

**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos**

Maria da Conceição Correia Silva

**Derivados sulfonamídicos do LASSBio-448 relaxam a traqueia de cobaia com
inflamação pulmonar alérgica crônica: papel das vias do óxido nítrico e das
ciclo-oxigenases na ação relaxante do LASSBio-1611**

**João Pessoa-PB
2019**

Maria da Conceição Correia Silva

Derivados sulfonamídicos do LASSBio-448 relaxam a traqueia de cobaia com inflamação pulmonar alérgica crônica: papel das vias do óxido nítrico e das ciclo-oxigenases na ação relaxante do LASSBio-1611

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

**João Pessoa-PB
2019**

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

S586d Silva, Maria da Conceição Correia.

Derivados sulfonamídicos do LASSBio-448 relaxam a traqueia de cobaia com inflamação pulmonar alérgica crônica: papel das vias do óxido nítrico e das ciclo-oxigenases na ação relaxante do LASSBio-1611 / Maria da Conceição Correia Silva. - João Pessoa, 2019. 198 f. : il.

Orientação: Bagnólia Araújo da Silva.

Coorientação: Fabiana de Andrade Cavalcante.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. LASSBios. 2. Vias aéreas. 3. Asma. 4. Óxido nítrico. 5. Canais de cálcio. I. Araújo da Silva, Bagnólia. II. de Andrade Cavalcante, Fabiana. III. Título.

UFPB/BC

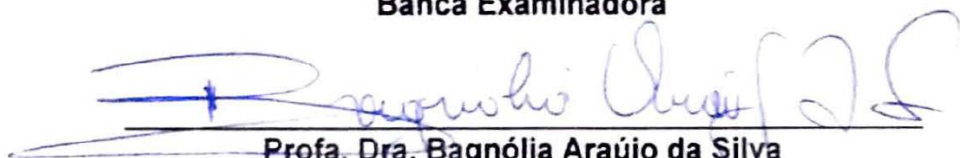
Maria da Conceição Correia Silva

Derivados sulfonamídicos do LASSBio-448 relaxam a traqueia de cobaia com inflamação pulmonar alérgica crônica: papel das vias do óxido nítrico e das ciclo-oxigenases na ação relaxante do LASSBio-1611

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **Farmacologia**.

Aprovada em 29/03/2019

Banca Examinadora



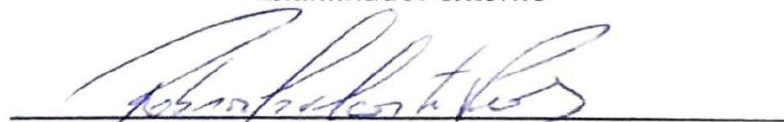
Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora



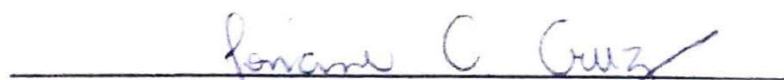
Prof. Dr. André Sampaio Pupo
(Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”)
Examinador externo



Prof. Dr. Claudio Gabriel Lima Junior
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador externo



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



Profa. Dra. Josiane de Campos Cruz
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora externa

Dedicatórias

Dedico este trabalho, em especial aos meus pais, João Ferreira da Silva e Maria das Mercês Correia da Silva. A vocês, toda a minha gratidão, o meu amor e o meu carinho, como forma de reconhecimento por tudo que fizeram e fazem por mim. Sempre preocupados com meu futuro, mas me apoiando em muitas das minhas escolhas, vocês me ajudaram nesta conquista, portanto, não é só minha, divido com vocês. Obrigada pela paciência, pelo amor e pelos grandes ensinamentos, que são essenciais a vida.

Aos meus irmãos, D'jalma Correia Silva, Diógenes Correia Silva e Daniel Correia Silva, por cada olhar, cada gesto de apoio e de reconhecimento. Essa conquista também é de vocês.

Aos meus sobrinhos, Danyelle de Farias Silva, Karla Emanuely de Queiroz Silva, Diogo Aparício de Farias Silva e Laura Farias Correia, por cada momento de diversão, de carinho e de amor.

Ao meu avô, José Severino de Farias (*in memoriam*), tudo isso começou com seu apoio.

Amo muito todos vocês!

Agradecimentos

Se algum dia alguém me perguntar se esta foi a parte mais fácil de escrever, direi que não, e não saberei ao certo o motivo! Talvez porque os sentimentos, a gratidão e o aprendizado pelas e com as pessoas com as quais convivemos não sejam mensurados com base em uma análise de variância *one-way* ou um teste *t* de Student, nem por um valor de $p < 0,05$. Muitas vezes, um sorriso e um abraço sinceros, às vezes, até de quem eu mal conhecia, me reerguiam e me impulsionavam a continuar, talvez não me lembre de todos nesse momento, mas tenha consciência que você foi essencial para que eu chegasse até aqui, mesmo que aquele gesto te parecesse o mais simples. Por isso, eu preciso agradecer:

A Deus, criador de todas as coisas, que em muitos momentos nessa caminhada me segurou em seus braços, principalmente, em um daqueles mais difíceis nesses quatro anos. Buscar apoio e consolo em suas palavras, nas mensagens dominicais me fortaleciam e me fizeram superar cada obstáculo.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, minha orientadora, professora e amiga, por todo apoio e ensinamento nesses quatro anos, por me encorajar nos momentos difíceis, pelos conselhos quase que diários, sempre incentivando a sermos melhores a cada dia, não só como profissionais, mas como seres humanos, por toda confiança e também pelos momentos de diversão. Uma das melhores professoras que conheci, uma profissional dedicada, que ama lecionar e nos inspira a cada dia e uma líder, que procura extrair o melhor de cada um de sua equipe. Serei sempre grata por tudo que aprendi com você, não só no doutorado, mas durante esses nove anos de convivência.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, minha coorientadora e professora, por toda disponibilidade em ajudar sempre que precisei, por também me incentivar nos momentos de desânimo, pelos ensinamentos e momentos de descontração e por todo o apoio desde o mestrado.

Aos Profs. Drs. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro e Lídia Moreira Lima do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pela gentileza em ceder as substâncias-teste, objeto de estudo deste trabalho, e por toda disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

À Dra. Luciana Scotti do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por toda sua disponibilidade e parceria na realização do *docking* molecular. Um exemplo de superação na vida profissional e pessoal, que diante das dificuldades não se recusou a viver e nos inspira a nunca desistirmos.

À Dra. Roberta Parentoni Nunes, José Crispim Duarte, Adriano Cordeiro, Gilmário Moreira Lima e Luís Cordeiro Silva, por toda disponibilidade em me ajudar com o manejo, o transporte e o cuidado na criação dos animais na Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM).

Aos Profs. Drs. Robson Cavalcante Veras do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF)/CCS/UFPB, Camille de Moura Balarini do Departamento de Fisiologia e Patologia (DFP)/CCS/UFPB e Márcia Regina Piuvezam do PPgPNSB/CCS/UFPB, examinadores titulares, e Tatjana Keesen de Souza Lima do Departamento de Biologia Celular e Molecular (DBCM) do Centro de Biotecnologia (CBiotec)/UFPB, examinadora suplente, por terem aceitado compor a banca avaliadora do Exame de Qualificação, por todas as considerações para melhorar este trabalho e por contribuírem para a minha formação acadêmica.

Aos Profs. Drs. André Sampaio Pupo do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Claudio Gabriel Lima Junior do Departamento de Química (DQ) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN)/UFPB, Robson Cavalcante Veras do DCF/CCS/UFPB e Josiane de Campos Cruz do Departamento de Biotecnologia do CBiotec/UFPB, examinadores titulares, Claudio Roberto Bezerra dos Santos do DFP/CCS/UFPB e Camille de Moura Balarini do DFP/CCS/UFPB, examinadores suplentes, da banca de defesa de tese, por aceitarem participar da banca de avaliação, por todas as considerações/sugestões e por contribuírem para a versão final deste trabalho.

A todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender durante a vida escolar, do Curso de Graduação em Farmácia da UFPB e do PPgPNSB, em especial aqueles que estão sempre instigando a curiosidade dos discentes, não só em sala de aula, e por serem exemplos de bons profissionais: Adalberto Coelho da Costa, Alba Fracinete Caiaffo Costa, Bagnólia A. da Silva, Demétrius Antônio Machado de Araújo, Eduardo de Jesus Oliveira, Elizete Ventura do Monte, Fabiana de A. Cavalcante, Fábio Santos de Souza, Francisca Inês de Souza Freitas, Josean

Fechine Tavares, Leônia Maria Batista, Luís Fernando Marques dos Santos, Márcia R. Piuvezam, Robson C. Veras, Rossana Maria Souto Maior Serrano, Tatjana Keesen de S. Lima e Zélia Braz Vieira da Silva Pontes.

À Coordenação do PPgPNSB, em nome do coordenador, Prof. Dr. Josean F. Tavares, e do vice-coordenador, Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, pela competência, dedicação e esforço para manter a qualidade desse Programa. E em nome das secretárias, Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguiera e Nilmar Nincia Neves de Medeiros, pela disponibilidade e ajuda sempre que precisávamos.

Aos Profs. Drs. Josean F. Tavares, Márcia R. Piuvezam e Marianna Vieira Sobral do PPgPNSB/CCS/UFPB, com quem compunha a Comissão de Gestão dos Programas em Excelência Acadêmica (CG-PROEX), por todos os ensinamentos burocráticos, pela maneira com que conduziam as reuniões e pela dedicação em prol de todos que fazem o PPgPNSB.

Àqueles que me ensinaram os primeiros passos de bancada durante a iniciação científica no Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas”, Ana Carolina de Carvalho Correia, Cibério Landim Macêdo, Fabio de Souza Monteiro, Gislaine Alves de Oliveira, Italo Rossi Roseno Martins e Rafael de Almeida Travassos.

À Alana Cristina Costa e Iana Vitória de Souza Oliveira, alunas de iniciação científica vinculadas a este projeto. Essa conquista também é de vocês, grata por toda ajuda, pelo companheirismo e pelas contribuições essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Gleice Rayanne da Silva, mestranda, e Francisco Fernandes Lacerda Júnior, aluno de iniciação científica, por toda ajuda e disponibilidade para a realização deste trabalho, pelo cuidado, pela amizade e pelos bons momentos juntos.

À Paula Benvindo Ferreira, doutoranda, e Anderson Fellyp Avelino Diniz, mestrando, pelo companheirismo, por estarem sempre dispostos a ajudar e pela boa convivência durante esses anos.

Ao Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos, por toda ajuda, pelos momentos de aprendizado juntos e pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho, desde a época em que começamos a implantar o modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.

A toda equipe dos "relaxados" que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Farmacologia Funcional "Prof. George Thomas" do PPgPNSB: Aline de Freitas Brito, Ana Caroline de Lima Silva, Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva, Bárbara Cavalcanti Barros, Cleyton Oliveira Bezerra, Elba dos Santos Ferreira, Eurípedes Targino Linhares Neto, Fernando Ramos Queiroga, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Giuliana Amanda de Oliveira, Giulyane Targino Aires Moreno, Hannah Olga Pereira Rodovalho, Iara Leão Luna de Souza, Indyra Alencar Duarte Figueiredo, João Pedro Moura Lima, Joedna Cavalcante Pereira, José Lucas Ferreira Marques Galvão, José Wilamy Cosme Rabêlo, Juliana da Nóbrega Carreiro, Kimã Barbosa Meira, Laiz Aline Silva Brasileiro, Layanne Cabral da Cunha Araujo, Luan Diniz Pessoa, Manoel Vieira Duvirgens, Maria Alice Miranda Bezerra Medeiros, Maria Thaynan de Lima Carvalho, Millena de Melo Medeiros, Petruska Pessoa da Silva Souza, Polyana Cristina Barros Silva, Rafael Lima Marinho Paiva, Rayane Fernandes Pessoa, Renata de Souza Sampaio, Sarah Rebeca Dantas Ferreira, Sérgio Ricardo Stuckert Seixas, Tamyris Freires Ferreira, Thainá Maria Costa Fernandes de Moura e Thiago Afonso Rodrigues Melo por toda ajuda, amizade, convivência, apoio científico e de bancada desde a iniciação científica.

Aos colegas e amigos das turmas abril/2015 e março/2016 de doutorado do PPgPNSB, especialmente, Anderson Angel Vieira Pinheiro, Cinthia Rodrigues Melo, Daiana Karla Frade Silva, Daniele de Figueredo Silva, Kaio Aragão Sales, Márcio Vinícius Cahino Terto, Luiz Henrique Agra Cavalcante da Silva, Renan Marinho Braga, Roseana Araújo Ramos Meireles, Priscilla Maria Pereira Maciel, Sâmia Sousa Duarte e Thaís Bezerra Mangeon Honorato.

A Luiz Henrique A. C. da Silva, doutorando do Laboratório de Imunofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB, pela ajuda e ensinamentos na técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática.

Ao Prof. Dr. Claudio Gabriel L. Junior do DQ/CCEN/UFPB, pelo fornecimento de água destilada e por toda disponibilidade em me receber como ouvinte em suas aulas de Química Orgânica, sempre respondendo todas as dúvidas e pelos ensinamentos sobre a disciplina e para a vida profissional.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva, ao Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa e aos funcionários Evandro Ferreira da Silva, Marcelo Felipe Rodrigues e Edvaldo dos Santos Júnior do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA),

por toda disponibilidade em ceder nitrogênio líquido para a realização de alguns experimentos.

Ao Prof. Dr. Demétrius Antônio M. de Araújo, à Dra. Teresa Cristina Soares de Lima Grisi e a Renata Priscila Almeida Silva (doutoranda) do Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular do CBIotec/UFPB, por toda disponibilidade em armazenar e congelar algumas amostras biológicas.

Ao Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do PPgPNSB/CCS/UFPB e sua equipe, pelo fornecimento de água osmose reversa, disponibilidade de pHmetro e coleguismo.

À Mônica Rodrigues da Silva, Avani Soares e Lusinete Santos, por toda dedicação e pelos trabalhos prestados ao laboratório e ao Programa.

Às comissões organizadoras e aos participantes dos I, II, III e IV Cursos de Verão de Farmacologia do PPgPNSB, pelo aprendizado científico e de organização desses eventos, pelas amizades formadas e pelos momentos de diversão.

Aos demais amigos que estavam sempre na torcida e apoiando a realização dessa etapa em minha vida, em especial: Alda Lídia, Alexandra Leite, Ana Maria Lopes, Antônio Justino, Cristiane Lourenço, Daniel Cristino, Eduardo Cavalcante, Emmanuel Farias, Fabiana Carla, Fabrícia Lucimery, Felipe Nóbrega, Genivaldo dos Reis Neto, Gicélia Sobral, Graças Farias, Herta Ellen Moreira, Inalva Silva, Iran Moises, Jéssica Hanne, João Paulo Messias, Juliana Monteiro, Lídia Lúcia, Liliane Queirós, Luana Lívia de Souza, Luana Santos, Luzineide Queiroz, Lusinete Queiroz, Milena Coutinho, Rosildo Diniz, Shellygton Lima, Silene Meira, Silvânia Barreto e Thaylan Martins.

Ao grande amigo, Francisco Casimiro Júnior, por todo companheirismo, amizade, apoio, cuidado, momentos de diversão, passeios, por estar sempre presente, mesmo que não fisicamente, e por toda força e torcida de sempre.

Ao Fisioterapeuta, Ricardo Alexandre Wanderley Arcoverde, e à Educadora Física, Cybelle de Arruda Navarro Silva, pelas inúmeras vezes que aliviaram minhas dores físicas e tensões, contribuindo para aumentar meu rendimento na elaboração deste trabalho.

A toda minha família, em especial aos meus pais, irmãos, cunhadas, sobrinhos, madrinha, tios e primos, pela força, amor, carinho e confiança depositados em mim.

Ao Conselho Federal de Farmácia, em nome do tesoureiro, Prof. João Samuel de Moraes Meira, pelo apoio para a participação em eventos científicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa concedida, pelo suporte financeiro e técnico-científico por meio do PROEX e do Portal Periódicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela aprovação e financiamento de projetos sob a coordenação de minhas orientadoras.

Ao Centro de Ciências da Saúde, em nome do diretor, Prof. Dr. João Euclides Fernandes Braga, pelo apoio institucional.

Ao IPeFarM, em nome do diretor, Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo, pelo apoio institucional.

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

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Minha gratidão,

Maria da Conceição Correia Silva

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

(Paulo Freire)

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crônica e multifatorial do sistema respiratório, caracterizada por remodelamento e hiper-responsividade brônquica, com tratamento voltado para prevenir sintomas e crises agudas. Nesse sentido, ainda faz-se necessário o aperfeiçoamento de moléculas e testes em modelos animais como o de inflamação pulmonar alérgica crônica (IPAC) induzida por ovalbumina para se chegar a um tratamento mais eficaz. Portanto, avaliou-se o possível efeito relaxante do LASSBio-448 e de 12 derivados, bem como investigou-se o mecanismo de ação relaxante do LASSBio mais potente em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (GC) e com IPAC (GIPAC). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (Certidão Nº 018/2015). O LASSBio-448 relaxou a traqueia com e sem epitélio do GIPAC. Assim como o protótipo, os LASSBios *N*-metilssulfonamídicos (-1610, -1630, -1631, -1628, -1612 e -1623) e sulfonamídicos (-1622, -1613, -1722, -1629, -1625 e -1611) também relaxaram, a traqueia com e sem epitélio funcional, pré-contráida com carbacol, do GC e do GIPAC, sendo o LASSBio-1611 o mais potente de todos quando comparado ao LASSBio-448, na ausência de epitélio, tanto no GC (1.380 vezes) como no GIPAC (575 vezes). Sendo assim, decidiu-se investigar seu mecanismo de ação relaxante em traqueia de cobaia na ausência de epitélio do GIPAC. Como uma das vias de relaxamento nas vias aéreas é a do óxido nítrico (NO), decidiu-se avaliar se a via da sintase do NO (NOS)/ciclase de guanilil solúvel (sGC)/proteína cinase G (PKG) seria ativada por esse derivado. A potência relaxante do LASSBio-1611 foi reduzida na presença de L-NAME, de ODQ e de Rp-8-Br-PET-cGMPS, inibidores da NOS, da sGC e da PKG em aproximadamente 170, 155 e 195 vezes, respectivamente. Além disso, a potência inibitória do L-NAME sobre o efeito relaxante do LASSBio-1611 foi revertida na presença do substrato de NOS, L-arginina. Esses resultados fornecem indícios de que esse derivado ativa essa via de sinalização para relaxar a traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio. Como os canais de K⁺ e os de Ca²⁺ dependentes de voltagem são alvos da PKG, avaliou-se o efeito do LASSBio-1611 sobre as contrações induzidas por 18 ou 60 mM de KCl, observando uma equipotência, sugerindo um possível bloqueio do influxo de Ca²⁺. Esse bloqueio foi confirmado pelo deslocamento da curva concentração-resposta cumulativa ao CaCl₂ de maneira paralela para a direita com redução do E_{max} na presença de diferentes concentrações do LASSBio-1611. Além disso, há evidências de uma interligação entre as vias da NOS e das ciclo-oxigenases (COXs) e se demonstrou que na presença de indometacina, um inibidor de COXs, e de indometacina + L-NAME, a potência relaxante do LASSBio-1611 foi reduzida bruscamente em 813 e 537 vezes, respectivamente, indicando que há uma modulação das COXs, que aumenta a produção de prostanoídes relaxantes nas vias aéreas. Adicionalmente, observou-se, *in silico*, que o LASSBio-1611 tem uma entalpia de formação do complexo ligante-macromolécula aumentada para as iNOS e nNOS, a PKG, o Ca_v1.2 e a COX-2, comparada a entalpia de ativadores e/ou inibidores padrões. Além disso, o LASSBio-1611 segue a regra de *Lipinski*, assim como apresenta características farmacocinéticas essenciais para um bom candidato a fármaco. Portanto, de maneira geral, todos os LASSBios relaxam traqueia de cobaia, tanto do GC como do GIPAC e que o mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1611 no GIPAC, sem epitélio, é dependente das vias NOS/sGC/PKG e COXs. Essa potência relaxante aumentada do LASSBio-1611 pode ser em decorrência da inserção do substituinte 1-naftila na função sulfonamida, aumentando sua lipofilicidade.

Palavras-chave: LASSBios. Vias aéreas. Asma. Óxido nítrico. Canais de cálcio.

ABSTRACT

Asthma is a chronic and multifactorial inflammatory disease of the respiratory system, characterized by bronchial remodeling and hyperresponsiveness, with treatment aimed to preventing symptoms and acute attacks. Thus, it is still necessary to improve molecules testing in animal models such as chronic allergic pulmonary inflammation (IPAC) induced by ovalbumin focusing a more effective treatment. For this, it was evaluated a possible relaxant effect of LASSBio-448 and 12 derivatives, as well as well it was investigated the mechanism of action of the most potent LASSBio in guinea pig trachea from control (GC) and IPAC (GIPAC) groups. The experimental procedures were approved by Ethic Comission on Animal Use of UFPB (protocol N° 018/2015). LASSBio-448 relaxed trachea in both the presence and presence of epithelium of GIPAC. As showed by the prototype, the *N*-methylsulfonamide LASSBios (-1610, -1630, -1631, -1628, -1612 e -1623) and sulfonamidic LASSBios (-1622, -1613, -1722, -1629, -1625 e -1611) also relaxed trachea in both the presence and absence of epithelium, carbachol-contracted, from GC and GIPAC, being LASSBio-1611 the most potent of all when compared to LASSBio-448, in the absence of epithelium, in both GC (1,380-fold) and GIPAC (575-fold). Thus, it was decided to investigate its mechanism of relaxant action in trachea denuded of epithelium from GIPAC. Considering that the airway relaxation has the participation of nitric oxide (NO), it was decided to evaluate whether the NO synthase (NOS)/soluble guanylyl cyclase (sGC)/protein kinase G (PKG) would be activated by this derivative. The relaxant potency of LASSBio-1611 was reduced in the presence of L-NAME, ODQ and Rp-8-Br-PET-cGMPS, inhibitors of NOS, sGC and PKG, by approximately 170-, 155- and 195-fold, respectively. In addition, the inhibitory effect of L-NAME on the relaxing effect of LASSBio-1611 was reversed in the presence of L-arginine, the NOS substrate. These results provide strong evidence that this derivative activates this signaling pathway to relax denuded guinea pig trachea with IPAC. As the K⁺ and voltage-sensitive Ca²⁺ channels are targets of PKG, the inhibitory effect of LASSBio-1611 was tested on contractions induced by 18 or 60 mM KCl, observing an equipotency, suggesting a possible blockage of Ca²⁺ influx. This blockade was confirmed since the cumulative concentration-response curve to CaCl₂ was paralleled shifted to the right with reduction of E_{max} in the presence of different concentrations of LASSBio-1611. There is evidence of an interconnection between the NOS and the cyclooxygenases (COXs) pathways, and it was observed that in the presence of indomethacin, an inhibitor of COXs, and indomethacin + L-NAME, the relaxing potency of LASSBio-1611 was considerably reduced 813- and 537-fold, respectively, indicating that there is modulation of COX, increasing the production of relaxant prostanoids in the airways. In addition, it was observed that, *in silico*, LASSBio-1611 has an enthalpy of formation of the ligand-macromolecule complex increased for the iNOS, nNOS, PKG, Ca_v1.2 and COX-2, compared to the enthalpy of standards activators and/or inhibitors. Besides, the LASSBio-1611 follows the *Lipinski's* rule as well as exhibits essential pharmacokinetic characteristics for a good drug candidate. Therefore, in general, all LASSBios relax guinea pig trachea of both GC and GIPAC, and that the relaxant mechanism of action of LASSBio-1611 in the GIPAC, denuded epithelium, is dependent on the NOS/sGC/PKG and COXs pathways. This increased relaxant potency of LASSBio-1611 is due to the insertion of the 1-naphthyl substituent into the sulfonamide function, increasing its lipophilicity.

