY, P.; COSTELLO, J. Antiinflammatory effects of low-dose oral theophylline in atopic asthma. **Lancet**, v. 343, p. 1006, 1994.

SUTHERLAND, E. W.; RALL, T. W. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 232, p. 1077, 1958.

SUTHERLAND, E. W.; RALL, T. W. The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg⁺⁺, and epinephrine or glucagon. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 3607-3610, 1957.

TANAKA Y, HORINOUCI T, KOIKE K. New insights into α -adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 503-514, 2005.

TANAKA, Y.; YAMASHITA, Y.; HORINOUCI, T.; KOIKE, K. Adrenaline produces the relaxation of guinea-pig airway smooth muscle primarily through the mediation of 2-adrenoceptors. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 41, p. 153-161, 2005.

TANNHEIMER, S. L.; SORENSEN, E. A.; HARAN, A. C.; MANSFIELD, C. N.; WRIGHT, C. D.; SALMON, M. Additive anti-inflammatory effects of beta 2 adrenoceptor agonists or glucocorticosteroid with roflumilast in human peripheral blood mononuclear cells. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, p.178–184, 2012a.

TANNHEIMER, S. L.; WRIGHT, C. D.; SALMON, M. Combination of roflumilast with a beta-2 adrenergic receptor agonist inhibits proinflammatory and profibrotic mediator release from human lung fibroblasts. **Respiratory Research**, v. 13, p. 28, 2012b.

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y., Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, n. 1, p. 310-316, 1987.

VAN BREEMEN, C.; SAIDA, K., Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ smooth muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p.315-329, 1989.

VASSALLO, R.; LIPSKY, J. Theophylline: recent advances in the understanding of its mode of action and uses in clinical practice. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 73, p. 346-354, 1998.

VIEIRA, A. L. G., Expressão gênica diferencial durante a esporulação de *Blastocladiella emersonii* e estudo da sinalização por GMPc. São Paulo, 182. **Tese de Doutorado**. Instituto de Química; Universidade de São Paulo, 2009.

WACHTEL, H. Characteristic behavioural alterations in rats induced by rolipram and other selective adenosine cyclic 3,5- monophosphate phosphodiesterase inhibitors. **Psychopharmacology**, v. 77, p. 309, 1982.

WACHTEL, H. Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 3, p. 267-72, 1983.

WALDECK, B. Beta-adrenoceptor agonists and asthma: 100 years of development. **European Journal of Pharmacology**, v. 1, p. 445, 2002.

WALSH, D. A.; VAN PATTEN, S. M. Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. **FASEB Journal**, v. 8, n. 15, p. 1227-1236, 1994.

WEINBERGER, M.; HENDELES, L. Theophylline in asthma. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 1380, 1996.

WERMUTH, C-G., GANELLIN, C. R., LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 1998.

WERMUTH, C-G., **The Practice of Medicinal Chemistry. Ed.; Academic Press: New York**, p. 3, 2001.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int>> Acesso em: 20/07/2015 (2015).

WINKLHOFER, M.; MATTHIAS, K.; SEIFERT, G.; STOCKER, M.; SEWING, S.; HERGET, T.; STEINHÄUSER, C.; SAALER-REINHARDT, S. Analysis of phosphorylation-dependent modulation of K_v1.1 potassium channels. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 6, p. 829-842, 2003.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M., The paradox of smooth muscle physiology, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna, **Química Nova**, v. 24, p.147, 2001.

Anexo

Anexo A: Certidão de aprovação da Comissão Ética no Uso Animal (CEUA).



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIDÃO (2ª VIA)

João Pessoa, 31 de julho de 2015.
CEUA nº 0610/11.

Ilmo(a): **Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva**
Departamento Ciências Farmacêuticas – CCS – UFPB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL RELAXANTE DE UMA NOVA SÉRIE DE INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE-4 NO MODELO DE MUSCULO LISO DAS VIAS AÉRIAS DE COBAIAS NÃO ASMÁTICOS E ASMÁTICOS.**

Com previsão de empregar **160 cobaias;**
Animais do **Biotério Prof. Thomas George;**
Para serem utilizados no período de **março/2012 a dezembro/2015.**

Atenciosamente,

Isiania Giselia Albuquerque Gonçalves

Profa. Dra. Isiania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB

Prof. Dr. Isiania G. A. Gonçalves
Coordenadora CEUA/UFPB
SIAPE 3366301

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Universidade Federal da Paraíba
www.ufpb.br/ceua/ - ceua@ufpb.br