Keywords: LASSBios. Airways. Asthma. Nitric Oxide. Calcium channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático dos processos inflamatórios e remodeladores que contribuem potencialmente para a hiper-responsividade das vias aéreas e para a obstrução do fluxo aéreo	35
Figura 2 – Passos para escolha do tratamento da asma de acordo com as manifestações clínicas	39
Figura 3 – Rota sintética empregada para obtenção dos compostos sulfonamídicos	43
Figura 4 – Estrutura química do LASSBio-448	44
Figura 5 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+	49
Figura 6 – Estrutura funcional dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1	51
Figura 7 – Esquema do mecanismo farmacomecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{q/11}$ -PLC β 1	52
Figura 8 – Estrutura funcional das sintases do óxido nítrico	55
Figura 9 – Estrutura funcional da ciclase de guanilil solúvel	56
Figura 10 – Estrutura funcional da proteína cinase G do tipo I	57
Figura 11 – Esquema do mecanismo farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s /AC/PKA e NO/sGC/PKG	59
Figura 12 – Aparelho utilizado para indução de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaia	66
Figura 13 – Protocolo representativo da indução de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaia	66
Figura 14 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-448 em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	76
Figura 15 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1630 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	82
Figura 16 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1610 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	84

Figura 17 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1631 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	86
Figura 18 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1628 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	88
Figura 19 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1612 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	90
Figura 20 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1623 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	92
Figura 21 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1622 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	98
Figura 22 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1613 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	100
Figura 23 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1722 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	102
Figura 24 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1629 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	104
Figura 25 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1625 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	106
Figura 26 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	108
Figura 27 – Registros originais representativos da reatividade contrátil ao CCh em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência e na presença do LASSBio-1611	113

Figura 28 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com CCh na ausência e na presença de L-NAME e de L-arginina + L-NAME	116
Figura 29 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com CCh na ausência e na presença de ODQ	119
Figura 30 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com CCh na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS	122
Figura 31 – Registros originais representativos do efeito relaxante da aminofilina/sildenafil em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com CCh na ausência e na presença do LASSBio-1611..	125
Figura 32 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 18 ou 60 mM de KCl.....	128
Figura 33 – Registros originais representativos da reatividade contrátil ao CaCl_2 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência e na presença do LASSBio-1611	131
Figura 34 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com CCh na ausência e na presença de indometacina (B), de L-NAME + indometacina e de L-NAME.....	135
Figura 35 – Poses do <i>docking</i> molecular do LASSBio-1611 e da L-arginina em condições de domínio de ligação a NOS induzível e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima.....	139
Figura 36 – Poses do <i>docking</i> molecular do LASSBio-1611 e da L-arginina em condições de domínio de ligação a NOS neuronal e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima.....	140
Figura 37 – Poses do <i>docking</i> molecular do LASSBio-1611 e da cinaciguat em condições de domínio de ligação a ciclase de guanilil solúvel e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima.....	142
Figura 38 – Poses do <i>docking</i> molecular do LASSBio-1611 e do cGMP em condições de domínio de ligação a proteína cinase G e mapas de ligação	

representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima.....	144
Figura 39 – Poses do <i>docking</i> molecular do LASSBio-1611 e da sildenafil em condições de domínio de ligação a fosfodiesterase 5 e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima.....	146
Figura 40 – Poses do <i>docking</i> molecular do LASSBio-1611 e do nifedipino em condições de domínio de ligação com o canal de cálcio dependente de voltagem do tipo 1.2 e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima.....	148
Figura 41 – Poses do <i>docking</i> molecular do LASSBio-1611 e do etoricoxibe em condições de domínio de ligação com a ciclo-oxigenase-2 e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima.....	150
Figura 42 – Proposta de mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional.....	169

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Compostos, estruturas químicas e nomes químicos da série sulfonamídica.	45
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito relaxante do LASSBio-448 em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	77
Gráfico 2 – Efeito relaxante do LASSBio-1630 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	83
Gráfico 3 – Efeito relaxante do LASSBio-1610 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	85
Gráfico 4 – Efeito relaxante do LASSBio-1631 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	87
Gráfico 5 – Efeito relaxante do LASSBio-1628 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	89
Gráfico 6 – Efeito relaxante do LASSBio-1612 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	91
Gráfico 7 – Efeito relaxante do LASSBio-1623 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	93
Gráfico 8 – Efeito relaxante do LASSBio-1622 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	99
Gráfico 9 – Efeito relaxante do LASSBio-1613 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	101
Gráfico 10 – Efeito relaxante do LASSBio-1722 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	103
Gráfico 11 – Efeito relaxante do LASSBio-1629 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	105

Gráfico 12 – Efeito relaxante do LASSBio-1625 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	107
Gráfico 13 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	109
Gráfico 14 – Valores do pCE ₅₀ dos LASSBios-448, -1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629, -1625, -1613 e -1611 em traqueia isolada de cobaia do grupo controle, na presença e na ausência de epitélio funcional	110
Gráfico 15 – Valores do pCE ₅₀ dos LASSBios-448, -1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629, -1625, -1613 e -1611 em traqueia isolada de cobaia do grupo IPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional.....	111
Gráfico 16 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência e na presença do LASSBio-1611.....	114
Gráfico 17 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contráida com CCh na ausência e na presença de L-NAME e de L-arginina + L-NAME	117
Gráfico 18 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contráida com CCh na ausência e na presença de ODQ	120
Gráfico 19 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contráida com CCh na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS	123
Gráfico 20 – Efeito relaxante da aminofilina e da sildenafila em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contráida com CCh na ausência e na presença do LASSBio-1611	126
Gráfico 21 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contráida com 18 ou 60 mM de KCl	129
Gráfico 22 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl ₂ em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência e na presença do LASSBio-1611.....	133

Gráfico 23 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com CCh na ausência e na presença de indometacina, de L-NAME + indometacina e de 10^{-4} M de L-NAME.....136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1630 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	83
Tabela 2 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1610 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e GIPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	85
Tabela 3 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1631 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	87
Tabela 4 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1628 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	89
Tabela 5 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1612 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	91
Tabela 6 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1623 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	93
Tabela 7 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1622 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	99
Tabela 8 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1613 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	101
Tabela 9 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1722 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional	103
Tabela 10 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1629 em traqueia isolada de cobaia do grupo controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	105

Tabela 11 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1625 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	107
Tabela 12 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.....	109
Tabela 13 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do CCh em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência (controle) e na presença de 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M do LASSBio-1611	114
Tabela 14 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (controle) e na presença de substrato e/ou inibidores da via NOS/sGC/PKG/cGMP	123
Tabela 15 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do $CaCl_2$ em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência (controle) e na presença de 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M do LASSBio-1611	133
Tabela 16 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (controle) e na presença de inibidores das vias NOS/COX	136
Tabela 17 – Propriedades físico-químicas, calculadas <i>in silico</i> , para o LASSBio-1611.....	152
Tabela 18 – Propriedades farmacocinéticas, calculadas <i>in silico</i> , para o LASSBio-1611.....	152

LISTA DE ABREVIATURAS

4Ca²⁺-CaM	complexo cálcio-calmodulina
ΔH_f	entalpia de formação do complexo ligante-macromolécula
[Ca²⁺]_c	concentração citosólica de Ca ²⁺
[K⁺]_e	concentração extracelular de potássio
AA	ácido araquidônico
AAS	ácido acetilsalicílico
AC	ciclase de adenilil
ADMET	absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
ACh	acetilcolina
AMES	ensaio mutagênico <i>Salmonella</i> /microsoma
AMP	5'-monofosfato de adenosina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BH₄	tetra-hidrobiopterina
BK_{Ca}	canais de K ⁺ ativados pelo Ca ²⁺ de grande condutância
Caco-2	células de adenocarcinoma de cólon humano
CaM	calmodulina
cAMP	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
Ca_v	canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem
Ca_v1	Ca _v da família 1
CCh	carbacol
cGMP	3',5'-monofosfato cíclico de guanosina
CICR	liberação de Ca ²⁺ induzida pelo Ca ²⁺
COX	ciclo-oxigenase

DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
DAG	diacilglicerol
eNOS	sintase do óxido nítrico (NO) endotelial
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
FAD	dinucleotídio de adenina e flavina
FMN	mononucleotídio de flavina
F_{oral}	biodisponibilidade oral
G	proteína G heterotrimérica
GC	grupo controle
GDP	difosfato de guanosina
GIPAC	grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GMP	5'-monofosfato de guanosina
GTP	trifosfato de guanosina
Heme Fe³⁺	grupo prostético heme férrico
Heme Fe²⁺	grupo prostético heme ferroso
<i>hERG</i>	gene que codifica um subtipo de canal de potássio do coração
HML	(<i>human liver microsome</i>) estabilidade metabólica microssomal
IgE	imunoglobulina E
IK_{Ca}	canais de K ⁺ ativados pelo Ca ²⁺ de condutância intermediária
IL	interleucina
iNOS	sintase do NO induzível
IPAC	inflamação pulmonar alérgica crônica

IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	receptor de IP ₃
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
K_{ir}	canais de potássio retificadores de entrada
K_v	canais de potássio dependentes de voltagem
LABA	agonistas adrenérgicos β de ação longa
L-arg	L-arginina
LAMA	antimuscarínicos de ação longa
LASSBio[®]	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
logD	coeficiente de dissociação
logP	coeficiente de partição
L-NAME	cloridrato de N _ω -nitro-L-arginina metil éster
MBP	proteína básica principal
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da MLC
MLCP	fosfatase da MLC
MYPT1	subunidade catalítica da MLCP
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NANC	não colinérgico não adrenérgico
NCX	trocador sódio/cálcio
NO	óxido nítrico
nNOS	sintase do NO neuronal
O₂⁻	ânion superóxido
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
ONOO⁻	peroxinitrito

OVA	ovalbumina
pCE₅₀	logaritmo negativo, na base 10, da concentração de uma substância que promove 50% de seu efeito máximo
PDB	banco de dados de proteínas
PDE	fosfodiesterase
PGD₂	prostaglandina D ₂
PGE₂	prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	prostaglandina F _{2α}
PGI₂	prostaglandina I ₂
PI3-K	cinase-3 de fosfatidil inositol
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
pKa	constante de ionização
PKA	proteína cinase dependente de cAMP
PKC	proteína cinase dependente de cálcio
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLCβ1	fosfolipase C do tipo beta 1
PM	peso molecular
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
PPB	ligação a proteínas plasmáticas
R²	coeficiente de correlação não linear
RhoA	proteína G monomérica da família Rho do tipo A
ROC	canais de cálcio operados por receptor
ROCK	cinase da RhoA
RhoGEF	fator de troca de nucleotídeos de guanina seletivo para RhoA
Rp-8-Br-PET-cGMPS	Rp-8-bromo-β-fenil-1,N ² -etenoguanosina-3',5', monofosforotioato cíclico

RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SABA	agonistas adrenérgicos β de ação curta
SERCA	Ca^{2+} -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
sGC	ciclase de guanilil solúvel
SK_{Ca}	canais de K^{+} ativados pelo Ca^{2+} de pequena condutância
SNC	sistema nervoso central
Th2	linfócitos T <i>helper</i> 2
TxA₂	tromboxano A ₂
Vd	volume de distribuição

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

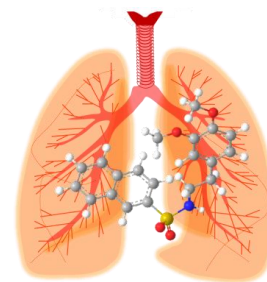
SUMÁRIO

1 Introdução	32
2 Fundamentação teórica	34
2.1 Asma	34
2.2 A Química Medicinal e a descoberta de inibidores de fosfodiesterases	39
2.2.1 Planejamento e síntese dos derivados sulfonamídicos	42
2.3 Docking molecular e estudos <i>in silico</i> no planejamento/desenvolvimento de novos fármacos	47
2.4 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso nas vias aéreas	48
3 Objetivos	61
4 Material e métodos	62
4.1 Material	62
4.1.1 Substâncias-teste	62
4.1.2 Animais	62
4.1.3 Substâncias e reagentes	63
4.1.4 Solução nutritiva	64
4.1.5 Aparelhos	64
4.2 Métodos	65
4.2.1 Preparação das soluções-estoque das substâncias-teste	65
4.2.2 Indução de inflamação pulmonar alérgica crônica por nebulização com ovalbumina em cobaia	65
4.2.3 Preparação dos anéis de traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e com inflamação pulmonar alérgica crônica	67
4.2.4 Triagem farmacológica do LASSBio-448 e de seus derivados <i>N</i> -metilssulfonamídicos e sulfonamídicos	68
4.2.4.1 Avaliação do efeito relaxante sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e com IPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional	68
4.2.5 Caracterização do mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional	69
4.2.5.1 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos no efeito relaxante do LASSBio-1611	69

4.2.5.2 Avaliação da participação da via do óxido nítrico no efeito relaxante do LASSBio-1611	69
4.2.5.2.1 Avaliação da participação da sintase do óxido nítrico em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de L-NAME e de L-arginina + L-NAME	69
4.2.5.2.2 Avaliação da participação da ciclase de guanilil solúvel em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de ODQ	70
4.2.5.2.3 Avaliação da participação da proteína cinase G em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS.....	70
4.2.5.3 Avaliação da participação da fosfodiesterase 5 no efeito relaxante do LASSBio-1611	71
4.2.5.3.1 Avaliação do efeito relaxante da sildenafil em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença do LASSBio-1611	71
4.2.5.4 Avaliação da participação dos canais de potássio e/ou de cálcio dependentes de voltagem no efeito relaxante do LASSBio-1611.....	71
4.2.5.4.1 Avaliação do efeito relaxante do LASSBio-1611 sobre as contrações tônicas induzidas por 18 ou por 60 mM de KCl em traqueia isolada de cobaia com IPAC	71
4.2.5.4.2 Avaliação da reatividade contrátil ao cloreto de cálcio em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência e na presença do LASSBio-1611	72
4.2.5.5 Avaliação da participação da via das ciclo-oxigenases no efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de indometacina e de L-NAME + indometacina.....	72
4.2.5.6 Estudo de <i>docking</i> molecular.....	73
4.2.5.6.1 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou ligantes padrões e os alvos moleculares: NOS, sGC, PKG, PDE5, Ca _v 1.2 e COX-2	73
4.2.6 Análise teórica, calculada <i>in silico</i> , de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos para o LASSBio-1611	74

4.2.7 Análise estatística	74
5 Resultados	75
5.1 Triagem farmacológica do LASSBio-448 e de seus derivados N-metilssulfonamídicos e sulfonamídicos.....	75
5.1.1 Avaliação do efeito relaxante do LASSBio-448 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional	75
5.1.2 Avaliação do efeito relaxante dos derivados N-metilssulfonamídicos sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia isolada de cobaia controle e com IPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional.....	78
5.1.3 Avaliação do efeito relaxante dos derivados sulfonamídicos sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia isolada de cobaia controle e com IPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional.....	94
5.2 Caracterização do mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional....	112
5.2.1 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos no efeito relaxante do LASSBio-1611.....	112
5.2.2 Avaliação da participação da via do óxido nítrico no efeito relaxante do LASSBio-1611	115
5.2.2.1 Avaliação da participação da sintase do óxido nítrico em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de L-NAME e de L-arginina + L-NAME	115
5.2.2.2 Avaliação da participação da ciclase de guanilil solúvel em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de ODQ.....	118
5.2.2.3 Avaliação da participação da proteína cinase G em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS	121
5.2.3 Avaliação da participação da fosfodiesterase 5 no efeito relaxante do LASSBio-1611	124
5.2.3.1 Avaliação do efeito relaxante da sildenafil em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença do LASSBio-1611	124

5.2.4 Avaliação da participação dos canais de potássio e/ou de cálcio dependentes de voltagem no efeito relaxante do LASSBio-1611	127
5.2.4.1 Avaliação do efeito relaxante do LASSBio-1611 sobre as contrações tônicas induzidas por 18 ou por 60 mM de KCl em traqueia isolada de cobaia com IPAC	127
5.2.4.2 Avaliação da reatividade contrátil ao cloreto de cálcio em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência e na presença do LASSBio-1611	130
5.2.5 Avaliação da participação da via das ciclo-oxigenases no efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de indometacina e de L-NAME + indometacina.....	134
5.2.6 Estudo de <i>docking</i> molecular	137
5.2.6.1 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou a L-arginina e as sintases do óxido nítrico induzível e neuronal.....	137
5.2.6.2 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou o cinaciguat e a ciclase de guanilil solúvel	141
5.2.6.3 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou o cGMP e a proteína cinase G	143
5.2.6.4 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou a sildenafil e a fosfodiesterase 5	145
5.2.6.5 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou o nifedipino e o canal de cálcio dependente de voltagem do tipo 1.2.....	147
5.2.6.6 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou o etoricoxibe e a ciclo-oxigenase-2.....	149
5.2.7 Análise teórica, calculada <i>in silico</i> , de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos para o LASSBio-1611	151
6 Discussão	153
7 Conclusões	170
Referências	171
Apêndices	191
Anexos	193



1 Introdução

A asma alérgica é uma doença crônica, geralmente, inflamatória e multifatorial complexa do sistema respiratório, caracterizada por uma hiper-responsividade brônquica a partir da exposição a estímulos externos tais como: alérgenos, ar frio, quente ou úmido, esforço e estresse emocional, o que desencadeia broncoconstrição e aumento excessivo de muco nas vias aéreas. Além disso, a hiperatividade das fosfodiesterases (PDEs) também é responsável por gerar esse quadro hiper-responsivo presente na asma (KODIMUTHALI; JABARIS; PAL, 2008; PAGE; SPINA, 2012).

A terapia atual para o tratamento da asma é baseada na broncodilatação induzida por agonistas adrenérgicos β , antimuscarínicos e antagonistas dos receptores cisteinil-leucotrienos, ou na supressão da inflamação, com a utilização de glicocorticoides, sendo esses os principais fármacos disponíveis na terapêutica. Estratégias essas que auxiliam no controle dos sintomas da asma, entretanto, apresentam diversos efeitos colaterais (WALSH, 2005; PATEL; SHAW, 2015).

Dessa forma, é de primordial importância a busca por novas substâncias naturais ou sintéticas que venham a ampliar o arsenal terapêutico contra essa doença. Nessa perspectiva, modelos animais que auxiliem nas etapas iniciais para descoberta destes compostos são de grande valia. Um dos modelos experimentais utilizando a traqueia é o de cobaias (*Cavia porcellus*), uma vez que a resposta das vias aéreas desses animais à maioria dos agonistas farmacológicos é diretamente comparável a dos humanos (MUCCITELLI et al., 1987).

Uma grande aliada no planejamento racional de fármacos, que se baseia na relação entre a estrutura química e a atividade biológica/farmacológica, é a Química Medicinal (BARREIRO, 2002).

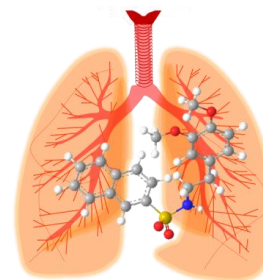
Nesse contexto, considerando-se a diversidade de alvos terapêuticos que podem ser alvos de fármacos planejados racionalmente, destacam-se as PDEs, cuja

busca por inibidores com maior eficácia e seletividade vem crescendo ao longo dos anos. Essa superfamília de enzimas desempenham um papel fundamental na modulação dos níveis de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e de guanosina (cGMP). Sendo a família da PDE4, responsável por regular as funções pulmonares desempenhadas por nervos sensoriais, epitélio e músculo liso das vias aéreas (BENDER; BEAVO, 2006; FAN CHUNG, 2006). Entre os inibidores de PDE4 estão o rolipram, o cilomilaste, o roflumilaste e o CHF6001, desenvolvidos para tratar problemas relacionados ao trato respiratório, tais como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e asma (MORETTO et al., 2015).

Visando uma melhoria na qualidade de vida de indivíduos portadores de asma, diversos estudos utilizando estratégias da Química Medicinal, baseados no mecanismo de ação dos fármacos, vêm contribuindo para suas modificações estruturais, o que possibilita a descoberta de fármacos mais seletivos e com efeitos colaterais menos intensos.

Nessa perspectiva, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio[®]) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) vem trabalhando há alguns anos, desenhando e modificando as estruturas de várias moléculas. Entre elas, duas séries (sulfonamídica e sulfonilidrazônica), tendo como protótipo o LASSBio-448, um análogo do rolipram, ambos inibidores de PDE4 (NUNES, 2013).

Em estudos anteriores, Medeiros (2015) e Martins (2016) evidenciaram o efeito relaxante do LASSBio-448 e da série sulfonilidrazônica em traqueia de cobaia não asmático e asmático. Diante dessas premissas, decidiu-se investigar o possível efeito relaxante da série sulfonamídica, por meio de um estudo comparativo, bem como caracterizar, em nível funcional, o mecanismo de ação do derivado mais potente em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (GC) e com inflamação pulmonar alérgica crônica (IPAC). Além disso, prever a interação entre o derivado mais potente e os prováveis alvos de ligação, por meio de um estudo de *docking* molecular, bem como fazer uma análise, *in silico*, de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos.



2 Fundamentação teórica

2.1 Asma

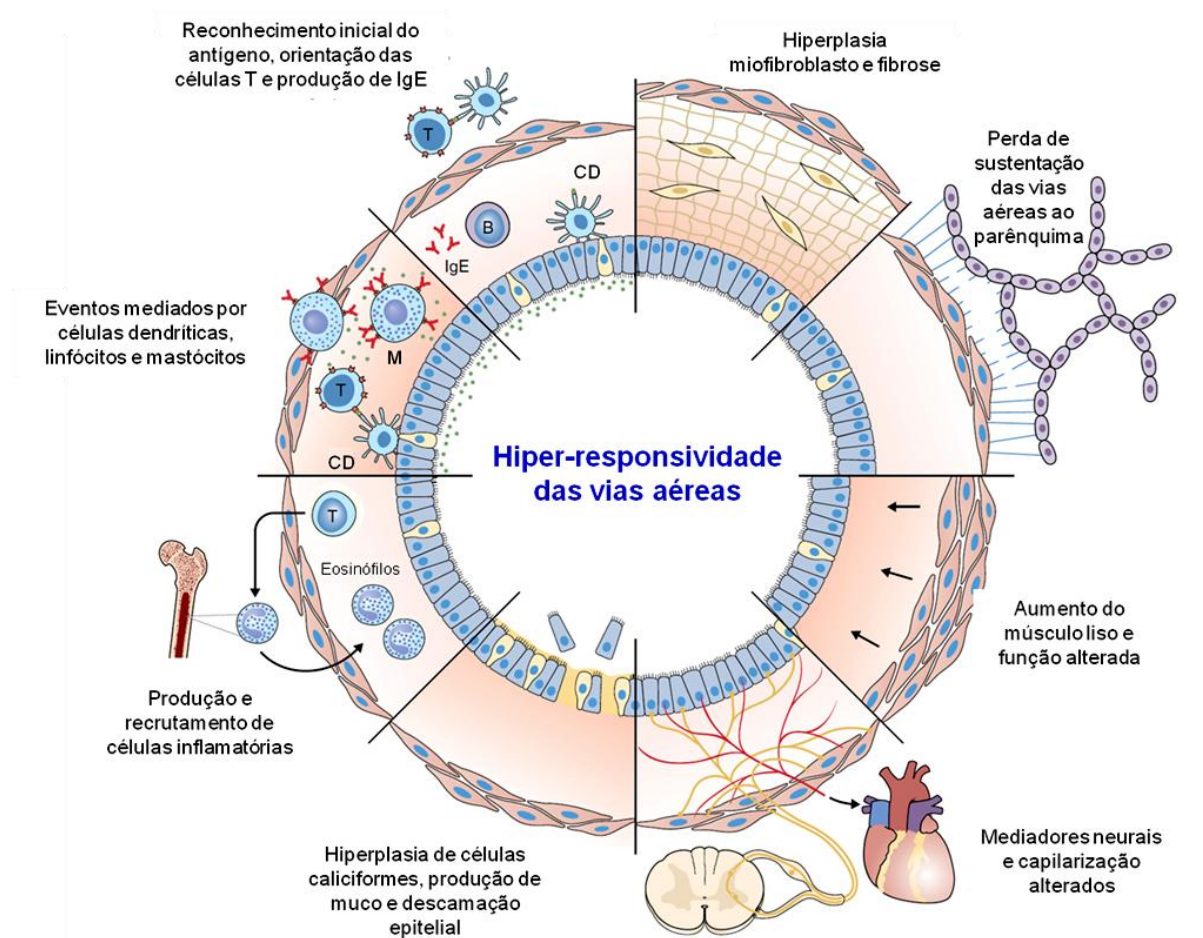
A asma é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por inflamação crônica e remodelamento das vias aéreas. Essas características se associam à hiper-responsividade brônquica, o que desencadeia sintomas respiratórios como sibilos, dispneia, opressão torácica, tosse e limitação do fluxo aéreo expiratório variável. Esses sintomas costumam variar em relação à intensidade e ao tempo, podendo ser desencadeados por exposição à alérgenos ou irritantes, mudanças no clima e infecções respiratórias por vírus, sendo uma doença considerada um problema de ordem mundial que afeta cerca de 300 milhões de pessoas (1-16% da população mundial) em vários países (PAVORD; GREEN; HALDAR, 2012; GINA, 2018).

No Brasil, estima-se que a prevalência da asma seja de 9,4%, o que representa 20 milhões de pessoas acometidas. Informações do banco de dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) apontam para a redução, em número absoluto, das hospitalizações e da mortalidade de 2008 para 2013, com tudo, em 2013 a taxa de mortalidade por asma no Brasil, ainda era de aproximadamente cinco pessoas/dia e cerca de 120 mil hospitalizações, gerando um custo de quase 22 milhões de dólares aos cofres públicos. Esses dados ainda apontam o Nordeste como sendo a segunda região do país mais acometida por casos de asma e a primeira em casos de hospitalizações (CARDOSO et al., 2017).

A hiper-responsividade brônquica pode ser definida como um aumento na facilidade e no grau de estreitamento das vias aéreas em resposta a estímulos broncoconstritores. Essa característica reflete uma resposta anormalmente amplificada dos nervos parassimpáticos e dos mastócitos das vias aéreas a estímulos exógenos, bem como uma anormalidade intrínseca da resposta do

músculo liso dessas vias. Adicionalmente, pode estar correlacionada a inflamação aguda e crônica, com o remodelamento e, em especial, com o aumento da massa de músculo liso e a perda da função da barreira epitelial das vias aéreas, reduzindo a produção de fatores broncoprotetores (Figura 1) (RUBIN et al., 2002; PAVORD; GREEN; HALDAR, 2012).

Figura 1 – Modelo esquemático dos processos inflamatórios e remodeladores que contribuem potencialmente para a hiper-responsividade das vias aéreas e para a obstrução do fluxo aéreo.



T = células T; B = basófilos; IgE = imunoglobulina E; CD = célula dendrítica; M = mastócito.

Fonte: Adaptado de PAVORD; GREEN; HALDAR, 2012.

O infiltrado inflamatório que acompanha respostas dos linfócitos T *helper* 2 (Th2) num quadro asmático é característico de alta eosinofilia e produção de imunoglobulina E (IgE), mas também inclui mastócitos, basófilos, neutrófilos, monócitos e macrófagos, além disso ocorre deposição de proteínas básicas principais (MBPs), espessamento da membrana basal subepitelial causada pela

deposição anormal de colágeno e aumento do volume do músculo liso, de células caliciformes e da vascularização das vias aéreas. Associado a inflamação crônica, ocorre remodelamento estrutural na morfologia das vias aéreas, o que culmina para o declínio acelerado da função pulmonar e para a obstrução do fluxo aéreo observado em alguns pacientes com asma (Figura 1) (PAVORD; GREEN; HALDAR, 2012; HOLGATE et al., 2015).

O remodelamento estrutural e fenotípico do músculo liso das vias aéreas pode estar associado ao aumento da expressão de proteínas, como a cadeia pesada da miosina, a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e a proteína G monomérica da família Rho do tipo A (RhoA). Em adição, a hiper-responsividade aguda é induzida pela liberação de mediadores inflamatórios e broncoconstritores, como a histamina, leucotrienos e citocinas do tipo Th2, que por sua vez, promovem a liberação de acetilcolina (ACh) pelas fibras sensoriais aferentes e pelo nervo vago induzindo a contração do músculo liso das vias aéreas (GOSENS et al., 2006; MEURS; GOSENS; ZAAGSMA, 2008).

Além disso, é relatada uma diminuição da produção de óxido nítrico (NO) em decorrência da redução na expressão das sintases do NO endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) e da biodisponibilidade de L-arginina, favorecendo a hiper-responsividade inicial induzida por alérgenos. A baixa disponibilidade de L-arginina nas vias aéreas é resultado de sua hidrólise em L-ornitina e ureia pela enzima arginase, essa enzima tem sua expressão aumentada por células Th2 e interleucinas (IL) dos tipos 4 e 13. Ao mesmo tempo, uma resposta tardia pode ser desencadeada devido a baixa oferta de L-arginina para a sintase do NO induzível (iNOS) e a inibição de transportadores de aminoácidos catiônicos por MBPs, levando a produção de NO e de ânion superóxido (O_2^-) pela iNOS, favorecendo a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), uma potente espécie reativa de oxigênio, que é contrátil e pró-inflamatória (XIA; ZWEIER, 1997; MEURS; GOSENS; ZAAGSMA, 2008).

Em relação às células T, nas vias aéreas asmáticas, sua função é controlar o perfil celular inflamatório. Os linfócitos $CD4^+$ Th2 predominam na asma clássica alérgica, mas também há outros tipos de perfis com uma variedade de outras células T, a citar células Th1 e Th17 na asma neutrofílica. Na asma alérgica eosinofílica e na, potencialmente, não alérgica, o início da resposta imune do perfil Th2 se dá por meio da secreção de citocinas IL-25, IL-33 e da linfopoietina estromal tímica (TSLP),

derivadas das células epiteliais. Essas citocinas induzem células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) a produzir IL-5, IL-9 e IL-13. Além disso, as células T requerem uma interação com as células dendríticas apresentadoras de antígeno para processamento e apresentação dos alérgenos por meio do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Por fim, o perfil Th2 secreta citocinas pró-alérgicas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) e o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), conduzindo às respostas com altos níveis de IgE, de mastócitos e de eosinófilos, que são características da asma alérgica (HOLGATE et al., 2015; McCracken et al., 2017).

Além desses fatores, é importante o envolvimento do epitélio das vias aéreas na asma, que apresenta histologia anormal e danos. Diversas razões podem explicar esse fato, por exemplo, após a lesão epitelial, os alérgenos inalados podem atingir mais facilmente o músculo liso e os nervos sensoriais (responsáveis por liberar neurotransmissores) estão mais expostos aos alérgenos facilitando a broncoconstrição. Além disso, mediadores relaxantes como o NO e a prostaglandina E₂ (PGE₂) têm sua formação diminuída favorecendo a hiper-reatividade das vias aéreas asmáticas (Laitinen et al., 1985; Folkerts et al., 2000; Ordóñez et al., 2000).

Para se estudar a fisiopatologia da asma e substâncias com potencial terapêutico para tratar essa doença são utilizados modelos animais, entre eles, o de cobaia sensibilizado com ovalbumina (OVA). O perfil de resposta das vias aéreas nesse modelo possui similaridade com o perfil asmático de humanos, incluindo eosinofilia e hiper-responsividade brônquica, assim como o cobaia tem uma grande proximidade com humanos em relação à resposta muscular lisa e ao reflexo autonômico. Esses roedores liberam, principalmente, histamina e leucotrienos em resposta à estimulação mastocitária, além de possuírem uma densidade de receptores farmacológicos semelhante a dos humanos (Canning, 2003; Meurs et al., 2006; Ressmeyer et al., 2006; Meurs; Gossens; Zaagsma, 2008).

Um modelo de IPAC em cobaias, inicialmente descrito por Tibério et al., (1997), foi implantado recentemente por nosso grupo de pesquisa e apresentou infiltrado inflamatório peribrônquico, hiperplasia epitelial, espessamento da camada muscular lisa e aumento da expressão das proteínas cinase-3 de fosfatidil inositol (PI3-K) e α -actina. Adicionalmente, esse modelo também apresentou hipercontratilidade do músculo liso a agentes contráteis (carbacol – CCh e

histamina) dependente da participação do epitélio traqueal e do estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2019). Dessa maneira, o modelo de IPAC em cobaia se configura como uma alternativa para estudos sobre a fisiopatologia da asma, devido apresentar características de perfil de resposta semelhantes às encontradas nessa doença, sendo também um modelo viável para investigação de substâncias potencialmente promissoras para o tratamento da asma.

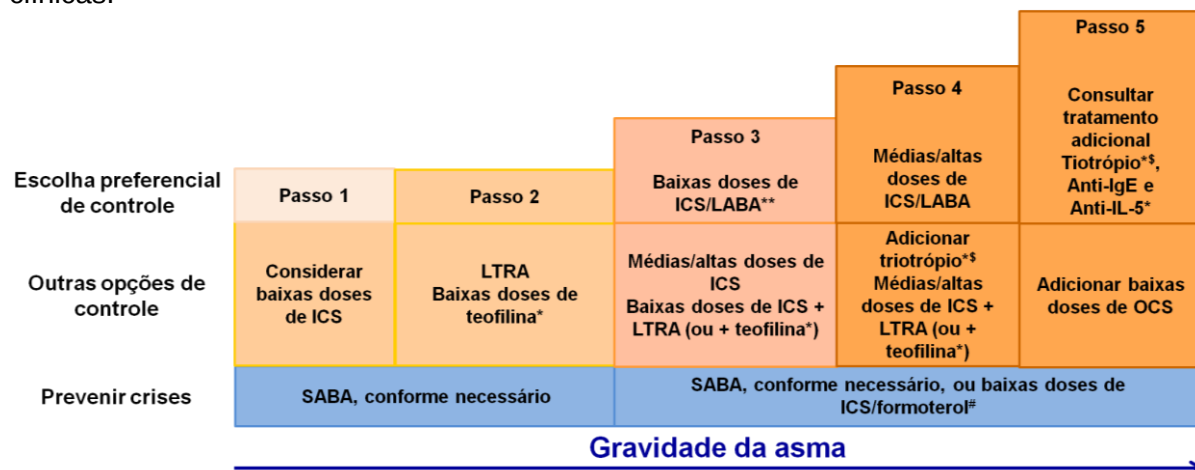
Atualmente, o tratamento da asma brônquica consiste em reverter ou impedir os sintomas, a exemplo do broncoespasmo, da inflamação, do edema e do muco. As classes de medicamentos mais utilizadas são: agonistas adrenérgicos β de ações curta (SABA) e longa (LABA) (sulfato de salbutamol, fumarato de formoterol e bromidrato de fenoterol); glicocorticoides (dipropionato de beclometasona, budesonida, acetato de metilprednisolona, flunisolida e furoato de fluticasona – diminuem a liberação de interleucinas pró-inflamatórias, de prostaglandinas, de leucotrienos, de quimiocinas, entre outros); antimuscarínicos de ações curta e longa (LAMA) (brometos de ipratrópio e de tiotrópio); inibidores de PDEs, as chamadas metilxantinas (teofilina); inibidores da liberação de histamina e outros autacoides (cromoglicato e nedocromil de sódio); anti-histamínicos (fumarato de cetotifeno – bloqueador dos receptores H_1); antagonistas dos receptores cisteinil-leucotrienos (montelucaste de sódio) e anticorpos monoclonais anti-IgE (omalizumabe – se liga aos sítios de ligação de alta afinidade da IgE para receptor $Fc\epsilon RI$) e anti-IL-5 (mepolizumabe – bloqueia a ligação da IL-5 à cadeia alfa do complexo receptor da IL-5 expresso na superfície celular do eosinófilo) (PATEL; SHAW, 2015; McCRACKEN et al., 2017; GINA, 2018).

Além do tratamento farmacológico, também se recomenda o não farmacológico, que consiste em evitar o uso de cigarros, assim como exposição a fatores alergênicos (ácaro, pelo de animais e fumaça de cigarro), medicamentos que possam desencadear crises (ácido acetilsalicílico – AAS), bem como é recomendado à redução de peso corpóreo, a prática de atividade física aeróbia, dieta rica em frutas e vegetais, entre outros. A escolha do tratamento farmacológico é baseada no diagnóstico, nos sintomas e na terapia disponível, sendo dividido em cinco passos, dependendo da gravidade da doença (Figura 2) (GINA, 2018).

No entanto, em se tratando especificamente dos inibidores de PDEs, ainda se faz necessário aumentar a especificidade e, assim, reduzir os efeitos colaterais que limitam as doses, especialmente, dos inibidores de PDE4 (MAURICE et al., 2014),

dessa forma, a Química Medicinal se torna importante área de conhecimento para o desenho, o planejamento e o desenvolvimento de medicamentos que venham a diminuir a incidência de episódios agudos e, assim aumentar a qualidade de vida dos pacientes asmáticos.

Figura 2 – Passos para escolha do tratamento da asma de acordo com as manifestações clínicas.



*Exceto crianças < 12 anos; **Para crianças de 6 a 11 anos, o tratamento preferido no passo 3 é dose média ICS; [#]Para pacientes que receberam prescrição de BDP/formoterol ou BUD/formoterol e terapia de alívio; ^{\$}A inalação com tiotrópio é um tratamento adicional para pacientes ≥ 12 anos com histórico de exacerbações. SABA = agonistas adrenérgicos β_2 de ação curta; LABA = agonistas adrenérgicos β_2 de ação longa; ICS = glicocorticoides inalatórios; LTRA = antagonistas dos receptores dos cisteinil-leucotrienos; OCS = glicocorticoides orais; BDP = dipropionato de beclometasona; BUD = budesonida (Redesenhado de GINA, 2018).

Fonte: Silva, 2019.

2.2 A Química Medicinal e a descoberta de inibidores de fosfodiesterases

O desenvolvimento de fármacos baseados em uma estrutura é realizado por estudos da Química Medicinal, sendo a síntese do AAS a partir da modificação estrutural do ácido salicílico por Felix Hoffman, em 1897, o primeiro registro de patente na história do desenvolvimento da indústria farmacêutica (CALIXTO; SIQUEIRA-JÚNIOR, 2008). No entanto, a primeira síntese metódica e intencional foi realizada em 1910, pelo alemão Paul Erlich, que modificou moléculas químicas para obter os fármacos salvarsan e neosalvarsan, utilizados no tratamento da sífilis (PALMEIRA-FILHO, PAN, 2003). Esse desenvolvimento foi facilitado a partir da criação do banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank* – PDB), que possibilitou

o desenvolvimento de técnicas de modificação estrutural, levando a descoberta do captopril, um fármaco anti-hipertensivo e inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA). O captopril foi sintetizado a partir de modificações moleculares no nonapeptídeo teprotide (SQ-20,881), um princípio ativo isolado e sintetizado do veneno de *Bothrops jararaca* e com atividade inibitória da ECA, mas ao ser administrado por via oral, perdia eficácia. Isso fortaleceu o planejamento racional de fármacos tendo como base o mecanismo de ação pretendido, por exemplo, a cimetidina e a sildenafila, bem como tornou possível elencar alvos moleculares que podem ser investigados pela Química Medicinal (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001; LIMA, 2007).

Entre os alvos dos Químicos Medicinais, podemos destacar as PDEs, que são enzimas metalofosfo-hidrolases com função de inativar, por meio de hidrólise, o cAMP e o cGMP nos respectivos 5'-monofosfatos de adenosina (AMP) e de guanosina (GMP) (BEAVO, 1995; FAN CHUNG, 2006). As PDEs são uma superfamília dividida em 11 famílias (PDE1-11) de acordo com os genes dos quais são produtos, suas propriedades bioquímicas, regulação e sensibilidade a agentes farmacológicos. As famílias, por sua vez, se dividem em isoformas e, dependendo da afinidade pelos nucleotídeos cíclicos, podem ser classificadas como inespecífica ou específica pelos substratos cAMP e cGMP (BEAVO, 1995; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011).

Dessa maneira, as PDE1, 2, 3, 10 e 11 são inespecíficas para esses nucleotídeos cíclicos, enquanto que, as PDE4, 7 e 8 são seletivas para cAMP e as PDE5, 6 e 9 para cGMP. Além disso, podem ser reguladas pelo complexo cálcio-calmodulina, a exemplo da PDE1, e pelos próprios nucleotídeos cíclicos, como PDE2 e 3, que são ativadas e inibidas, respectivamente, por cGMP. Quanto à distribuição, essas enzimas se encontram em rins, testículos, cérebro, próstata, retina, músculo esquelético, linfócitos T, monócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, plaquetas, tecido adiposo, coração, endotélio, músculo liso, vias aéreas, entre outros (DAL PIAZ; GIOVANNONI, 2000; ESSAYAN, 2001; LUGNIER, 2006; KODIMUTHALI; JABARIS; PAL, 2008).

Entre as famílias de PDEs mais estudadas e de importância para as vias aéreas, destaca-se a PDE4, que é dividida em quatro isoformas (A-D). Todas as isoformas necessitam de um íon metálico divalente, como o Zn^{2+} ou Mg^{2+} , para promover a catálise do seu substrato específico, o cAMP, diferindo-se entre si por

sua distribuição celular e em relação à sensibilidade ao inibidor rolipram. A distribuição das isoformas A, B e D se dá em eosinófilos, neutrófilos e células T, B, endoteliais e epiteliais das vias aéreas e traqueia. Dessa forma, são isoformas importantes na fisiopatologia da asma, enquanto que a isoforma C é encontrada no sistema nervoso central (SNC), músculo esquelético, testículos, pulmões de fetos humanos e traqueia. Além disso, a PDE4 regula funções do endotélio vascular, de nervos sensoriais, do epitélio e do músculo liso das vias aéreas (HOUSLAY; SULLIVAN; BOLGER, 1998; BARBER et al., 2004; SPINA, 2004; FAN CHUNG, 2006; HALPIN, 2008; KODIMUTHALI; JABARIS; PAL, 2008).

O primeiro inibidor de PDE descrito na literatura foi a teofilina, uma metilxantina, que é usada no tratamento de doenças do trato respiratório, a exemplo da asma desde 1937, inibindo de maneira inespecífica as PDEs e aumentando os níveis intracelulares de cAMP e de cGMP (BOSWELL-SMITH; CAZZOLA; PAGE, 2006; AHMAD et al., 2015). Com relação aos inibidores de PDE4, o protótipo é o rolipram, que apresentou ação antidepressiva, anti-inflamatória, imunossupressora e antitumoral, além de melhorar a função pulmonar. No entanto, seu desenvolvimento para uso terapêutico foi interrompido devido a fortes efeitos colaterais, tais como, náuseas, êmese e aumento de secreção gástrica, provavelmente devido à presença de PDE4C no SNC e da capacidade da molécula atravessar a barreira hematoencefálica (WACHTEL, 1983; SOMMER et al., 1995; DAL PIAZ; GIOVANNONI, 2000; CHEN et al., 2002; GIEMBYCZ, 2002; SEMMLER; WACHTELL; ENDRES, 2003; WHITAKER et al., 2008).

Apesar da incapacidade de uso clínico, o rolipram se caracteriza como uma importante ferramenta farmacológica na busca por novos inibidores de PDE4. A partir do seu grupo farmacofórico e de modificações em sua estrutura química, chegou-se aos de segunda geração, cilomilaste e roflumilaste, desenvolvidos para o tratamento da DPOC e da asma, sendo que ambos ainda apresentam efeitos colaterais, como diarreia, náuseas e dores abdominais (FAN CHUNG, 2006; GIEMBYCZ; FIELD, 2010; PAGE; SPINA, 2012).

Diante dos avanços na descoberta de novos inibidores de PDE4, ainda se faz necessário o aperfeiçoamento de moléculas para se chegar a uma maior seletividade e, conseqüentemente, reduzir os efeitos colaterais/adversos. Nesse sentido e considerando o interesse direcionado a PDE4 como alvo para tratar doenças do sistema respiratório, o LASSBio®/UFRJ desenhou e sintetizou duas

séries (sulfonamídica e sulfonilidrazônica) de compostos a partir do LASSBio-448, um análogo do rolipram, que foi desenvolvido a partir de modificações estruturais em um composto arilsulfonamídico. Esse último foi sintetizado a partir do rolipram em síntese desenvolvida por Montana et al. (1998) e também é inibidor de PDE4 (NUNES, 2013).

O LASSBio-448 se mostrou tão eficaz em inibir as PDE4 bovina e humana quanto o rolipram, além de diminuir a resposta inflamatória, a fibrose e o remodelamento associadas a doenças crônicas como a DPOC e a asma, bem como a hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos. Além disso, relaxou a traqueia de rato e de cobaia e, na concentração de 100 μ M, inibiu as contrações cumulativas ao CCh, bem como aumentou os níveis de cAMP em traqueia de cobaia. Apesar dessas atividades farmacológicas, o LASSBio-448 ainda é capaz de induzir êmese, efeito colateral característico dos inibidores de PDE4, o que comprometeria o seu desenvolvimento para uso clínico, sendo necessário a otimização estrutural na tentativa de ajustar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Com base nisso e na sua simplicidade estrutural, o LASSBio-448 foi escolhido para planejar e desenvolver as novas séries de compostos sulfonamídicos (CARDOZO, 2010; NUNES, 2013; NUNES et al., 2016; SOUZA, 2015).

2.2.1 Planejamento e síntese dos derivados sulfonamídicos

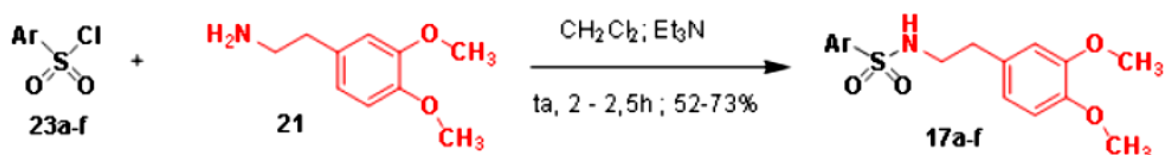
As sulfonamidas foram os primeiros fármacos utilizados como agentes preventivos e quimioterápicos contra várias doenças e, ao longo do tempo, vêm sendo empregadas clinicamente, a exemplo da bosentana, da sildenafil e do celecoxibe, utilizados para o tratamento da hipertensão pulmonar, da disfunção erétil e de doenças inflamatórias, respectivamente. Quimicamente, as sulfonamidas possuem em sua estrutura o grupo funcional SO_2NH_2 (CARTA; SCOZZAFAVA; SUPURAN, 2012; KOŁACZEK et al., 2014).

Como já mencionado, o LASSBio[®]/UFRJ sintetizou o LASSBio-448 e, com base na estrutura química dessa sulfonamida, desenhou seis compostos sulfonamídicos (**17a-f**) e seis compostos *N*-metilssulfonamídicos (**18a-f**), variando-se a natureza dos substituintes arilas (**a-f**), ligados à função sulfonamida. Para sintetizá-los, foi realizada, em uma única etapa, uma reação de condensação entre

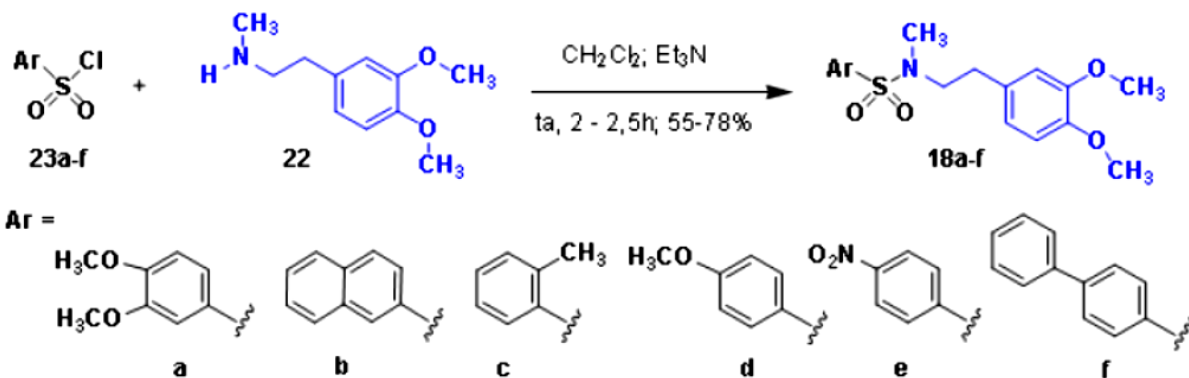
derivados clorossulfônicos (**23a-f**) e aminas primária, como a 3,4-dimetoxifenetilamina (**21**) ou secundária, a exemplo da 1*N*-metil-2-(3,4-dimetoxifenil)-1-etanamina (**22**), na presença de diclorometano e de trietilamina (Figura 3) (NUNES, 2013).

Figura 3 – Rota sintética empregada para obtenção dos compostos sulfonamídicos.

Sulfonamídicos



N-metilssulfonamídicos



23a-f = derivados clorossulfônicos; **21** = amina primária; **22** = amina secundária; **17a-f** = estrutura química geral dos compostos sulfonamídicos; **18a-f** = estrutura química geral dos compostos *N*-metilssulfonamídicos; Ar = substituintes arilas.

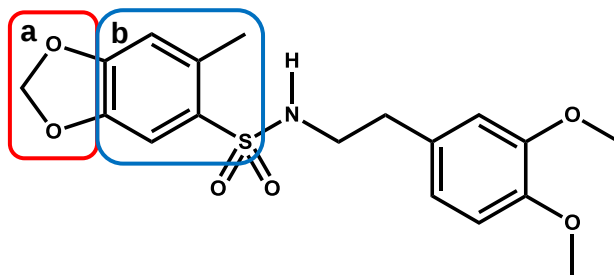
Fonte: NUNES, 2013.

No desenho molecular foi proposto a remoção da subunidade metilenodioxila (Figura 4 – **a**) e a substituição na subunidade arila ligada ao átomo de enxofre da função sulfonamida (Figura 4 – **b**) do LASSBio-448 por grupos retiradores ($-\text{NO}_2$) e doadores de elétrons ($-\text{OCH}_3$ e $-\text{CH}_3$), com o objetivo de investigar a relevância das interações moleculares e das propriedades eletrônicas para atividade anti-PDE4.

Dessa forma, o planejamento de anéis aromáticos monossustituídos deram origem aos LASSBios: 1) -1629 e -1630 (substituição *para*-nitro; Figura 3 – Ar = **e**); 2) -1625 e -1628 (substituição *para*-metoxila; Figura 3 – Ar = **d**) e 3) -1613 e -1623 (substituição *orto*-metila; Figura 3 – Ar = **c**). Enquanto que a troca do anel fenila do LASSBio-448 pelos substituintes 1-naftila (Figura 3 – Ar = **b**), originou os LASSBios-1611 e -1612, e 1-bifenila (Figura 3 – Ar = **f**), os LASSBios-1622 e -1631

(Quadro 1), visando explorar a contribuição de interações hidrofóbicas com o sítio ativo da PDE4 e uma vez que, esses substituintes são encontrados em algumas classes de produtos naturais como os terpenos, os peptídios e os alcaloides (NUNES, 2013).

Figura 4 – Estrutura química do LASSBio-448.



Fonte: Silva, 2019.

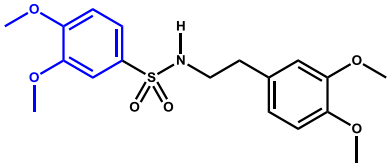
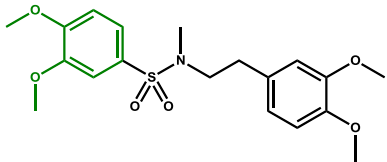
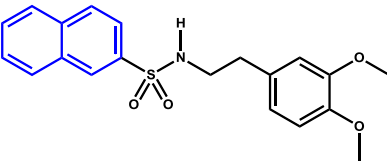
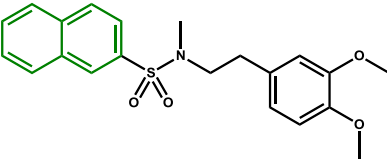
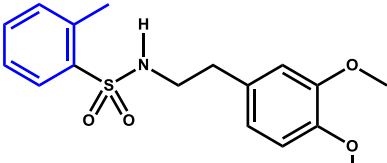
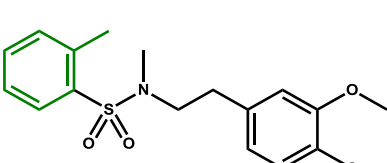
Estruturalmente, também se tomou o cuidado de preservar o sistema 3,4-dimetoxifenila na molécula de origem, uma vez que esse grupo substituinte é relatado como sendo a unidade farmacofórica para a atividade inibitória de PDE4. Visando a presença dessa unidade farmacofórica nas duas extremidades dos compostos e estudar as diferenças conformacionais, a unidade benzodioxila foi substituída pelo sistema 3,4-dimetoxifenila (Figura 3 – Ar = **a**) para gerar os LASSBios-1722 e -1610 (Quadro 1) (NUNES, 2013).

Souza (2015) evidenciou, em um ensaio enzimático, que os LASSBios da série sulfonamídica, na concentração de 10 μ M, apresentaram quase nenhuma melhora da atividade anti-PDE4 humana em relação ao seu protótipo, o LASSBio-448, exceto os LASSBios-1612, -1628 e -1631 que apresentaram uma inibição acima de 40%. Resultados semelhantes foram observados para os LASSBios da série sulfonilidrazônica, exceto para o LASSBio-1632, cuja inibição chegou a 90% (NUNES, 2013).

Além disso, experimentos realizados por nosso grupo de pesquisa evidenciaram o efeito relaxante da série *N*-sulfonilidrazônica em artéria pulmonar com endotélio (LASSBio-1632) e corpo cavernoso (LASSBio-1849) de rato, útero de rata (LASSBio-1851) e traqueia de cobaia não asmático e com asma alérgica (LASSBios-1824, -1832, -1846, -1847, -1848, -1849, -1850 e -1851). Dentre os LASSBios testados, o LASSBio-1847 se mostrou o mais potente da série e seu

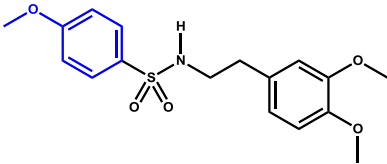
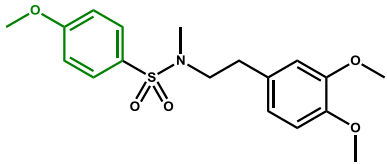
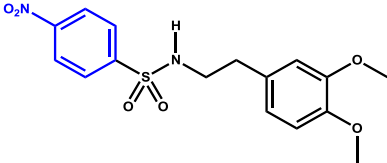
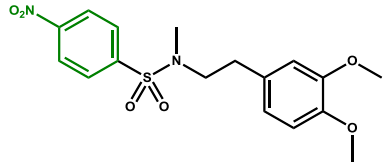
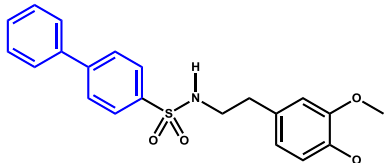
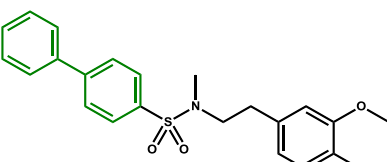
mecanismo de ação relaxante se dá por modulação positiva da via ciclase de adenilil (AC)/proteína cinase A (PKA)/cAMP e por inibição de PDEs em traqueia de cobra (MEDEIROS, 2015; MARTINS, 2016; OLIVEIRA; SILVA, 2017; MELO; SILVA, 2017).

Quadro 1 – Compostos, estruturas químicas e nomes químicos da série sulfonamídica.

Compostos	Estruturas químicas	Nomes químicos
LASSBio-1722 (17a)		<i>N</i> -(3,4-dimetoxifenetil)-3,4-dimetoxibenzenossulfonamida
LASSBio-1610 (18a)		<i>N'</i> -(3,4-dimetoxifenetil)-3,4-dimetoxi- <i>N</i> -metilbenzenossulfonamida
LASSBio-1611 (17b)		<i>N</i> -(3,4-dimetoxifenetil) naftaleno-2-sulfonamida
LASSBio-1612 (18b)		<i>N'</i> -(3,4-dimetoxifenetil)- <i>N</i> -metilnaftaleno-2-sulfonamida
LASSBio-1613 (17c)		<i>N</i> -(3,4-dimetoxifenetil)-2-metilbenzenossulfonamida
LASSBio-1623 (18c)		<i>N'</i> -(3,4-dimetoxifenetil)- <i>N</i> ,2-metilbenzenossulfonamida

(Continua)

(Continuação)

Compostos	Estruturas químicas	Nomes químicos
LASSBio-1625 (17d)		<i>N</i> -(3,4-dimetoxifenetil)-4-metoxibenzenossulfonamida
LASSBio-1628 (18d)		<i>N'</i> -(3,4-dimetoxifenetil)-4-metoxi- <i>N</i> -metilbenzenossulfonamida
LASSBio-1629 (17e)		<i>N</i> -(3,4-dimetoxifenetil)-4-nitrobenzenossulfonamida
LASSBio-1630 (18e)		<i>N'</i> -(3,4-dimetoxifenetil)- <i>N</i> -metil-4-nitrobenzenossulfonamida
LASSBio-1622 (17f)		<i>N</i> -(3,4- dimetoxifenetil)-bifenil-3-sulfonamida
LASSBio-1631 (18f)		<i>N'</i> -(3,4-dimetoxifenetil)- <i>N</i> -metilbifenila-3-sulfonamida

Fonte: Silva, 2019.

2.3 Docking molecular e estudos *in silico* no planejamento/desenvolvimento de novos fármacos

O *docking* molecular visa prever a interação e a formação do complexo ligante-macromolécula, bem como prevê conformações e/ou poses do ligante ao sítio ativo de uma proteína. Por essa razão, é necessária a estrutura tridimensional do alvo molecular a ser estudado, que pode ser cristalografada por técnica de raio X, ressonância magnética nuclear ou obtida por técnicas computacionais. Desde os anos de 1980, que o *docking* ligante-proteína vem sendo utilizado nas análises em bioinformática, sendo a ferramenta de identificação de compostos candidatos a fármacos de primeira escolha quando se tem, apenas, um alvo e seu sítio de ligação. Essa técnica se caracteriza por duas etapas principais, sendo uma de amostragem das conformações/orientações, que está relacionada com o espaço conformacional descrito pela energia livre, e a outra etapa de função de pontuação, que deve associar a conformação ligada ao menor nível de energia global para o encaixe do complexo ligante-macromolécula (KUNTZ et al., 1982; KITCHEN et al., 2004; SALMASO; MORO, 2018).

As funções de pontuação selecionam as poses, usadas para discriminar os modos de ligação entre ligantes e não ligantes no conjunto de poses gerado pelo *docking*, sendo um dos tipos a soma de várias energias empíricas como forças de Van der Waals, eletrostáticas, ligações de hidrogênio, entalpia, entropia e hidrofobicidade, que são otimizadas para reproduzir dados de afinidade para encaixe de um complexo (SALMASO; MORO, 2018).

O estudo *in silico* também é uma alternativa viável nos processos de descoberta e desenvolvimento de medicamentos, cujas técnicas *in vivo* e *in vitro* são dispendiosas e trabalhosas, dessa forma, minimizar esses fatores melhora a chance de seleção de moléculas com potencial uso terapêutico. Para esse uso, as moléculas devem apresentar alta atividade biológica juntamente com baixa toxicidade, bem como biodisponibilidade adequada com o alvo terapêutico no organismo. Os parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) podem ser preditos por modelos computacionais como uma alternativa aos procedimentos experimentais, especialmente nas etapas iniciais, quando as estruturas químicas investigadas são numerosas, mas a disponibilidade de compostos é escassa. Essa estimativa precoce de ADMET na

fase de descoberta pode reduzir drasticamente a fração de falha relacionada à farmacocinética nas fases clínicas de desenvolvimento de medicamentos (CHENG et al., 2013; DAHLIN; INGLESE; WALTERS, 2015; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

2.4 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso nas vias aéreas

Sabendo-se da importância da descoberta de novas substâncias com ação relaxante, que são aquelas que reduzem o tônus dos músculos lisos, além de inibir a sua contração ou induzir o seu relaxamento, o músculo liso se torna um importante modelo farmacológico para o estudo de tais substâncias. Esse músculo é o principal controlador da função na maioria dos sistemas de órgãos ocultos do corpo, como vasos sanguíneos, estômago, bexiga, útero, intestinos e vias aéreas. Nesse sentido, a regulação/desregulação da contração desse músculo desempenha um papel essencial em muitos processos fisiopatológicos, como distúrbios gastrintestinais e uterinos, hipertensão arterial e asma, sendo o íon Ca^{2+} mediador de grande parte desses processos e das ações dos fármacos no organismo humano (WEBB, 2003; KIM et al., 2008).

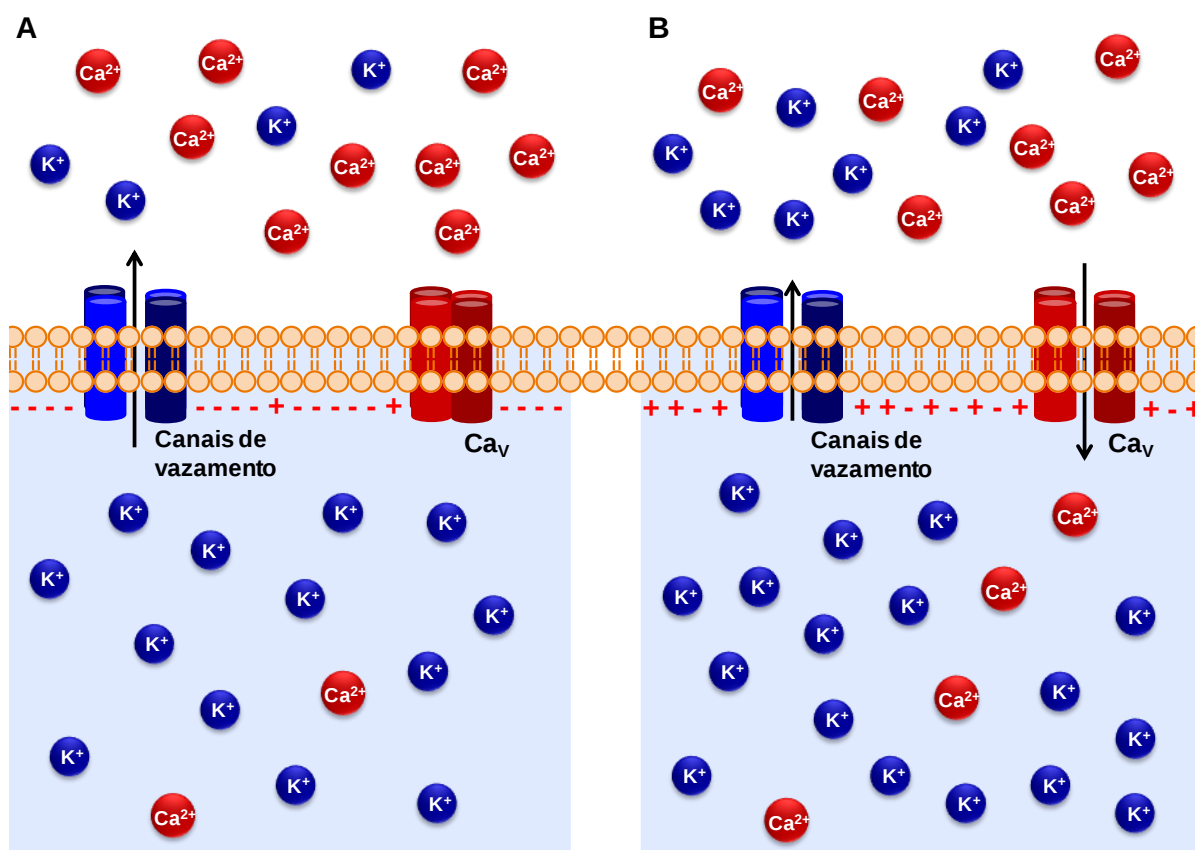
O Ca^{2+} é um segundo mensageiro onipresente que exerce papel essencial no controle de inúmeras funções celulares, como proliferação, transcrição gênica, apoptose e contração muscular (BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998). Há duas fontes celulares para esse íon: uma extracelular, que permite seu influxo através dos canais de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática de células excitáveis, e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente pelo retículo sarcoplasmático (RS) (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011). A liberação de Ca^{2+} do RS ocorre em decorrência da ação do 1,4,5-trisfosfato de fosfatidilinositol (IP_3) sobre seus receptores (IP_3R) e pela ativação dos receptores de rianodina (RyR) pelo Ca^{2+} liberado através dos IP_3R (liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} – CICR) (MaCLENNAN, 2000; TAYLOR; LAUDE, 2002; JUDE et al., 2008).

O aumento na concentração citosólica de Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_c$ promove contração, além de promover proliferação celular no músculo liso (HILL-EUBANKS et al., 2011). A regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, em nível funcional, para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso é dependente de dois estímulos que desencadeiam dois tipos de acoplamentos: o eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de

membrana (V_m), e o farmacomecânico, que ocorre com a ligação de um agonista ao seu respectivo receptor (REMBOLD, 1992; 1996).

A despolarização da membrana associada diretamente, ao aumento da concentração extracelular de potássio ($[K^+]_e$), ou indiretamente, pela ligação de agonistas aos seus receptores, caracteriza o acoplamento eletromecânico (Figura 5), promovendo uma resposta contrátil devido à abertura de Ca_v e, conseqüentemente, ao influxo de Ca^{2+} (REMBOLD, 1996). Em músculo liso, o Ca_v do tipo L ou 1 é o principal, e muitas vezes o único, tipo de canal de Ca^{2+} expresso, sendo alvo de bloqueadores usados na terapêutica como o nifedipino e o verapamil (WATERMAN, 2000; THORNELOE; NELSON, 2005; REYES-GARCÍA et al., 2016).

Figura 5 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



A) Durante o repouso, o gradiente eletroquímico favorece o efluxo de íons K^+ pelos seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna da membrana plasmática polarizada negativamente; **B)** Um aumento na $[K^+]_e$ diminui o efluxo de K^+ , ocasionando o acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, o que ativa os Ca_v promovendo o influxo de Ca^{2+} , com conseqüente contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

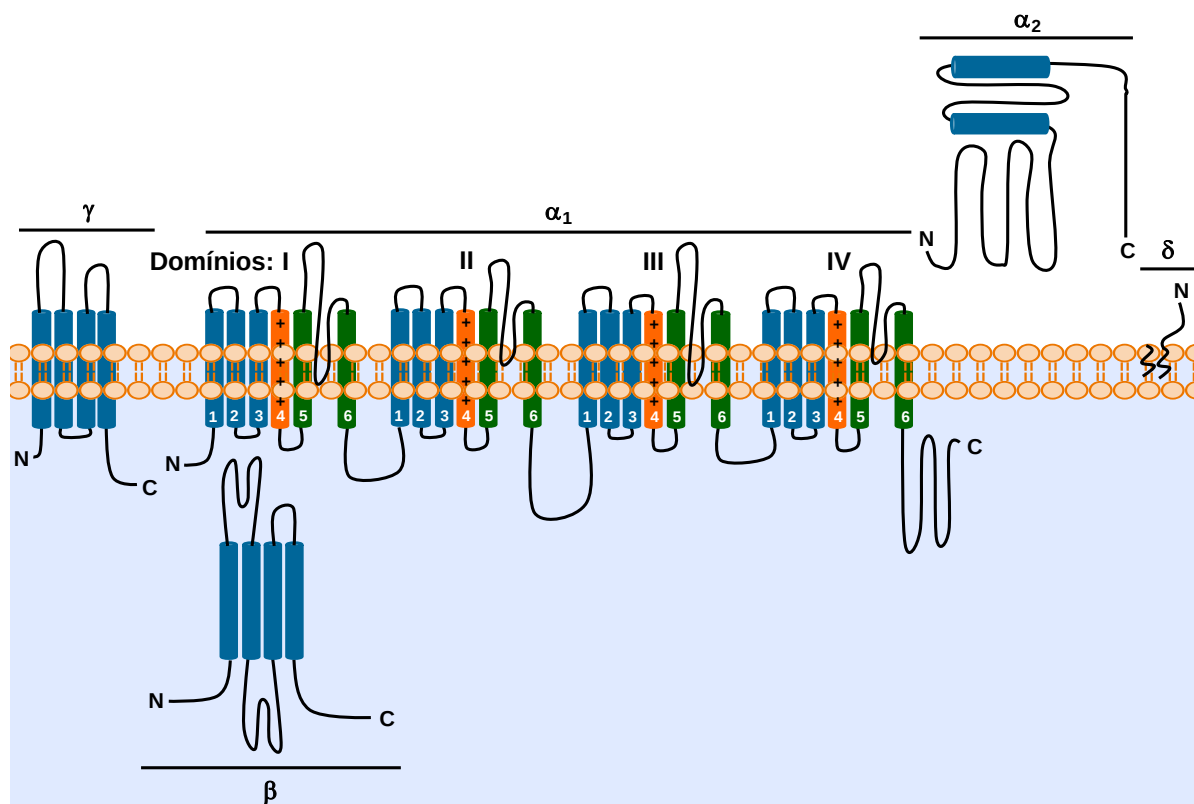
Os Ca_v se dividem em três famílias e são classificados segundo sua sequência primária de aminoácidos e suas funções fisiológicas: 1) Ca_v1 ou Ca_v-L ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ e $Ca_v1.4$) – sensíveis à di-hidropiridinas, ativados por alta voltagem e são os principais canais envolvidos no acoplamento excitação-contração; 2) Ca_v2 ou Ca_v-P/Q ($Ca_v2.1$); Ca_v-N ($Ca_v2.2$); Ca_v-R ($Ca_v2.3$) – insensíveis à di-hidropiridinas, sensíveis à alta voltagem e inibidos por toxinas de aranha e de caramujo marinho (ω -agatoxina, ω -conotoxina e SNX482), são expressos principalmente em neurônios; 3) Ca_v3 ou Ca_v-T ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ e $Ca_v3.3$) – insensíveis à di-hidropiridinas e inibidos por uma toxina de escorpião *Parabuthus transvaalicus* (curtoxina), ativados por baixa voltagem, são transitórios e expressos em vários tipos celulares, onde estão envolvidos na formação do potencial de ação com padrões repetitivos (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011; CATTERALL, 2011; ALEXANDER et al., 2017).

Os Ca_v1 , estruturalmente, são formados por cinco subunidades, sendo a subunidade transmembranar principal a $\alpha1$ que se associa, por pontes de sulfeto, ao dímero $\alpha2\delta$, as subunidades β (intracelular) e γ (transmembranar) completam a estrutura do canal. A subunidade $\alpha1$ é responsável por formar o poro e a sequência de aminoácidos deste canal se organiza em quatro domínios (I-IV) com seis segmentos cada um (S1-S6) e uma alça associada à membrana entre os segmentos S5 e S6 (Figura 6) (CATTERALL, 2011).

Como já mencionado, a contração também pode ocorrer por meio do acoplamento farmacomecânico (Figura 7), também chamado de misto, já que pode ou não depender de uma despolarização de membrana. Agonistas como a ACh ou o CCh e a histamina se ligam aos receptores M_3 e H_1 , respectivamente, que acoplam à proteína G e ativam a cascata do inositol, por meio da ativação das proteínas G_q ou G_{11} . A ativação dessas proteínas ocorre quando há a troca do difosfato de guanosina (GDP) por trifosfato de guanosina (GTP) e a subunidade α se dissocia do dímero $\beta\gamma$ para ativar a fosfolipase C $\beta1$ (PLC $\beta1$) e, conseqüentemente, promove a hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP $_2$) formando IP $_3$ e diacilglicerol (DAG). Os níveis de IP $_3$ e DAG aumentados culminam com ativação da proteína dependente de cálcio (PKC) e, conseqüentemente, dos Ca_v , aumentando a $[Ca^{2+}]_c$, que favorece a ativação da calmodulina (CaM) por quatro íons de cálcio, formando o complexo $4Ca^{2+}$ -CaM que

ativa a MLCK, promovendo contração do músculo liso (BILLINGTON; PENN, 2003; PELAIA et al., 2008; BERRIDGE, 2014).

Figura 6 – Estrutura dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1.



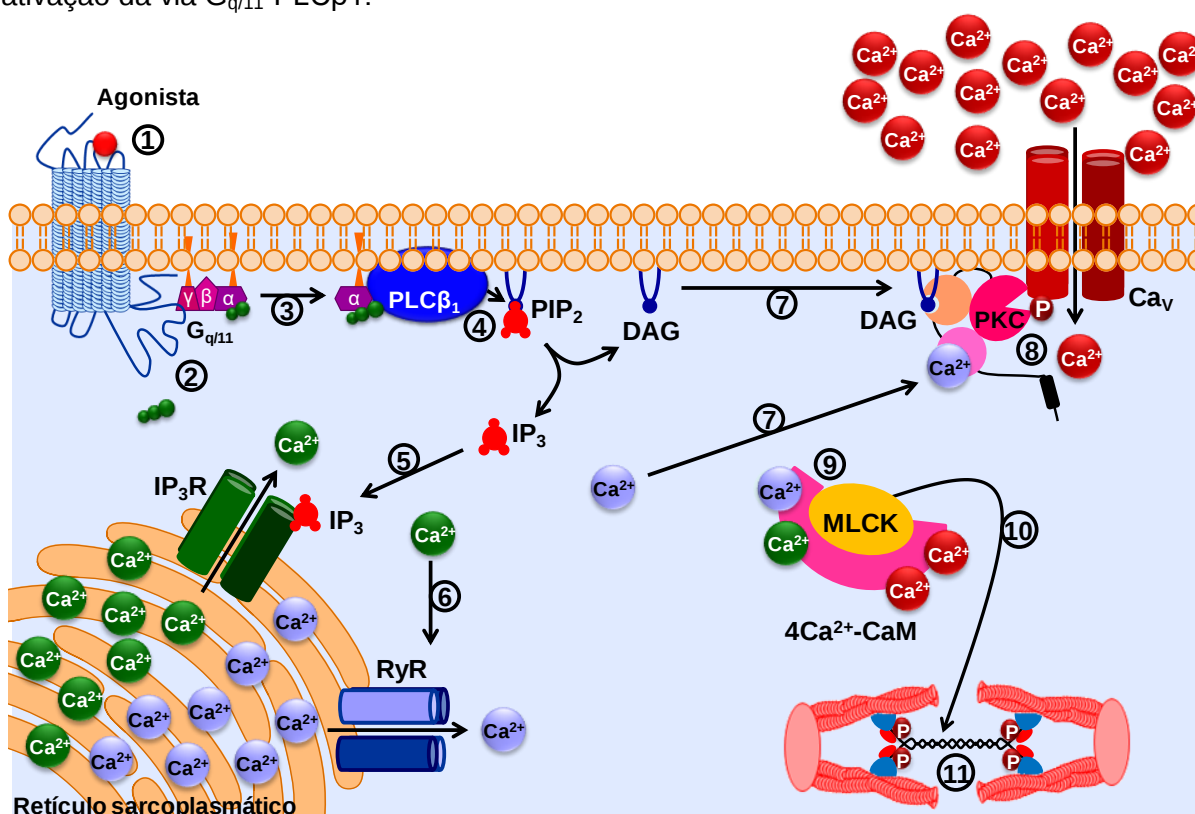
α , β , γ e δ correspondem às subunidades formadoras do canal. N = domínio N-terminal; C = domínio C-terminal (Redesenhado de CATTERALL, 2011).

Fonte: Silva, 2019.

Ainda como mecanismo de contração do músculo liso, tem sido relatado uma via alternativa denominada via de sensibilização ao Ca^{2+} . Essa via envolve a modulação negativa da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) pela PKC, que fosforila, aumentando a atividade do inibidor da fosfatase potencializado por PKC de 17 kDa (CPI-17), e pela proteína G monomérica RhoA (HORI; KARAKI, 1998; PELAIA et al., 2008). Agonistas contráteis como a angiotensina II, a ACh e o CCh aumentam a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por meio da ativação de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), nesse caso, $G_{12/13}$ ou $G_{q/11}$, e levam à ativação direta ou indireta do fator de troca de nucleotídeos de guanina da RhoA (RhoGEF), ativando essa proteína monomérica. A RhoA-GTP uma vez ativada, ativa a Rho cinase (ROCK), e essa fosforila a MLCP nos resíduos de Thr⁶⁹⁶ (inibindo a atividade de fosfatase) e Thr⁸⁵³

(impedindo a interação com a miosina), tornando-a inativa, o que intensifica a ativação da MLC induzida pela MLCK e, dessa forma, mantém a contração do músculo liso. É relatado que a via de sensibilização ao Ca^{2+} exerce um papel fundamental na patogênese molecular da hiper-responsividade brônquica (KIMURA et al., 1996; SOMLYO; SOMLYO, 2003; WOOLDRIDGE et al., 2004; LIU; ZUO; JANSSEN, 2006; BAROFFIO; CRIMI; BRUSASCO, 2008; PELAIA et al., 2008).

Figura 7 – Esquema do mecanismo farmacomecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $\text{G}_{q/11}$ -PLC β 1.



1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2) As proteínas $\text{G}_{q/11}$ são ativadas ao trocarem GDP por GTP; 3) A subunidade $\text{G}_{\alpha q/11}$ -GTP ativa a enzima PLC β 1; 4) A PLC β 1 cliva o fosfolípido de membrana PIP $_2$ em IP $_3$ e DAG; 5) O IP $_3$ migra pelo citosol e ativa o IP $_3$ R presente na membrana do RS, liberando Ca^{2+} dos estoques; 6) O Ca^{2+} liberado ativa o RyR, liberando mais Ca^{2+} para o citoplasma; 7) O Ca^{2+} liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; 8) A PKC ativada fosforila ativando os Ca_v1 e promovendo o influxo de Ca^{2+} ; 9) O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ aumenta a afinidade do Ca^{2+} pela CaM formando o complexo 4Ca^{2+} -CaM e ativa a MLCK; 10) A MLCK ativada fosforila a MLC; 11) A MLC interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Silva, 2019.

Para o músculo liso relaxar é necessário que ocorra a diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e isso pode ocorrer tanto por meio do mecanismo eletromecânico, induzindo a

repolarização ou a hiperpolarização da membrana, como pelo mecanismo farmacomecânico a partir da ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM; BROPHY, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003). Nesse contexto, três mecanismos de relaxamento devem ser considerados: 1) hiperpolarização de membrana; 2) ativação da via NO/cGMP e 3) ativação da via da prostaglandina I_2 (PGI_2)/cAMP (ALBUQUERQUE et al., 2016).

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

Vários subtipos de canais de K^+ podem regular o tônus basal do músculo liso, entre eles, os canais de K^+ : ativados pelo Ca^{2+} de pequena (SK_{Ca}), de intermediária (IK_{Ca}) e de grande (BK_{Ca}) condutância, dependentes de voltagem (K_V), sensíveis ao trifosfato de adenosina – ATP (K_{ATP}) e retificadores de entrada (K_{ir}). A atividade desses canais, além de ser regulada por voltagem e/ou Ca^{2+} , também pode se dar por neurotransmissores, e pelas vias de sinalização que os estimulam. Ao mesmo tempo, os canais de K^+ regulam o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$, a fosforilação da miosina e, conseqüentemente, a contração (THORNELOE; NELSON, 2005; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011; ALEXANDER et al., 2017).

Desses canais, os mais importantes identificados nas vias aéreas são os BK_{Ca} , os K_{ir} e os K_{ATP} , exercendo função e papel distintos na eletrofisiologia e na farmacologia do sistema respiratório. Relata-se que a abertura dos BK_{Ca} seja responsável pela corrente inicial e dos K_{ir} pela corrente tardia de repolarização/hiperpolarização da membrana celular, enquanto dos K_{ATP} possa estar relacionada a diminuição da liberação de neurotransmissor colinérgico e de substância P. A importância desses canais para as vias aéreas foi estabelecida em função de diversos estudos em animais e humanos que caracterizam ativadores de canais de K^+ induzindo hiperpolarização, inibição de reflexos neurais e hiporresponsividade (PELAIA et al., 2002; ALBUQUERQUE et al., 2016).

Com relação ao acoplamento farmacomecânico de relaxamento do músculo liso, esse pode ocorrer via receptores acoplados à proteína G_s , cuja subunidade α ativa a AC, que converte o ATP em cAMP. Quatro moléculas de cAMP ativam a PKA

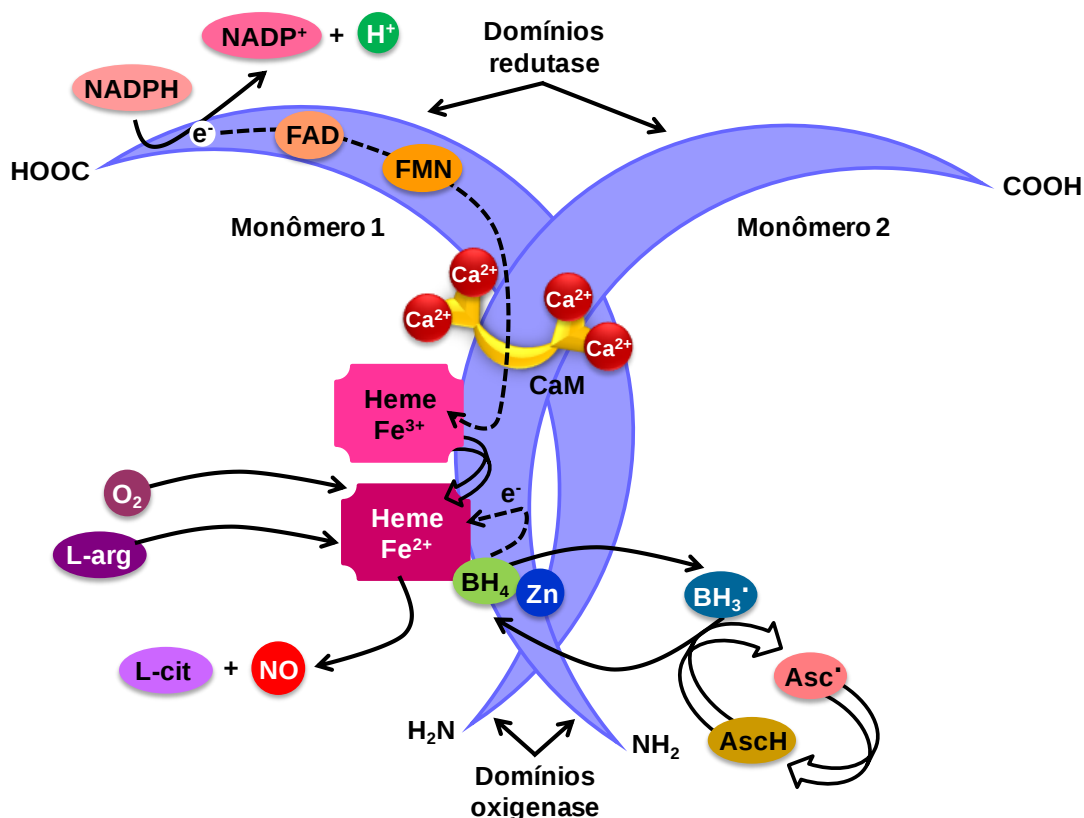
que fosforila diversos alvos intracelulares para promover relaxamento do músculo liso. Além disso, a ativação da proteína G_s culmina com a ativação direta dos BK_{Ca} pela subunidade α -GTP, quando essa proteína está acoplada a receptores adrenérgicos β . Outra via que leva ao relaxamento caracterizado por esse acoplamento é a geração de NO, um fator relaxante derivado do endotélio/epitélio, pelas células musculares lisas e, principalmente, pelo sistema não colinérgico não adrenérgico (NANC), estimulando a ciclase de guanilil solúvel (sGC), que induz a formação de cGMP a partir do GTP. O aumento nos níveis citosólicos desses nucleotídeos em músculo liso é considerado um dos principais mecanismos que medeiam seu relaxamento em condições fisiológicas. Além disso, o NO formado pode ativar diretamente canais de K^+ , especialmente, os BK_{Ca} presentes no músculo liso das vias aéreas (IMASAKI et al., 2001; PELAIA et al., 2002; PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009; PEREZ-ZOGHBI; BAI; SANDERSON, 2010; BERRIDGE, 2014; ALBUQUERQUE et al., 2016; ANTOSOVA et al., 2017).

Para que ocorra formação de NO, um gás solúvel que se difunde pelas membranas das células para promover sua resposta, é necessário à atividade enzimática das sintases do óxido nítrico (NOS). Essas enzimas são divididas em três classes, sendo que duas delas são constitutivas e dependentes do aumento da $[Ca^{2+}]_c$ para ligação à CaM, a NOS neuronal (nNOS ou NOS I) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS III), que produzem baixas quantidades de NO, quando comparadas a iNOS. A terceira classe é da NOS induzível (iNOS ou NOS II) que, geralmente, é ativada num processo inflamatório por citocinas e/ou por fatores microbianos, sendo essa isoforma independente de Ca^{2+} , mas mesmo assim é necessária a ligação à CaM para que sua atividade ocorra. Quando ativada, produz grandes quantidades de NO e, nesse caso, esse gás reage com O_2^- para formar o $ONOO^-$, contribuindo para aumentar o estresse oxidativo celular (MEURS; GOSENS; ZAAGSMA, 2008; WEINBERG et al., 2009).

Com relação a estrutura, as NOS são homodímeros formados por dois monômeros e na presença do grupo heme formam um dímero funcional (Figura 8). Além do grupo heme que contribui para a dimerização dessas enzimas, é necessário a presença de várias moléculas e cofatores, contribuindo para que ocorra a transferência de elétrons do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) para o dinucleotídeo de adenina e flavina (FAD) e o mononucleotídeo de flavina (FMN) nos domínios redutase de um monômero para o grupo prostético

heme férrico (heme Fe^{3+}) do monômero oposto (FÖRSTERMANN; MÜNDEL, 2006; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Figura 8 – Estrutura funcional das sintases do óxido nítrico.



NH_2 = domínio N-terminal; COOH = domínio C-terminal; NO = óxido nítrico; L-arg = L-arginina; L-cit = L-citrulina; e^- = elétron; CaM = calmodulina; NADPH = fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida; NADP^+ = NADPH oxidado; H^+ = próton; FAD = dinucleotídeo de adenina e flavina; FMN = mononucleotídeo de flavina; BH_4 = (6R-)5,6,7,8-tetra-hidro-L-biopterina; $\text{BH}_3^\bullet$ = radical tri-hidrobiopterina; AscH = ácido ascórbico; $\text{Asc}^\bullet$ = radical ascorbato; heme Fe^{3+} = heme férrico; heme Fe^{2+} = heme ferroso; Zn = zinco. Para facilitar o entendimento, demonstrou-se o funcionamento da enzima apenas com o fluxo de elétrons do domínio redutase de um monômero para o domínio oxigenase do outro monômero (Redesenhado de FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

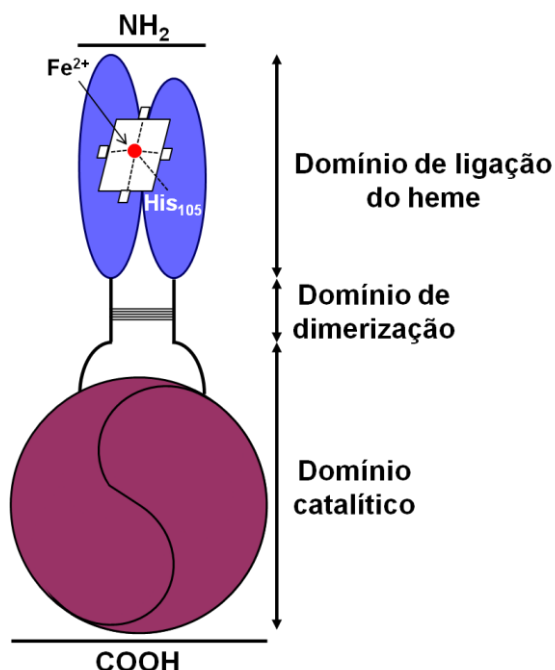
Fonte: Silva, 2019.

O heme Fe^{3+} , ao receber o elétron, é reduzido a heme ferroso (heme Fe^{2+}), que pode receber outro elétron da tetra-hidrobiopterina (BH_4), gerando o radical tri-hidrobiopterina, esse radical é reciclado pelas enzimas NOS ou pelo agente redutor ácido ascórbico. Outro fator essencial para a formação de NO é concentrações suficientes do substrato L-arginina e do cofator BH_4 , dessa maneira, as NOS acoplam ao seu grupo heme e reduzem o oxigênio para converter L-arginina em L-citrulina e NO nos domínios oxigenase, sendo a L-arginina, inicialmente,

hidroxilada e, em seguida, oxidada. Vale ressaltar que todas as isoformas de NOS têm um sítio de ligação na interface do dímero para o íon zinco formar um aglomerado de tiolato de zinco, sua importância é facilitar a ligação da L-arginina e da BH_4 para que ocorra formação de NO (IGNARRO, 1990; FUKUTO; CHAUDHURI, 1995; FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Uma vez formado NO, ocorre ativação do seu respectivo receptor, a sGC por ligação direta a sexta posição do grupo heme, um grupo prostético constituído por um anel de cinco membros, com quatro átomos de nitrogênio, circundando um átomo de ferro na forma reduzida ou oxidada. A ligação do NO ao ferro quebra a ligação entre a histidina e o ferro e, dessa maneira, o NO forma o complexo hemenitrosil ferroso (IGNARRO, 1990; STONE; MARLETTA, 1994; LUCAS et al., 2000). Estruturalmente, a enzima sGC (Figura 9) é formada por um heterodímero (subunidades α e β) que se divide em três domínios: de ligação ao heme, de dimerização e catalítico, onde estão localizados os domínios regulatório e catalítico N- e C-terminal, respectivamente (HARTENECK et al., 1990; BUECHLER; NAKANE; MURAD, 1991; KOESLING; BÖHME; SCHULTZ, 1991; SCHULZ; YUEN; GARBERS, 1991; HOBBS, 1997).

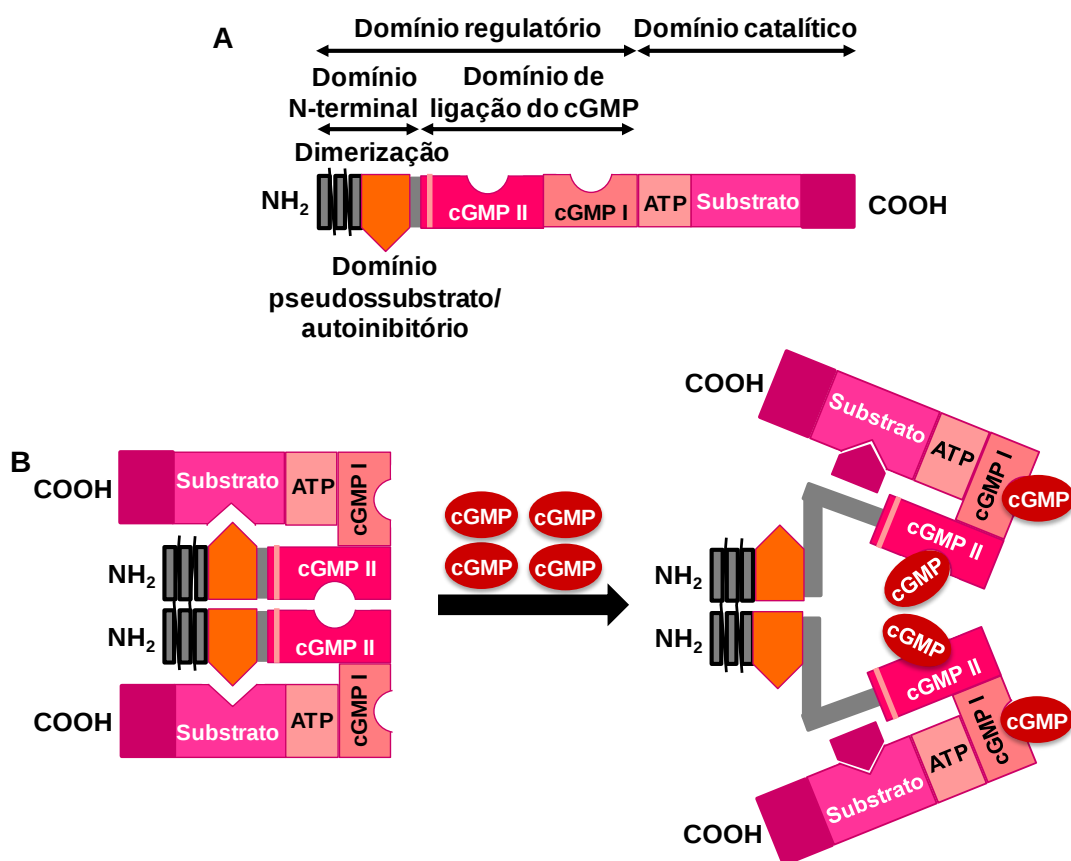
Figura 9 – Estrutura funcional da ciclase de guanilil solúvel.



NH_2 = domínio N-terminal; $COOH$ = domínio C-terminal; Fe^{2+} = ferro; His_{105} = histidina 105 (Redesenhado de LUCAS et al., 2000).

A sGC uma vez ativada, forma o cGMP que ativa a PKG, também chamada de cGK, uma serina/treonina cinase que se divide em dois tipos, PKG I (Figura 10) e II, sendo a do tipo I homodimérica e citosólica, e a do tipo II uma proteína monomérica e de membrana. A PKG I ainda é dividida nos subtipos I α e I β , que se diferem pela afinidade de ligação ao cGMP, 10 vezes maior para a I α . Quanto à localização, a PKG I α é encontrada em cerebelo, coração e, principalmente, pulmões, enquanto a PKG I β é, predominantemente, expressa no hipocampo e nas paquetas. Adicionalmente, ambas as isoformas são expressas em músculo liso vascular, útero, trato gastrintestinal, rins e traqueia. A PKG II é encontrada em rins, intestinos, cérebro, condrócitos e pulmões (BUTT et al., 1995; LUCAS et al., 2000; HOFMANN et al., 2009; WOLFERTSTETTER; HUETTNER; SCHLOSSMANN, 2013).

Figura 10 – Estrutura funcional da proteína cinase G do tipo I.



(A) Conformação aberta da PKG; (B) Ativação da PKG por quatro moléculas de cGMP; NH₂ = domínio N-terminal; COOH = domínio C-terminal; ATP = trifosfato de adenosina; cGMP I = domínio de ligação de alta afinidade do monofosfato cíclico de guanosina; cGMP II = domínio de ligação de baixa afinidade do monofosfato cíclico de guanosina (Redesenhado de HOFMANN et al., 2009).

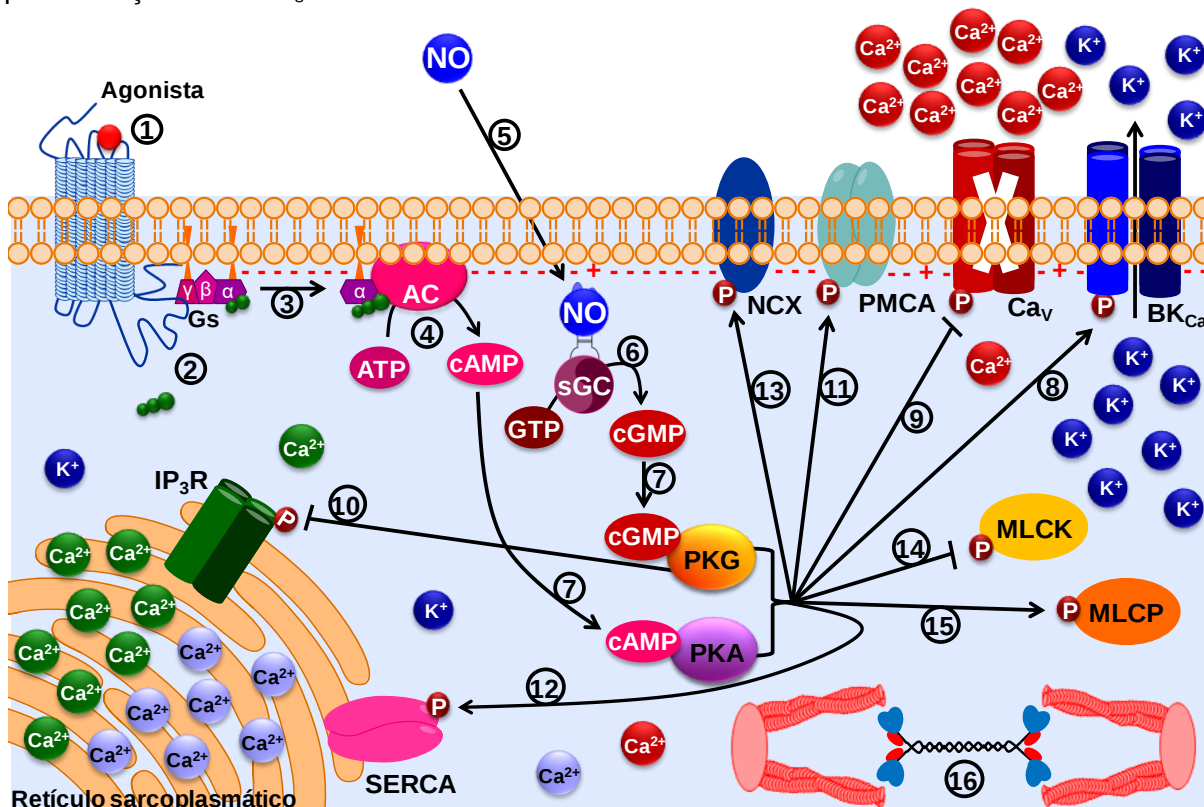
Estruturalmente, a PKG I (Figura 10) possui dois domínios funcionais comuns: o regulatório e o catalítico, sendo o regulatório composto pelos domínios N-terminal e de ligação ao cGMP. A ligação do cGMP em ambos os sítios de ligação no domínio regulatório induz uma alteração conformacional e o domínio autoinibitório (pseudossustrato) do N-terminal expõe o centro catalítico, permitindo a fosforilação de substratos proteicos. No domínio catalítico existe um sítio de ligação para o ATP que favorece a catálise e a transferência de um dos seus grupos fosfatos para resíduos de serina/treonina dos alvos a serem fosforilados (HOFMANN et al., 2009).

Dessa maneira, a PKG e a PKA, quando ativadas, fosforilam vários substratos, levando a: 1) ativação de canais de K^+ , nas vias aéreas é relatado que, majoritariamente, esses canais são os BK_{Ca} , promovendo hiperpolarização da membrana e inibição dos Ca_v ; 2) inibição direta dos Ca_v ; 3) aumento da cinética de atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA); 4) inibição do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX); 5) inativação dos IP_3R pela PKG; 6) ativação da MLCP por fosforilação do resíduo de Ser^{695} da subunidade MYPT1, impedindo a fosforilação no resíduo de Thr^{696} pela ROCK; 7) inibição da MLCK, impedindo a fosforilação da MLC (Figura 11); 8) inativação da RhoA por fosforilação do resíduo Ser^{188} ; 9) fosforilação do telokin (ativador endógeno da MLCP) levando a ativação da MLCP; 10) inibição da $PLC\beta 1$ que reduz a produção de IP_3 (BLAUSTEIN, 1989; REMBOLD, 1992; 1996; WOODRUM; BROPHY, 2001; MURTHY et al., 2003; WOOLDRIDGE et al., 2004; MURTHY, 2006; PEREZ-ZOGHBI; BAI; SANDERSON, 2010; ALBUQUERQUE et al., 2016).

Outra via de sinalização que faz parte do acoplamento farmacomecânico de relaxamento é a da PGI_2 , que culmina com o aumento de cAMP. A PGI_2 faz parte de um grupo de mediadores formados a partir do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pelas ciclo-oxigenases (COXs), os chamados prostanoídes, que se completam com as prostaglandinas E_2 (PGE_2), $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e D_2 (PGD_2), além do tromboxano A_2 (TxA_2). As COXs são divididas em três isoformas, COX-1, COX-2 e COX-3, sendo a primeira constitutiva (plaquetas, vasos sanguíneos, músculo liso, entre outros), a segunda constitutiva em alguns órgãos, como cérebro e rins, mas induzível por citocinas e por outros mediadores da inflamação, e a terceira, que é encontrada no SNC. Cada monômero de COX consiste de um domínio pequeno de fator de crescimento epidérmico na porção N-terminal, um domínio de ligação à membrana e um domínio grande, catalítico e globular na porção C-terminal. Essas enzimas são

inibidas por anti-inflamatórios não esteroidais como o AAS e a indometacina (WARNER; MITCHELL, 2002; BLOBAUM; MARNETT, 2007; ROUZER; MARNETT, 2009).

Figura 11 – Esquema do mecanismo farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s /AC/PKA e NO/sGC/PKG.



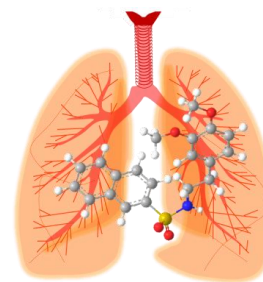
1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2) A G_s é ativada ao trocar GDP por GTP; 3) A subunidade G_{α_s} -GTP ativa a AC; 4) A AC converte ATP em cAMP; 5) O NO gerado dos nervos nitrérgicos ativa sGC; 6) A sGC converte GTP em cGMP; 7) cAMP e cGMP ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG, que fosforilam vários substratos, diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$; 8) Ativam os BK_{Ca} ; 9 e 10) Inibem os Ca_v e os IP_3R , nesse caso, apenas a PKG; 11, 12 e 13) Aumentam as cinéticas de atividade da PMCA, da SERCA e do trocador Na^+/Ca^{2+} ; 14) Inibem a MLCK; 15) Ativam MLCP, reduzindo sua afinidade pelo $4Ca^{2+}$ -CaM, impedindo a ativação da MLC. 16) A MLC não interage com os filamentos de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Silva, 2019.

Os prostanoides tem efeito opostos, por exemplo, $PGF_2\alpha$ (receptor FP) e TxA_2 (receptor TP) promovem broncoconstrição, enquanto PGI_2 (receptor IP) causa broncodilatação. Já a PGD_2 e a PGE_2 têm um papel dual, pois podem causar tanto contração como relaxamento, isso é possível, uma vez que, esses dois prostanoides têm mais de um subtipo de receptor e dependendo do seu acoplamento, as

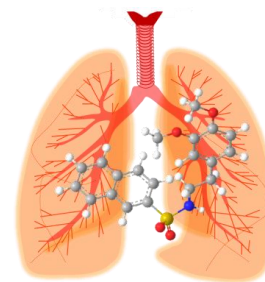
respostas serão opostas. Os receptores da PGD_2 são DP_1 e DP_2 que acoplam as proteínas G_s (broncodilatação) e $G_{i/o}$ (broncoconstrição), respectivamente, enquanto a PGE_2 tem quatro subtipos de receptores (EP_{1-4}), acoplando as proteínas $G_{q/11}$, G_s , $G_{i/o}$ e G_s , respectivamente, dessa maneira, causando broncoconstrição (EP_1 e EP_3) ou broncodilatação (EP_4 e EP_2). Um exemplo disso é que o receptor EP_3 é responsável por causar tosse e o receptor EP_4 por promover relaxamento nas vias aéreas humanas (SMYTH et al., 2009; ZASLONA; PETERS-GOLDEN, 2015).

Diante do exposto e tendo em vista que o LASSBio-448 diminuiu o remodelamento e a hiper-reatividade das vias aéreas em modelos experimentais, assim como, relaxou traqueia de cobaia não asmática e asmática (CARDOZO, 2010; MEDEIROS, 2015; SOUZA, 2015; MARTINS, 2016, NUNES et al., 2016), a hipótese deste trabalho é que um ou mais derivados apresente uma potência maior em comparação ao LASSBio-448. E que o mecanismo de ação relaxante do mais potente envolva a modulação da via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos e/ou outra(s) via(s) em traqueia de cobaia.



3 Objetivos

- Investigar um possível efeito relaxante em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (GC) e com IPAC (GIPAC), na presença e na ausência de epitélio funcional do(s):
 - LASSBio-448, apenas no GIPAC;
 - Derivados *N*-metilssulfonamídicos (LASSBios-1630, -1610, -1631, -1628, -1612 e -1623);
 - Derivados sulfonamídicos (LASSBios-1622, -1613, -1722, -1629, -1625 e -1611);
- Comparar as eficácias e as potências relaxantes dos derivados *N*-metilssulfonamídicos e sulfonamídicos com a do protótipo, o LASSBio-448;
- Caracterizar o mecanismo de ação relaxante do derivado mais potente em traqueia isolada de cobaia do GC e/ou GIPAC, avaliando, em níveis funcional e/ou *in silico*, a participação do/a(s):
 - Receptores muscarínicos;
 - Sintase do óxido nítrico;
 - Ciclase de guanilil solúvel;
 - Proteína cinase G;
 - Fosfodiesterase 5;
 - Canais de cálcio dependentes de voltagem;
 - Ciclo-oxigenases;
- Avaliar, *in silico*, as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do derivado mais potente nos estudos funcionais.



4 *Material e métodos*

4.1 Material

4.1.1 Substâncias-teste

Os LASSBios-448, -1610, -1630, -1631, -1628, -1612, -1623, -1622, -1613, -1722, -1629, -1625 e -1611 foram gentilmente cedidos pelos Profs. Drs. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro e Lídia Moreira Lima do LASSBio[®]/UFRJ.

4.1.2 Animais

Os cobaias (*Cavia porcellus*), n total = 156, da linhagem Dunkan-Hartley, de ambos os sexos, pesando entre 300-500 g eram fornecidos pela Unidade de Produção Animal 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* (Nuvilab[®] Cobaias) acrescida de capim, suplementados com ácido ascórbico, com acesso a água *ad libitum*, ventilação, umidade 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. Os experimentos eram realizados no período das 8-22 h e seguiam os princípios de cuidados com animais, de acordo com o *Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies* (SHERWIN et al., 2003) e com o Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2016). Os procedimentos

experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal da UFPB (Certidão Nº 018/2015) (ANEXO A).

4.1.3 Substâncias e reagentes

Os cloretos de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), de sódio (NaCl) e de potássio (KCl), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido clorídrico (HCl) foram adquiridos da Êxodo Científica (Brasil). O álcool etílico absoluto foi adquirido da FMaia (Brasil). O $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, o KCl , o KH_2PO_4 e o $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ eram dissolvidos e diluídos em água destilada ou osmose reversa para obtenção de cada solução-estoque que foram mantidas sob refrigeração. As demais substâncias eram mantidas em temperatura ambiente e diluídas em água destilada de acordo com cada protocolo experimental.

O óleo de castor (Cremophor EL[®]), os cloridratos de carbamilcolina (CCh), de L-arginina (L-arg) e de N_ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), a 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-ona (ODQ), a ovalbumina (OVA) (Grade V), a indometacina e o Rp-8-bromo- β -fenil-1, N^2 -etenoguanosina-3',5', monofosforotioato cíclico (Rp-8-Br-PET-cGMPS) foram adquiridos da Merck (Brasil). O AA foi adquirido da Cayman Chemical (EUA). O dimetilsulfóxido (DMSO), a solução fisiológica estéril 0,9% e a sildenafil foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (EUA), da Servecampo (Brasil) e da Dilecta – Farmácia de Manipulação & Homeopatia (Brasil), respectivamente.

O Cremophor[®], o DMSO, a sildenafil e a L-arg eram armazenados em temperatura ambiente, a OVA era conservada a 4-8 °C e as demais substâncias eram armazenadas à temperatura de -20 °C. Quando necessário, eram dissolvidas e diluídas em água destilada ou osmose reversa, exceto a indometacina, o AA e a ODQ que eram dissolvidos em álcool etílico absoluto, a OVA que era dissolvida em solução fisiológica estéril 0,9% e a sildenafil que era dissolvida em DMSO 5%/água destilada ou osmose reversa, nas concentrações de 10^{-2} M e armazenadas a 4-8 °C, sendo rediluídas em água destilada ou osmose reversa em concentrações apropriadas de acordo com o protocolo experimental. O Cremophor[®] e o DMSO não eram dissolvidos/diluídos. A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi adquirida da White Martins (Brasil).

4.1.4 Solução nutritiva

De acordo com os experimentos realizados, eram utilizadas as soluções nutritivas descritas abaixo, com um pH 7,4 ajustado com HCl ou NaOH 1 N:

- **Krebs com composição (mM):** NaCl 118,0; KCl 4,6; MgSO₄ 5,7; KH₂PO₄ 1,1; CaCl₂ 2,5; Glicose 11,0; NaHCO₃ 25,0;
- **Krebs despolarizante (KCl 18 mM) com composição (mM):** NaCl 104,6; KCl 18,0; MgSO₄ 5,7; KH₂PO₄ 1,1; CaCl₂ 2,5; Glicose 11,0; NaHCO₃ 25,0;
- **Krebs despolarizante (KCl 60 mM) com composição (mM):** NaCl 62,6; KCl 60,0; MgSO₄ 5,7; KH₂PO₄ 1,1; CaCl₂ 2,5; Glicose 11,0; NaHCO₃ 25,0;
- **Krebs despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem cálcio com composição (mM):** NaCl 62,6; KCl 60,0; MgSO₄ 5,7; KH₂PO₄ 1,1; Glicose 11,0; NaHCO₃ 25,0;

4.1.5 Aparelhos

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, era conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.5.1 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 da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Para indução da IPAC era utilizada uma caixa poliacrílica fechada (20 x 13 x 15 cm), contendo um orifício para renovação do ar e acoplada a um inalador ultrassônico *Pulmosonic Star Premium* com uma taxa de nebulização entre 0,5-1,25 mL/min e 80% das partículas com tamanho menor do que cinco micra (Soniclear, São Paulo, SP).

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 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil) e os animais em

balança semianalítica modelo ELP-6/15/30 (Balmak, Santa Bárbara d'Oeste, SP, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das soluções-estoque das substâncias-teste

Como os LASSBios não apresentavam 100% de pureza, calculou-se o fator de correção para se preparar as soluções-estoque de cada derivado. Após pesagem, os LASSBios eram solubilizados em Cremophor[®] (3%) e diluídos em água destilada ou osmose reversa, exceto o LASSBio-1611 que era diluído em Krebs, uma vez que precipitou em água, para obtenção das soluções-estoque (10^{-2} M) que eram estocadas a 0 °C, sendo todas rediluídas em água destilada ou osmose reversa de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final do Cremophor[®] nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v) que, nesta concentração, é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativa no órgão estudado, de acordo com experimentos anteriores (dados não publicados).

4.2.2 Indução de inflamação pulmonar alérgica crônica por nebulização com ovalbumina em cobaia

Para a nebulização os cobaias, com peso inicial entre 300-350 g, eram colocados individualmente em uma caixa poliacrílica fechada (com um orifício de 1,5 cm em um dos lados laterais e no terço superior da caixa, para a saída do gás carbônico expirado pelos animais) acoplada a um inalador ultrassônico (Figura 12). Em seguida eram nebulizados com OVA, diluída em solução fisiológica estéril 0,9%, por 15 minutos ou até o início de desconforto respiratório, definido pela presença de espirros, coriza, tosse e/ou retração da parede torácica.

O protocolo de 28 dias consistia de sete nebulizações realizadas com intervalos de 96 h entre cada nebulização, sendo a concentração de OVA aumentada (1-5 mg/mL) para evitar tolerância. Nas primeiras quatro nebulizações (dias 1, 5, 9 e 13), a dose de OVA era de 1 mg/mL, na quinta e na sexta nebulizações (dias 17 e 21), os animais recebiam solução de OVA 2,5 mg/mL e na última nebulização (dia 25), a dose de OVA era aumentada para 5 mg/mL. Após

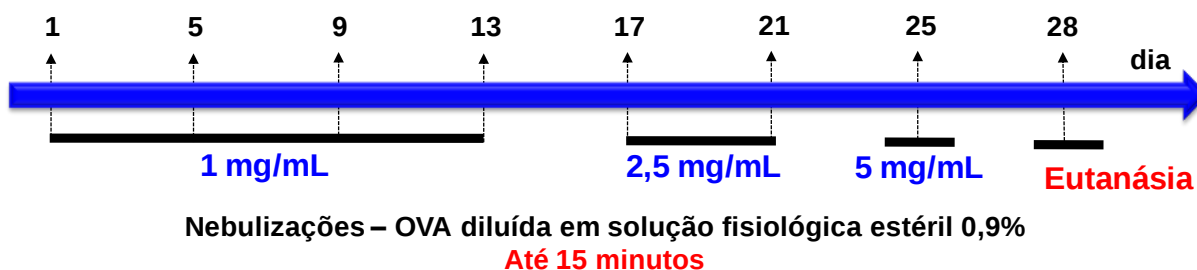
72 h, os animais eram eutanasiados para realização dos experimentos *in vitro* (Figura 13) (Adaptado de TIBÉRIO et al., 1997; ANGELI et al., 2008; PIGATI et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2019).

Figura 12 – Aparelho utilizado para indução de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaia.



Fonte: Silva, 2019.

Figura 13 – Protocolo representativo da indução de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaia.



Fonte: Silva, 2019.

Os animais do GC não eram nebulizados com solução fisiológica estéril 0,9%, uma vez que em experimentos anteriores em nosso laboratório foi demonstrado que não há diferença nas potências e nas eficácias contrátil e relaxante de traqueia isolada de cobaia não nebulizado e nebulizado com solução fisiológica estéril 0,9% (dados não publicados).

A análise, *in vitro*, da indução do quadro de IPAC era feita pela Reação de Schultz-Dale, na qual a traqueia era estimulada com solução de OVA 10 µg/mL. Essa reação é caracterizada por liberação de mediadores contráteis pelas células do microambiente (SCHULTZ, 1910; DALE, 1913; GEIGER; ALPERS; TEXAS, 1959; JONES; CHARETTE; DENIS, 1988), uma vez observada reatividade contrátil na traqueia, de acordo com o padronizado por Vasconcelos et al. (2019), o animal nebulizado com OVA era considerado sensibilizado e dava-se continuidade ao experimento, em caso contrário, o animal era descartado.

4.2.3 Preparação dos anéis de traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e com inflamação pulmonar alérgica crônica

Os cobaias eram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de secção dos vasos cervicais, esse procedimento era o mais indicado, uma vez que o uso de guilhotina promove dano à traqueia. Além disso, o exsanguinamento garante a total retirada do sangue do leito vascular, o que poderia interferir nos experimentos pela presença de substâncias que modulam a contratilidade muscular lisa quando em contato com o lúmen da traqueia. Adicionalmente, o uso de anestésicos poderia interferir com o potencial de membrana da célula muscular lisa, alterando a atividade de canais iônicos (FANTONI; CORTOPASSI; BERNARDI, 2011, MEDRADO, 2010). Tais medidas são amparadas pela Resolução nº 1000/2012 e pelo Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais – Conceitos e Procedimentos Recomendados, ambos do Conselho Federal de Medicina Veterinária (BRASIL, 2012; 2013).

Após a eutanásia, a traqueia era retirada, limpa de todo o tecido conjuntivo e adiposo e segmentada em fragmentos contendo 3-4 anéis de cartilagem, que eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável em cubas de banho para órgão isolado contendo solução nutritiva de Krebs e sob tensão de 1 g. Estes tecidos eram mantidos a 37 °C, gaseificados com carbogênio e permaneceram em repouso por 60 minutos, sendo a solução nutritiva trocada a cada 15 minutos para evitar a interferência de metabólitos liberados pelo órgão no meio. Após o período de estabilização, uma primeira contração era induzida pela adição de 10^{-6} M de CCh à cuba (MACÊDO et al., 2015).

A integridade do epitélio da traqueia era verificada pela adição de 10^{-4} M de AA a cuba durante a fase tônica da primeira resposta induzida por CCh, os anéis que obtivessem relaxamentos superiores a 50% (em relação a força de contração inicial) eram considerados com epitélio funcional. Os anéis de traqueia sem epitélio eram obtidos através da retirada do mesmo por atrito do lúmen do órgão com uma agulha envolta em algodão e embebido em solução de Krebs. A retirada do epitélio era confirmada com relaxamentos inferiores a 10%, em resposta à adição de AA (Adaptado de TSCHIRHART et al., 1987).

4.2.4 Triagem farmacológica do LASSBio-448 e de seus derivados *N*-metilssulfonamídicos e sulfonamídicos

4.2.4.1 Avaliação do efeito relaxante sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e com IPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional

A traqueia era preparada de acordo com o item 4.2.3. Após verificar a integridade do epitélio era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh e, sobre o componente tônico, os LASSBios-448, -1630, -1610, -1631, -1628, -1612, -1623, -1622, -1613, -1722, -1629, -1625 e -1611 eram adicionados de maneira cumulativa e em preparações diferentes à cuba, tanto em traqueia na presença como na ausência de epitélio funcional. O efeito relaxante do LASSBio-448 foi avaliado apenas no grupo com IPAC, uma vez que Martins (2016) já havia avaliado o efeito desse LASSBio em traqueia isolada de cobaia controle. O relaxamento produzido por cada LASSBio foi calculado como efeito máximo ($E_{\max}$) e expresso como a porcentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. As potências dos LASSBios foram calculadas por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta e comparadas por meio dos valores do logaritmo negativo, na base 10, da concentração de cada LASSBio que promovia 50% do seu $E_{\max}$ (pCE_{50}) (NEUBIG et al., 2003).

4.2.5 Caracterização do mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional

4.2.5.1 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos no efeito relaxante do LASSBio-1611

A traqueia era preparada como descrito no item 4.2.3. Após a confirmação da ausência do epitélio funcional, a preparação era lavada a cada 15 minutos e, após o retorno da tensão à linha de base, era induzida uma curva concentração-resposta cumulativa ao CCh, agonista dos receptores muscarínicos (MORRISON; VANHOUTTE, 1992). Em seguida, a preparação era lavada, esperava-se a tensão retornar à linha de base, o LASSBio-1611 era pré-incubado e após 15 minutos era induzida uma segunda curva concentração-resposta cumulativa ao CCh.

A reatividade contrátil era calculada com base na amplitude média da resposta da traqueia isolada de cobaia com IPAC e comparada na ausência e na presença do LASSBio-1611, com base nos valores de E_{max} e de pCE_{50} do CCh, calculados a partir das curvas concentrações-resposta cumulativas.

4.2.5.2 Avaliação da participação da via do óxido nítrico no efeito relaxante do LASSBio-1611

4.2.5.2.1 Avaliação da participação da sintase do óxido nítrico em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de L-NAME e de L-arginina + L-NAME

A traqueia era preparada como descrito no item 4.2.3. Após a confirmação da ausência do epitélio funcional, a preparação era lavada a cada 15 minutos e, após o retorno da tensão à linha de base, era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh e, sobre o componente tônico dessa contração, era adicionado o LASSBio-1611 de forma cumulativa (curva-controle). Em outros experimentos, era adicionado à cuba 10^{-4} M de L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS (BOER et al., 1996), ou era adicionado, simultaneamente, 10^{-3} M de L-arginina, substrato para a NOS, e 10^{-4} M de L-NAME (Adaptado de SCHLEMPER; CALIXTO, 1994). Após 20 minutos era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh e sobre o componente tônico dessa

contração era adicionado o LASSBio-1611 de maneira cumulativa. O objetivo desse protocolo era avaliar a participação da NOS, bem como a reversibilidade do efeito inibitório do L-NAME sobre o efeito relaxante do LASSBio-1611.

O relaxamento produzido pelo LASSBio-1611 era expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por CCh. A eficácia e a potência relaxantes do LASSBio-1611 foram avaliadas comparando-se os valores $E_{\max}$ e de pCE_{50} , respectivamente, na ausência e na presença do inibidor e/ou substrato, calculados a partir das curvas concentrações-resposta.

4.2.5.2.2 Avaliação da participação da ciclase de guanilil solúvel em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de ODQ

A traqueia era preparada como descrito no item 4.2.3. Após obtenção da curva-controle, em outros experimentos, 10^{-5} M de ODQ, um inibidor de sGC, era adicionado à cuba e após 30 minutos (Adaptado de: HWANG; WU; TENG, 1998), uma contração era induzida por 10^{-6} M de CCh e sobre o componente tônico era adicionado o LASSBio-1611 de maneira cumulativa.

A eficácia e a potência relativas do LASSBio-1611 eram avaliadas como descrito anteriormente.

4.2.5.2.3 Avaliação da participação da proteína cinase G em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS

A traqueia era preparada como descrito no item 4.2.3. Após obtenção da curva-controle, em experimentos diferentes, era pré-incubado por 30 minutos 10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS, um inibidor de PKG (Adaptado de LI et al., 2001), após esse tempo era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh e sobre o componente tônico o LASSBio-1611 era adicionado de maneira cumulativa.

A eficácia e a potência relaxantes do LASSBio-1611 eram avaliadas como descrito anteriormente.

4.2.5.3 Avaliação da participação da fosfodiesterase 5 no efeito relaxante do LASSBio-1611

4.2.5.3.1 Avaliação do efeito relaxante da sildenafil em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença do LASSBio-1611

A traqueia era preparada como descrito no item 4.2.3. Após a confirmação da ausência do epitélio funcional, a preparação era lavada a cada 15 minutos e, após a tensão retornar à linha de base, era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh e, sobre o componente tônico dessa contração, era adicionada a sildenafil, um inibidor seletivo de PDE5 (LUGNIER, 2006; RODRÍGUEZ-RAMOS; GONZÁLEZ-ANDRADE; NAVARRETE, 2011), de forma cumulativa (curva-controle). Em experimentos diferentes, o LASSBio-1611 era pré-incubado na concentração de 3×10^{-8} M (concentração que mais se aproxima da pCE_{50}) por 15 minutos e, em seguida era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh e sobre o componente tônico, a sildenafil era adicionada de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pela sildenafil era expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por CCh. A eficácia e a potência relaxante da sildenafil era avaliada de acordo com os valores de E_{max} e de pCE_{50} , respectivamente, na ausência e na presença do LASSBio-1611, calculados a partir das curvas concentrações-resposta.

4.2.5.4 Avaliação da participação dos canais de potássio e/ou de cálcio dependentes de voltagem no efeito relaxante do LASSBio-1611

4.2.5.4.1 Avaliação do efeito relaxante do LASSBio-1611 sobre as contrações tônicas induzidas por 18 ou por 60 mM de KCl em traqueia isolada de cobaia com IPAC

A traqueia era preparada como descrito no item 4.2.3. Após a confirmação da ausência do epitélio funcional, a preparação era lavada a cada 15 minutos e, após o retorno da tensão à linha de base, era induzida uma contração com solução isomolar de 18 ou de 60 mM de KCl (BOLTON, 1979; Adaptado de CREESE;

DENBOROUGH, 1981; MACÊDO et al., 2015) e, sobre o componente tônico dessa contração, era adicionado o LASSBio-1611 de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo LASSBio-1611 era expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por KCl. A eficácia e a potência relaxantes do LASSBio-1611 foram avaliadas de acordo com o descrito no item 4.2.4.1.

4.2.5.4.2 Avaliação da reatividade contrátil ao cloreto de cálcio em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência e na presença do LASSBio-1611

A traqueia era preparada como descrito no item 4.2.3. Após a confirmação da ausência do epitélio funcional, a preparação era lavada e 15 minutos depois a solução de Krebs era trocada por uma solução de Krebs despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+} e, após 45 minutos, era induzida uma curva concentração-resposta cumulativa ao CaCl_2 (Adaptado de ISHII; SHIMO, 1986; CHEN; KO, 2017). Em seguida, a preparação era lavada, esperava-se o retorno da tensão à linha de base, o LASSBio-1611 era pré-incubado e após 15 minutos era induzida uma segunda curva concentração-resposta cumulativa ao CaCl_2 .

A reatividade contrátil era calculada com base na amplitude média da resposta da traqueia isolada de cobaia com IPAC e comparada na ausência e na presença do LASSBio-1611, com base nos valores de E_{max} e de pCE_{50} do CaCl_2 , calculados a partir das curvas concentrações-resposta cumulativas.

4.2.5.5 Avaliação da participação da via das ciclo-oxigenases no efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de indometacina e de L-NAME + indometacina

A traqueia era preparada como descrito no item 4.2.3. Após obtenção da curva-controle, em experimentos diferentes, era adicionado à cuba 10^{-5} M de indometacina, um inibidor não seletivo de COX (Adaptado de CHOU; CHEN; LIN-SHIAU, 1996) ou 10^{-4} M de L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS (BOER et al., 1996), e 10^{-5} M de indometacina, simultaneamente, após 30 minutos, era

induzida uma contração por 10^{-6} M de CCh e sobre o componente tônico o LASSBio-1611 era adicionado de maneira cumulativa.

A eficácia e a potência relaxantes do LASSBio-1611 eram avaliadas como descrito anteriormente.

4.2.5.6 Estudo de *docking* molecular

4.2.5.6.1 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou ligantes padrões e os alvos moleculares: NOS, sGC, PKG, PDE5, $\text{Ca}_v1.2$ e COX-2

Estes estudos foram realizados em parceria com a Dra. Luciana Scotti do PPgPNSB/CCS/UFPB.

As estruturas das macromoléculas iNOS (PDB ID 2BHJ) (JACKSON et al., 2005), nNOS (PDB ID 1LZX) (LI et al., 2002), sGC (PDB ID 2FAW) (WINTJENS et al., 2006), PKG (PDB ID 6BDL) (QUIN et al., 2018), PDE5 (PDB ID 1T9R) (ZHANG et al., 2004), $\text{Ca}_v1.2$ (PDB ID 3G43) (FALLON et al., 2009) e COX-2 (PDB ID 5F19) (LUCIDO et al., 2016) foram baixadas do banco de dados PDB (<https://www.rcsb.org/>).

Na etapa de preparação, os ligantes L-arginina (substrato para as NOS), cinaciguat (ativador de sGC), cGMP (ativador de PKG), sildenafil (inibidor de PDE5), nifedipino (bloqueador de Ca_v), etoricoxibe (inibidor de COX-2) e o LASSBio-1611 (molécula-teste) foram desenhados no programa *ChemBioDraw Ultra* 12.0, salvos como arquivos .cdx e convertidos em .sdf pelo programa *MarvinSketch*. Em seguida, as energias estruturais foram minimizadas por mecânica molecular, que é a minimização mais simples e que desconsidera os elétrons, no programa *Spartan* versão 14.0 e submetidos ao *docking* molecular no programa *Molegro Virtual Docker* (MVD), versão 6.0.1 (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Todas as moléculas de água e os cofatores foram eliminados das estruturas das macromoléculas, essas macromoléculas e os compostos foram preparados usando as mesmas configurações de parâmetros *default* do *software*. O acoplamento foi realizado usando um *MolDock Score* (GRID) de 15 Å de raio e resolução de 0,30 Å para cobrir o local de ligação do ligante a estrutura da macromolécula. O modelo de encaixe foi gerado por *template*.

4.2.6 Análise teórica, calculada *in silico*, de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos para o LASSBio-1611

As propriedades físico-químicas (massa molecular, coeficientes de partição e de dissociação, constante de ionização e solubilidade) e farmacocinéticas de absorção, de distribuição, de metabolismo, de excreção e de toxicidade (ADMET) para o LASSBio-1611 foram calculadas *in silico* através do Programa ACD/Percepta 14.0. Os parâmetros farmacocinéticos avaliados foram permeação a célula (Caco-2), ligação a proteínas plasmáticas, volume de distribuição, biodisponibilidade oral, capacidade de penetração ao SNC, ensaio mutagênico de AMES, estabilidade metabólica microsomal (HLM) e ensaio cardiotoxico de *hERG*.

4.2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste *t* de Student e/ou a análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey, sendo a hipótese nula rejeitada quando $p < 0,05$. Como parâmetros de eficácia e de coeficiente de correlação não linear foram calculados o $E_{\max}$ e o R^2 , respectivamente. Como parâmetro de potência foi calculado o pCE_{50} (NEUBIG et al., 2003) por regressão não linear, usando a seguinte equação:

$$Y = bottom + \frac{(top - bottom)}{1 + 10^{(\log CE_{50} - X) \cdot HillSlope}}$$

Onde:

Y = resposta de cada LASSBio em porcentagem;

X = concentração do agonista;

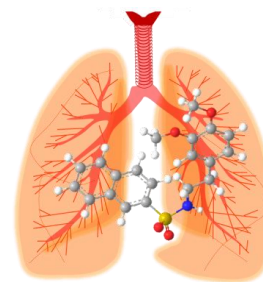
Bottom = menor efeito assumido para Y;

Top = maior efeito assumido para Y;

$\log CE_{50}$ = logaritmo negativo, na base 10, da concentração de cada LASSBio que promovia 50% do seu $E_{\max}$;

Hill Slope = valor da constante de *Hill*.

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 do LASSBio-448 e de seus derivados *N*-metilssulfonamídicos e sulfonamídicos

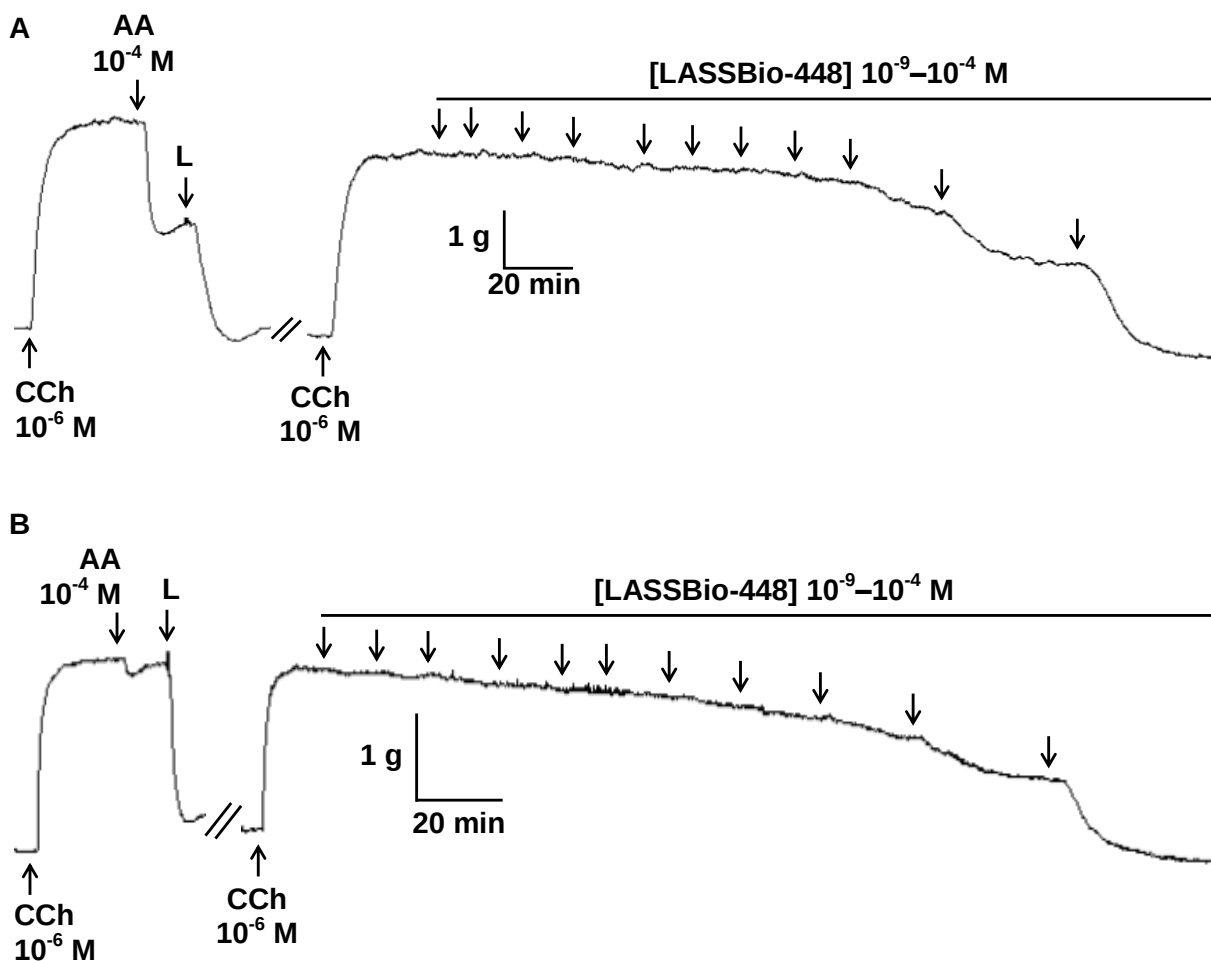
5.1.1 Avaliação do efeito relaxante do LASSBio-448 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional

O LASSBio-448 (10^{-9} – 10^{-4} M, $n = 5$) relaxou, de maneira dependente de concentração, a traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contráida com CCh, tanto na presença ($E_{\max} = 119,0 \pm 8,1\%$; $pCE_{50} = 4,98 \pm 0,17$; $R^2 = 0,929 \pm 0,013$) como na ausência ($E_{\max} = 119,9 \pm 9,3\%$; $pCE_{50} = 4,94 \pm 0,14$; $R^2 = 0,950 \pm 0,010$) de epitélio funcional, não se observando diferenças estatísticas entre os valores de eficácia e de potência relaxantes (Figura 14 e Gráfico 1).

O tempo de relaxamento do LASSBio-448 foi de $251,6 \pm 18,0$ e $218,2 \pm 13,3$ minutos na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente (dados não mostrados).

A responsividade da traqueia ao CCh foi revertida em, aproximadamente, 75 e 60% na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente, após 1 h da remoção do composto das preparações (dados não mostrados).

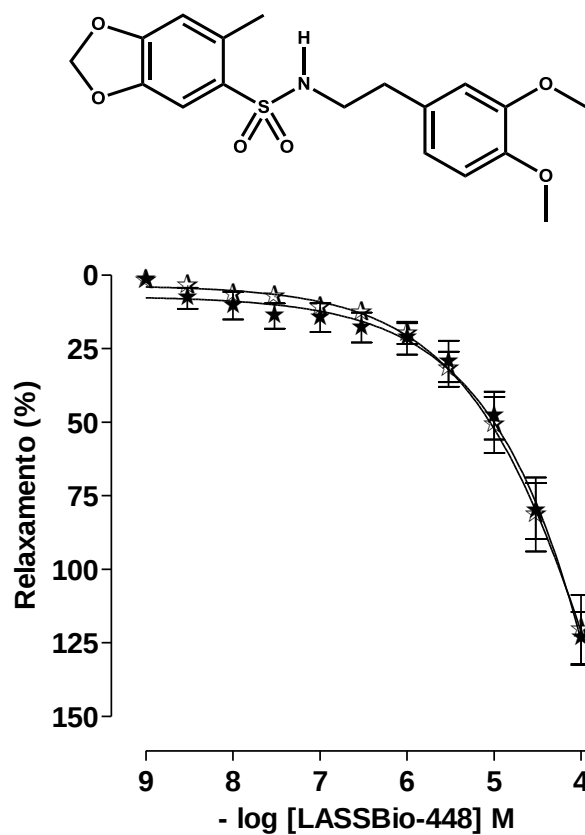
Figura 14 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-448 em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-448 (A e B), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 1 – Efeito relaxante do LASSBio-448 em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída 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: Silva, 2019.

5.1.2 Avaliação do efeito relaxante dos derivados *N*-metilssulfonamídicos (LASSBio-1630, -1610, -1631, -1628, -1612 e -1623) sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia isolada de cobaia controle e com IPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional

O LASSBio-1630 (10^{-9} – 3×10^{-4} M, $n = 5$) relaxou a traqueia isolada de cobaia do grupo controle (GC) e do grupo com IPAC (GIPAC) pré-contraída com CCh, tanto na presença ($E_{\max} = 111,7 \pm 6,2$ e $113,7 \pm 12,6\%$; $pCE_{50} = 4,82 \pm 0,24$ e $4,79 \pm 0,06$; $R^2 = 0,869 \pm 0,030$ e $0,899 \pm 0,029$, respectivamente) como na ausência ($E_{\max} = 130,5 \pm 9,3$ e $127,0 \pm 11,9\%$; $pCE_{50} = 4,60 \pm 0,14$ e $4,37 \pm 0,14$; $R^2 = 0,897 \pm 0,020$ e $0,915 \pm 0,021$, respectivamente) de epitélio funcional, sendo 2,6 vezes mais potente na presença do que na ausência de epitélio funcional no GIPAC. Além disso, não se observou diferenças ao comparar as eficácias relaxantes entre si e entre os grupos experimentais GC e GIPAC (Figura 15, Gráfico 2 e Tabela 1).

Esse relaxamento, dependente de concentração, da traqueia de cobaia do GC e do GIPAC também foi observado para o LASSBio-1610 (10^{-9} – 10^{-4} M, $n = 5$), tanto na presença ($E_{\max} = 124,3 \pm 7,0$ e $108,7 \pm 11,8\%$; $pCE_{50} = 4,97 \pm 0,07$ e $5,08 \pm 0,21$; $R^2 = 0,893 \pm 0,035$ e $0,926 \pm 0,028$, respectivamente) como na ausência ($E_{\max} = 105,1 \pm 10,0$ e $98,3 \pm 4,1\%$; $pCE_{50} = 5,33 \pm 0,10$ e $5,12 \pm 0,18$; $R^2 = 0,937 \pm 0,013$ e $0,934 \pm 0,019$, respectivamente) de epitélio funcional. Ao comparar os valores de $E_{\max}$ e de pCE_{50} , não se observou diferenças estatísticas entre as eficácias tanto no GC como no GIPAC, no entanto o LASSBio-1610 foi 2,3 vezes mais potente em relaxar a traqueia na ausência do que na presença de epitélio no GC (Figura 16, Gráfico 3 e Tabela 2).

Com relação ao LASSBio-1631 (10^{-9} – 3×10^{-4} M, $n = 5$), observou-se que esse derivado também relaxou, de maneira dependente de concentração, a traqueia isolada do GC na presença ($E_{\max} = 98,2 \pm 11,7\%$; $pCE_{50} = 4,30 \pm 0,10$; $R^2 = 0,756 \pm 0,052$) e na ausência ($E_{\max} = 100,7 \pm 10,2\%$; $pCE_{50} = 4,63 \pm 0,09$; $R^2 = 0,842 \pm 0,030$) de epitélio funcional, sendo 2,1 vezes mais potente em relaxar a traqueia na ausência do epitélio. Resultados semelhantes também foram observados para o GIPAC, no entanto, nesse grupo não se observou diferenças estatísticas ao comparar as eficácias e as potências relaxantes, tanto na presença ($E_{\max} = 102,7 \pm 17,5\%$; $pCE_{50} = 4,16 \pm 0,11$; $R^2 = 0,847 \pm 0,038$) como na ausência

($E_{\max} = 115,9 \pm 11,4\%$; $pCE_{50} = 3,99 \pm 0,06$; $R^2 = 0,900 \pm 0,066$) de epitélio funcional (Figura 17, Gráfico 4 e Tabela 3). Ao comparar os parâmetros de eficácia e de potência entre os dois grupos, observou-se que o LASSBio-1631 foi 4,4 vezes mais potente em relaxar a traqueia na ausência de epitélio no GC do que no GIPAC (Tabela 3).

Essa atividade relaxante, dependente de concentração, em traqueia de cobaia também foi observada para o LASSBio-1628 (10^{-9} – 10^{-4} M, $n = 5$), tanto na presença ($E_{\max} = 104,9 \pm 1,3$ e $117,0 \pm 7,4\%$; $pCE_{50} = 5,60 \pm 0,16$ e $5,22 \pm 0,21$; $R^2 = 0,949 \pm 0,014$ e $0,934 \pm 0,020$) como na ausência ($E_{\max} = 135,6 \pm 7,4$ e $108,3 \pm 5,7\%$; $pCE_{50} = 5,85 \pm 0,18$ e $6,02 \pm 0,21$; $R^2 = 0,954 \pm 0,010$ e $0,956 \pm 0,008$) de epitélio funcional do GC e do GIPAC, respectivamente (Figura 18, Gráfico 5 e Tabela 4). Além disso, observou-se que o LASSBio-1628 foi mais eficaz e 6,3 vezes mais potente em relaxar a traqueia no GC e no GIPAC, respectivamente, na ausência do que na presença de epitélio. Essa diferença não foi observada quando se comparou os valores de pCE_{50} do GC com os do GIPAC nas mesmas condições de epitélio, apesar de no GC, esse LASSBio ter sido mais eficaz do que no GIPAC na ausência de epitélio funcional (Tabela 4).

Ao avaliar os resultados para o LASSBio-1612 (10^{-9} – 3×10^{-4} M, $n = 5$), observou-se que esse derivado também relaxou, de maneira dependente de concentração, a traqueia isolada de cobaia do GC e do GIPAC pré-contraída com CCh, tanto na presença ($E_{\max} = 110,9 \pm 7,1$ e $123,8 \pm 8,3\%$; $pCE_{50} = 5,28 \pm 0,07$ e $4,79 \pm 0,19$; $R^2 = 0,882 \pm 0,014$ e $0,834 \pm 0,048$, respectivamente) como na ausência ($E_{\max} = 94,3 \pm 4,6$ e $108,3 \pm 3,2\%$; $pCE_{50} = 4,44 \pm 0,18$ e $4,96 \pm 0,08$; $R^2 = 0,896 \pm 0,052$ e $0,934 \pm 0,008$, respectivamente) de epitélio funcional, sendo 6,9 vezes mais potente na presença do que na ausência de epitélio no GC (Figura 19, Gráfico 6 e Tabela 5). Quando comparado ambos os grupos experimentais, observou-se que o LASSBio-1612 foi mais potente 3,1 vezes em relaxar a traqueia no GC do que no GIPAC na presença de epitélio, assim como foi mais eficaz e 3,3 vezes mais potente na ausência de epitélio no GIPAC do que no GC (Tabela 5).

Para o LASSBio-1623 (10^{-12} – 10^{-4} M, $n = 5$), também se observou uma eficácia e uma potência relaxantes dependentes de concentração, tanto em traqueia com ($E_{\max} = 103,4 \pm 4,8$ e $128,3 \pm 4,8\%$; $pCE_{50} = 5,76 \pm 0,25$ e $5,15 \pm 0,16$; $R^2 = 0,872 \pm 0,022$ e $0,915 \pm 0,011$) como sem ($E_{\max} = 113,7 \pm 3,6$ e $112,9 \pm 6,6\%$;

$pCE_{50} = 6,10 \pm 0,25$ e $6,78 \pm 0,07$; $R^2 = 0,907 \pm 0,014$ e $0,909 \pm 0,018$) epitélio funcional no GC e no GIPAC, respectivamente (Figura 20, Gráfico 7 e Tabela 6). Ao comparar os grupos experimentais entre si, observou-se uma maior potência relaxante, em 42,6 vezes, do LASSBio-1623 na ausência do que na presença de epitélio no GIPAC. Além disso, observou-se que esse derivado foi mais eficaz em relaxar a traqueia no GIPAC do que no GC na presença de epitélio e 4,8 vezes mais potente na ausência de epitélio também no GIPAC do que no GC (Tabela 6).

Quando se comparou o efeito relaxante de todos os derivados *N*-metilssulfonamídicos com o protótipo, observou-se que no GC, o LASSBio-1628 foi mais eficaz na ausência de epitélio funcional do que o LASSBio-448. Assim como, observou-se que os LASSBios-1628 e -1623 foram mais potentes em relaxar a traqueia de cobaia do que o LASSBio-448 em 11,7 e 17,0 vezes, respectivamente, na presença de epitélio. Além disso, observou-se que os LASSBios-1610, -1628 e -1623 foram 9,3; 30,9 e 55,0 vezes, respectivamente, mais potentes do que o protótipo na ausência de epitélio funcional (Gráfico 14 e APÊNDICE A).

No GIPAC, comparando-se as eficácias e as potências relaxantes do protótipo, o LASSBio-448, com a dos seus derivados *N*-metilssulfonamídicos, observou-se que não houve diferenças nos valores de E_{max} dos compostos testados tanto na presença como na ausência de epitélio funcional (APÊNDICE B).

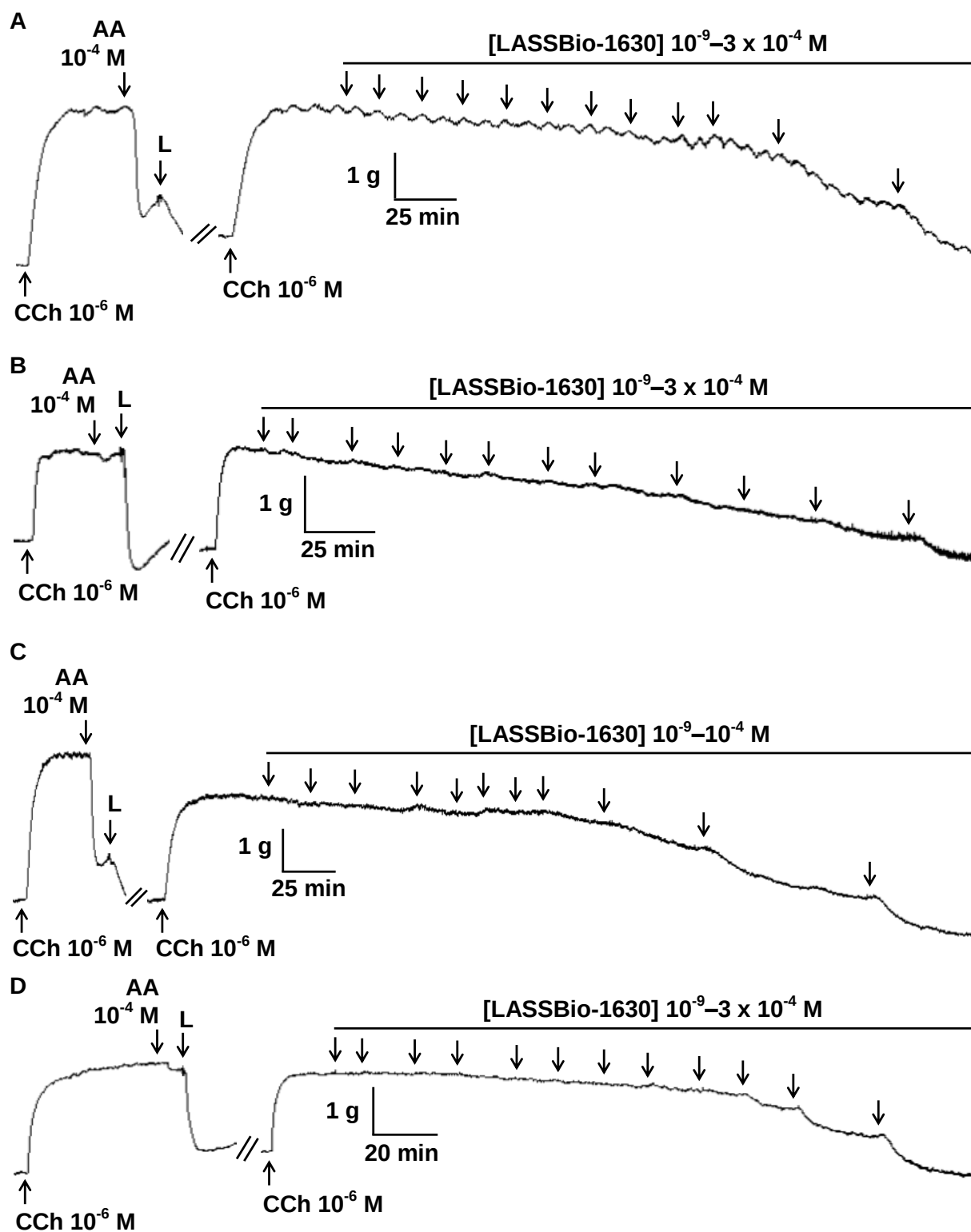
Já quando se analisou os valores de pCE_{50} do GIPAC, observou-se que a potência do LASSBio-1631 foi reduzida em 6,6 e 8,9 vezes em traqueia com e sem epitélio funcional, respectivamente, quando comparada a potência relaxante do protótipo, o LASSBio-448. Em contrapartida, em traqueia sem epitélio, as potências relaxantes dos LASSBios-1628 e -1623 foram aumentadas em 12,0 e 69,2 vezes, respectivamente (Gráfico 15 e APÊNDICE B).

Os tempos de relaxamentos dos LASSBios-1610, -1630, -1631, -1628, -1612 e -1623 foram de $268,6 \pm 19,6$; $300,6 \pm 40,2$; $346,6 \pm 50,8$; $253,4 \pm 13,8$; $216,4 \pm 32,6$ e $356,2 \pm 29,1$ minutos, respectivamente, na presença e de $206,2 \pm 22,1$; $248,8 \pm 23,5$; $248,4 \pm 15,2$; $230,0 \pm 19,7$; $147,0 \pm 11,9$ e $248,0 \pm 19,2$ minutos, respectivamente, na ausência de epitélio funcional no GC. Já no GIPAC foram de $258,2 \pm 16,3$; $329,8 \pm 19,7$; $290,0 \pm 17,1$; $268,0 \pm 16,9$; $282,2 \pm 22,2$ e $338,8 \pm 21,3$ minutos, respectivamente, na presença e de $175,6 \pm 12,0$; $190,4 \pm 25,4$; $207,0 \pm 34,2$; $182,4 \pm 19,4$; $235,2 \pm 20,0$ e

304,8 ± 22,7 minutos, respectivamente, na ausência de epitélio funcional (dados não mostrados).

Após 1 h da remoção dos compostos das preparações, a responsividade da traqueia ao CCh no GC para os LASSBios-1610, -1630, -1631, -1628, -1612 e -1623 foi revertida em, aproximadamente, 32, 63, 84, 20, 29 e 29%, respectivamente (na presença) e 11, 71, 48, 4, 80 e 31%, respectivamente (na ausência de epitélio funcional). Já no GIPAC, essa porcentagem foi de, aproximadamente, 50, 65, 71, 37, 13 e 35%, respectivamente (na presença), e de 70, 92, 84, 30, 30 e 31%, respectivamente (na ausência de epitélio) (dados não mostrados).

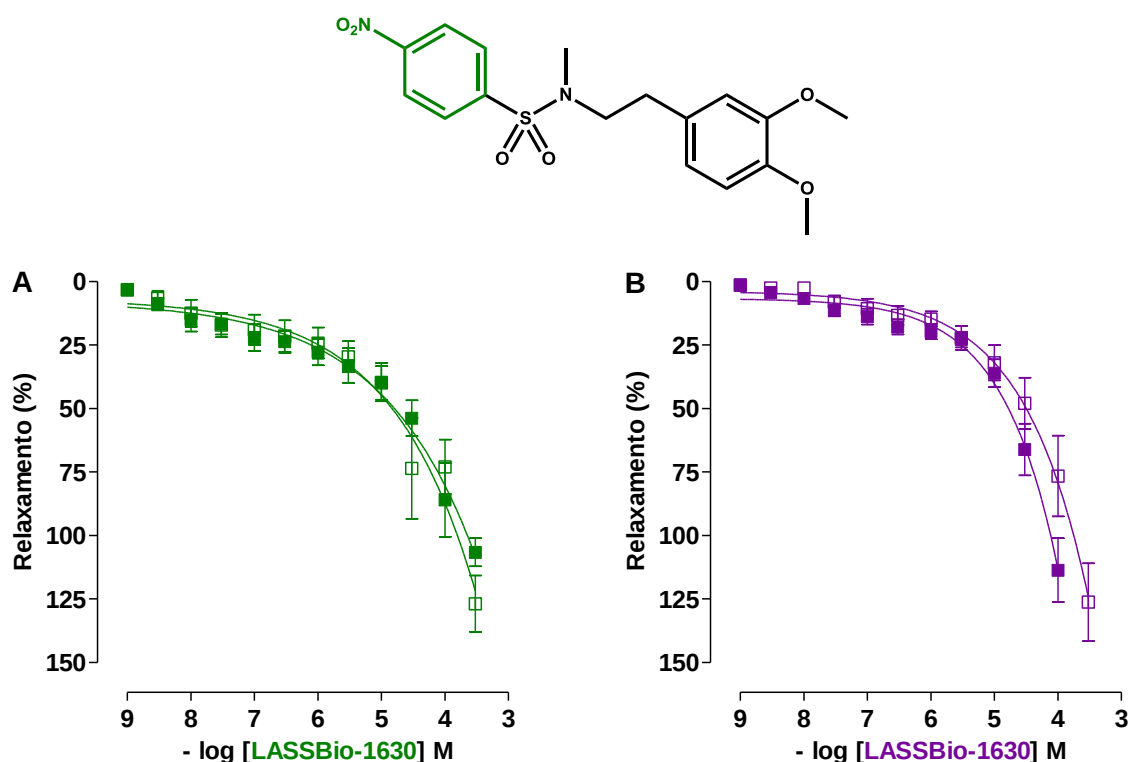
Figura 15 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1630 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1630 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 2 – Efeito relaxante do LASSBio-1630 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contraída 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: Silva, 2019.

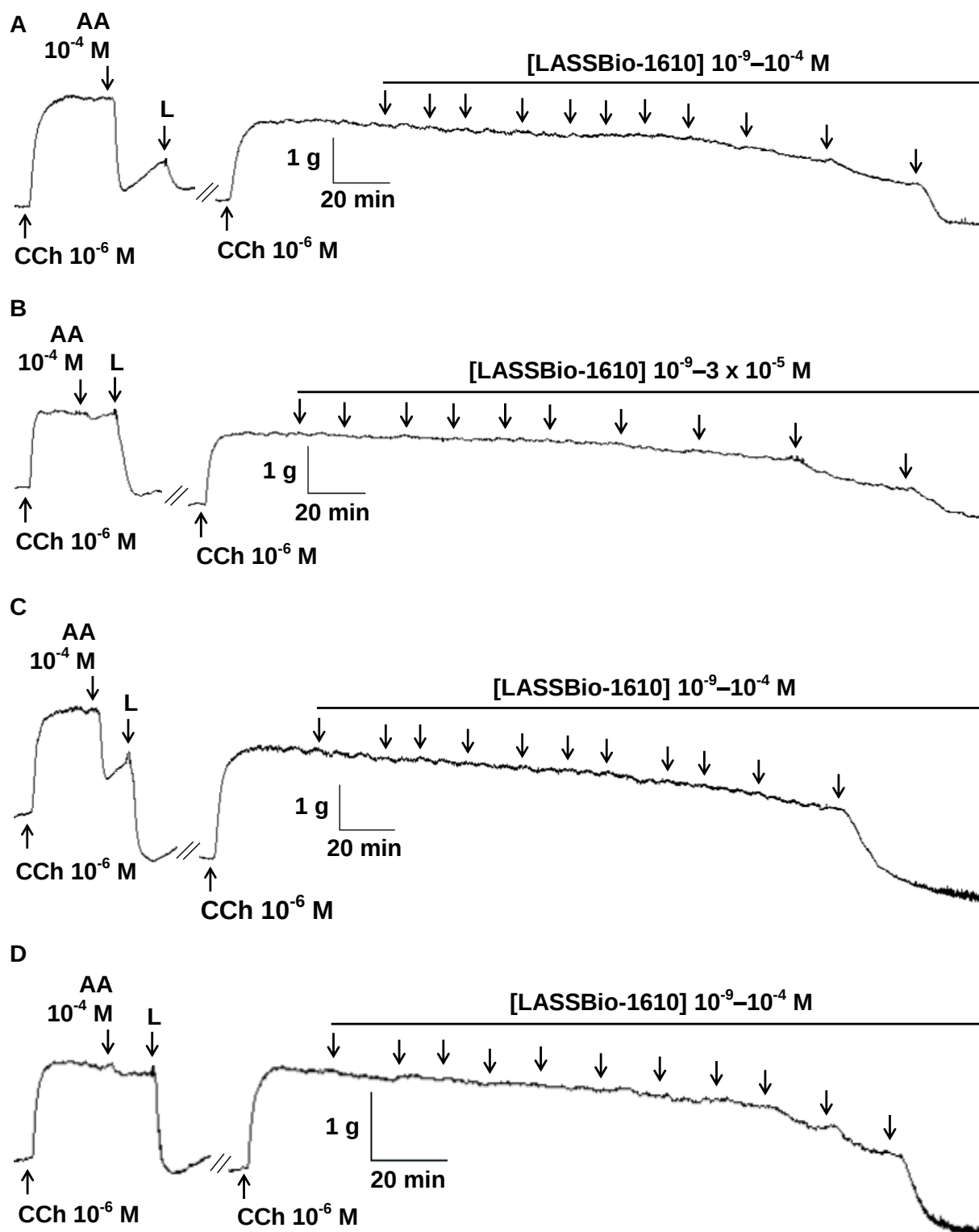
Tabela 1 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1630 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1630	GC		GIPAC	
	E+	E-	E+	E-
$E_{\max}$ (%)	$111,7 \pm 6,2$	$130,5 \pm 9,3$	$113,7 \pm 12,6$	$127,0 \pm 11,9$
pCE_{50}	$4,82 \pm 0,24$	$4,60 \pm 0,14$	$4,79 \pm 0,06^{\#}$	$4,37 \pm 0,14$
R^2	$0,869 \pm 0,030$	$0,897 \pm 0,020$	$0,899 \pm 0,029$	$0,915 \pm 0,021$

Teste *t* de Student, $^{\#}p < 0,05$ (GIPAC E+ vs. GIPAC E-), n = 5. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E- = ausência de epitélio funcional.

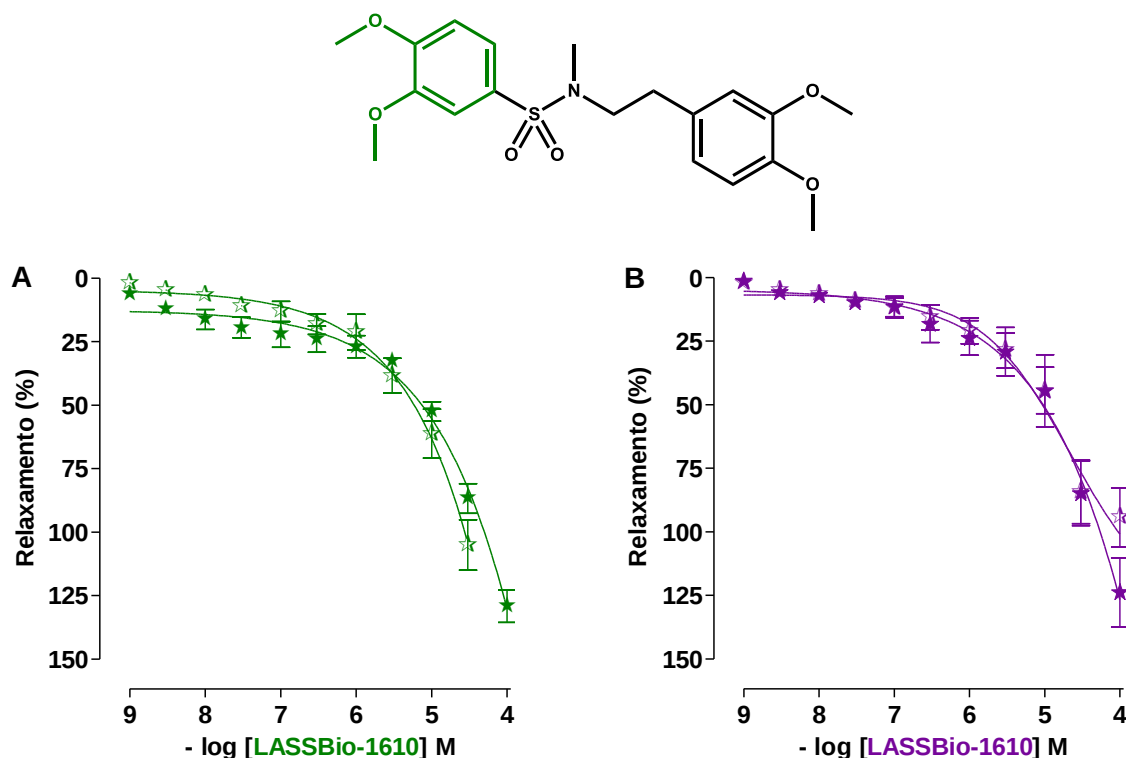
Fonte: Silva, 2019.

Figura 16 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1610 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1610 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Gráfico 3 – Efeito relaxante do LASSBio-1610 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contraída 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: Silva, 2019.

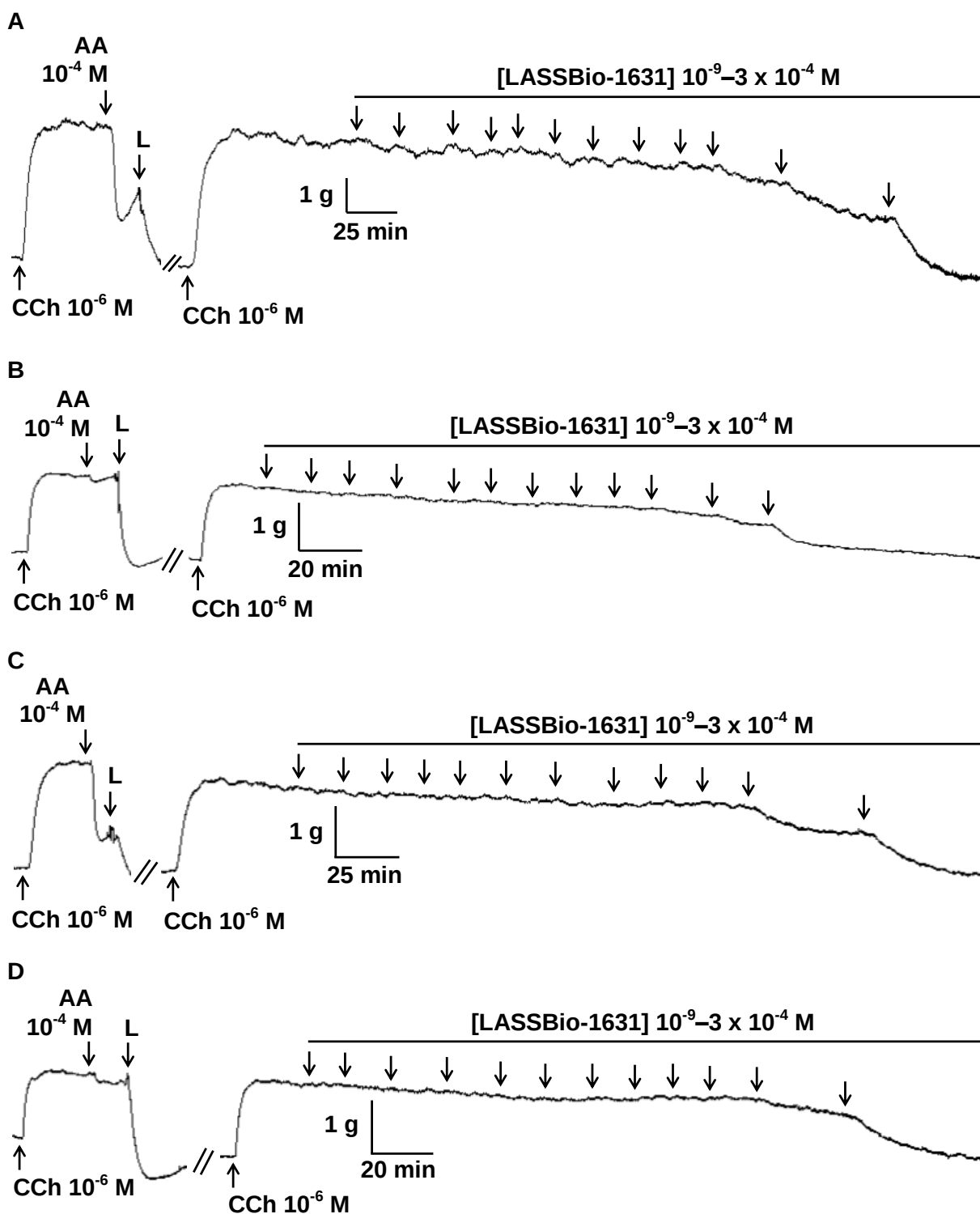
Tabela 2 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1610 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e GIPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1610	GC		GIPAC	
	E+	E–	E+	E–
$E_{\max}$ (%)	$124,3 \pm 7,0$	$105,1 \pm 10,0$	$108,7 \pm 11,8$	$98,3 \pm 4,1$
pCE_{50}	$4,97 \pm 0,07$	$5,33 \pm 0,10^*$	$5,08 \pm 0,21$	$5,12 \pm 0,18$
R^2	$0,893 \pm 0,035$	$0,937 \pm 0,013$	$0,926 \pm 0,028$	$0,934 \pm 0,019$

Teste *t* de Student, $*p < 0,05$ (GC E– vs. GC E+), n = 5. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E– = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Silva, 2019.

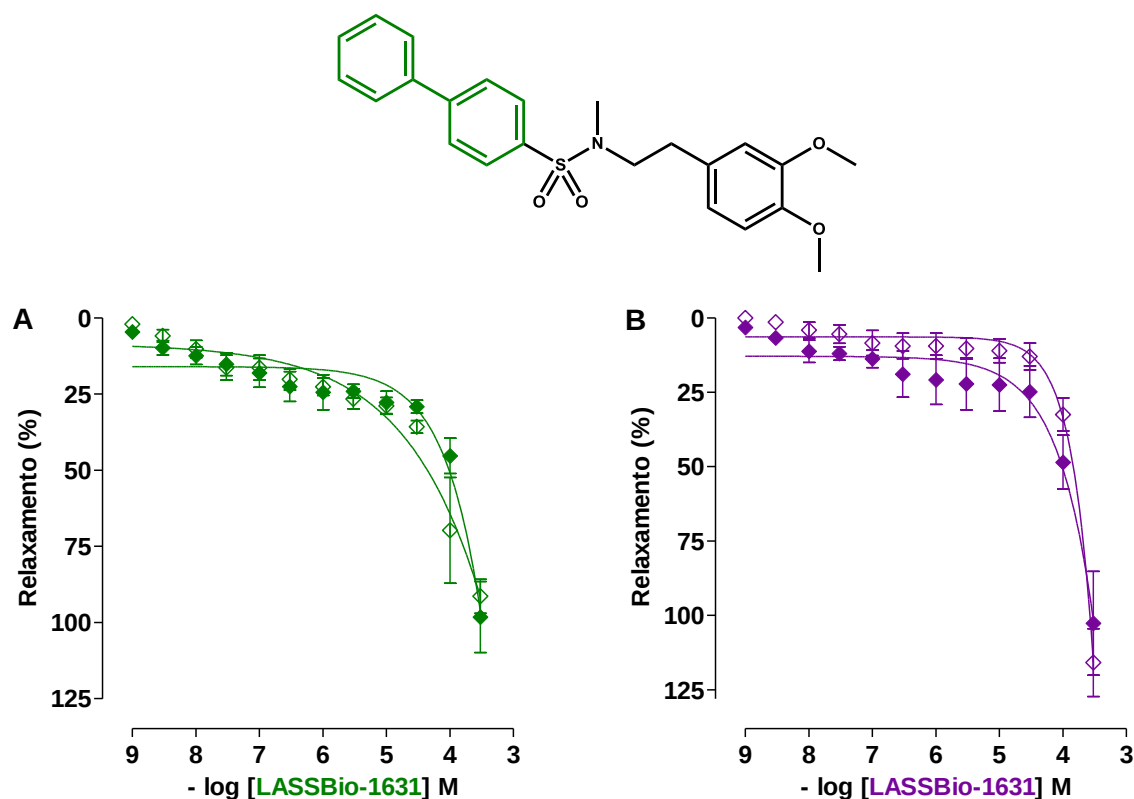
Figura 17 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1631 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1631 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 4 – Efeito relaxante do LASSBio-1631 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contráida 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: Silva, 2019.

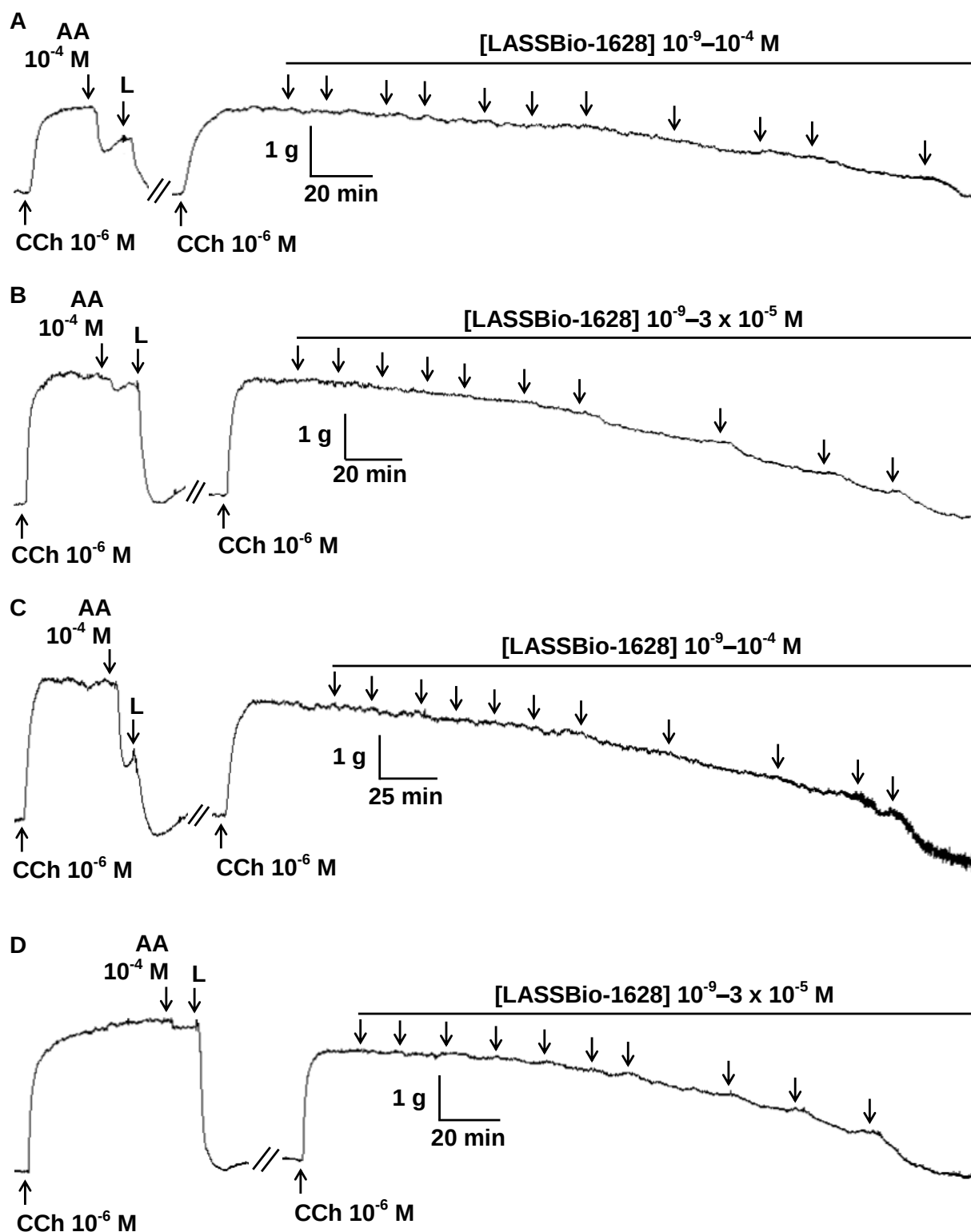
Tabela 3 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1631 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1631	GC		GIPAC	
	E+	E–	E+	E–
$E_{\max}$ (%)	98,2 ± 11,7	100,7 ± 10,2	102,7 ± 17,5	115,9 ± 11,4
pCE_{50}	4,30 ± 0,10	4,63 ± 0,09* ^{\$}	4,16 ± 0,11	3,99 ± 0,06
R^2	0,756 ± 0,052	0,842 ± 0,030	0,847 ± 0,038	0,900 ± 0,066

Teste *t* de Student, * $p < 0,05$ (GC E– vs. GC E+) e $^{\$}p < 0,05$ (GC E– vs. GIPAC E–), n = 5. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E– = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Silva, 2019.

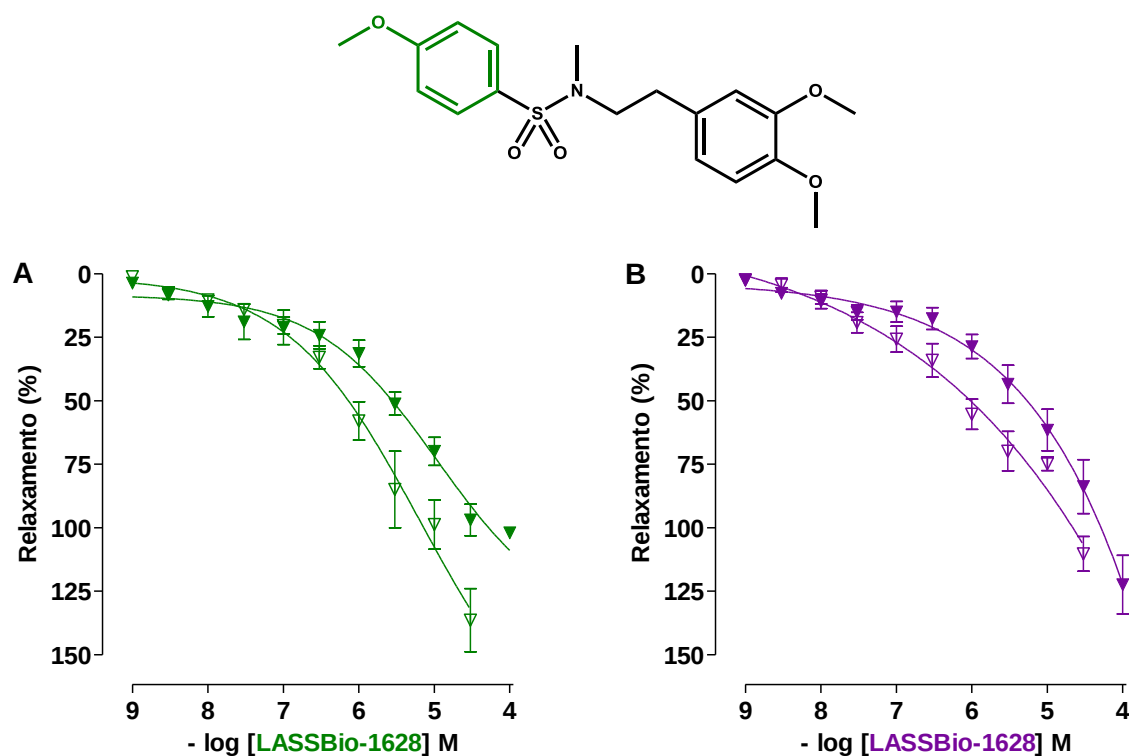
Figura 18 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1628 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1628 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 5 – Efeito relaxante do LASSBio-1628 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contráida 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: Silva, 2019.

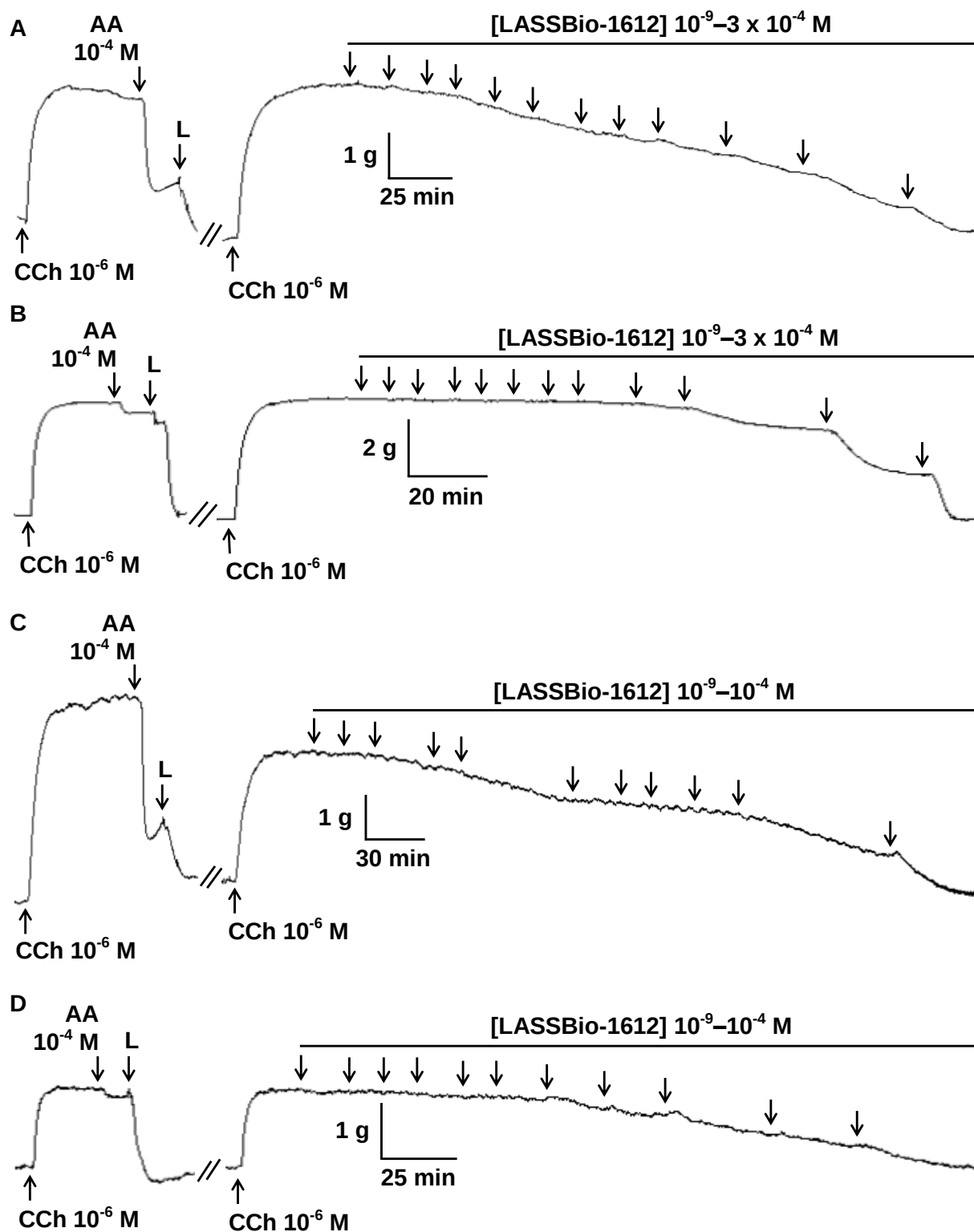
Tabela 4 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1628 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1628	GC		GIPAC	
	E+	E-	E+	E-
$E_{\max}$ (%)	$104,9 \pm 1,3$	$135,6 \pm 7,4^{*\$}$	$117,0 \pm 7,4$	$108,3 \pm 5,7$
pCE_{50}	$5,60 \pm 0,16$	$5,85 \pm 0,18$	$5,22 \pm 0,21$	$6,02 \pm 0,21^{\#}$
R^2	$0,949 \pm 0,014$	$0,954 \pm 0,010$	$0,934 \pm 0,020$	$0,956 \pm 0,008$

Teste *t* de Student, $*p < 0,05$ (GC E- vs. GC E+); $^{\#}p < 0,05$ (GIPAC E- vs. GIPAC E+); $^{\$}p < 0,05$ (GC E- vs. GIPAC E-), n = 5. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E- = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Silva, 2019.

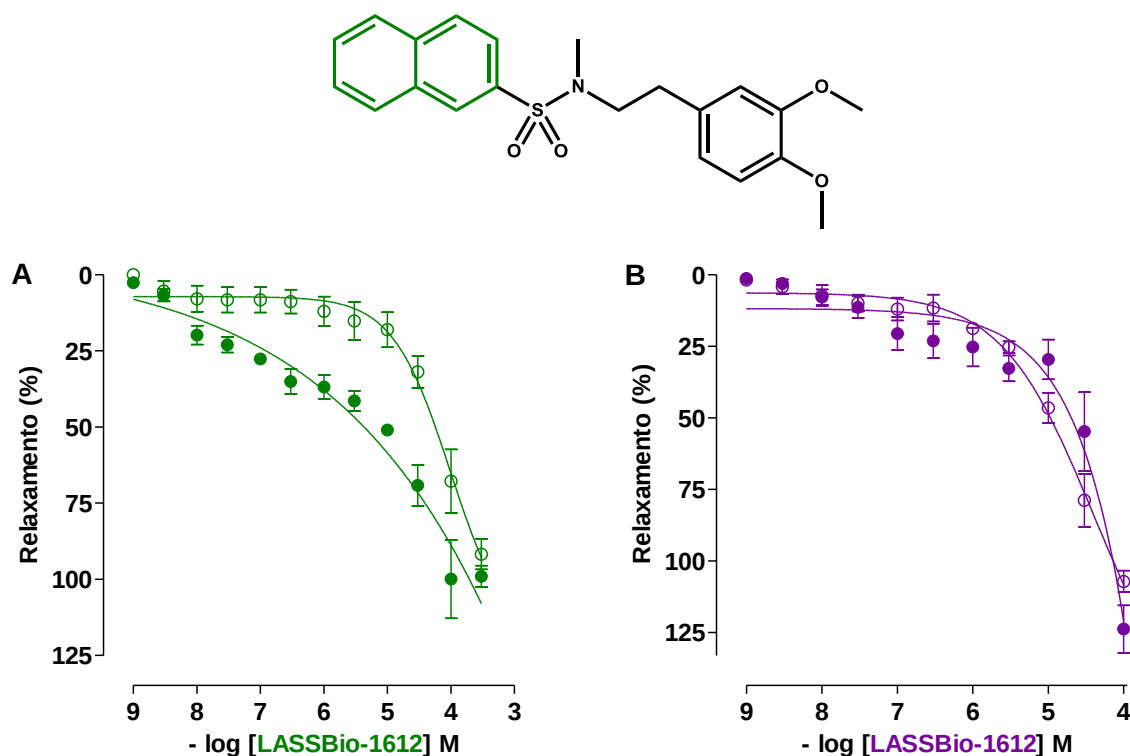
Figura 19 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1612 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1612 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 6 – Efeito relaxante do LASSBio-1612 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contraída 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: Silva, 2019.

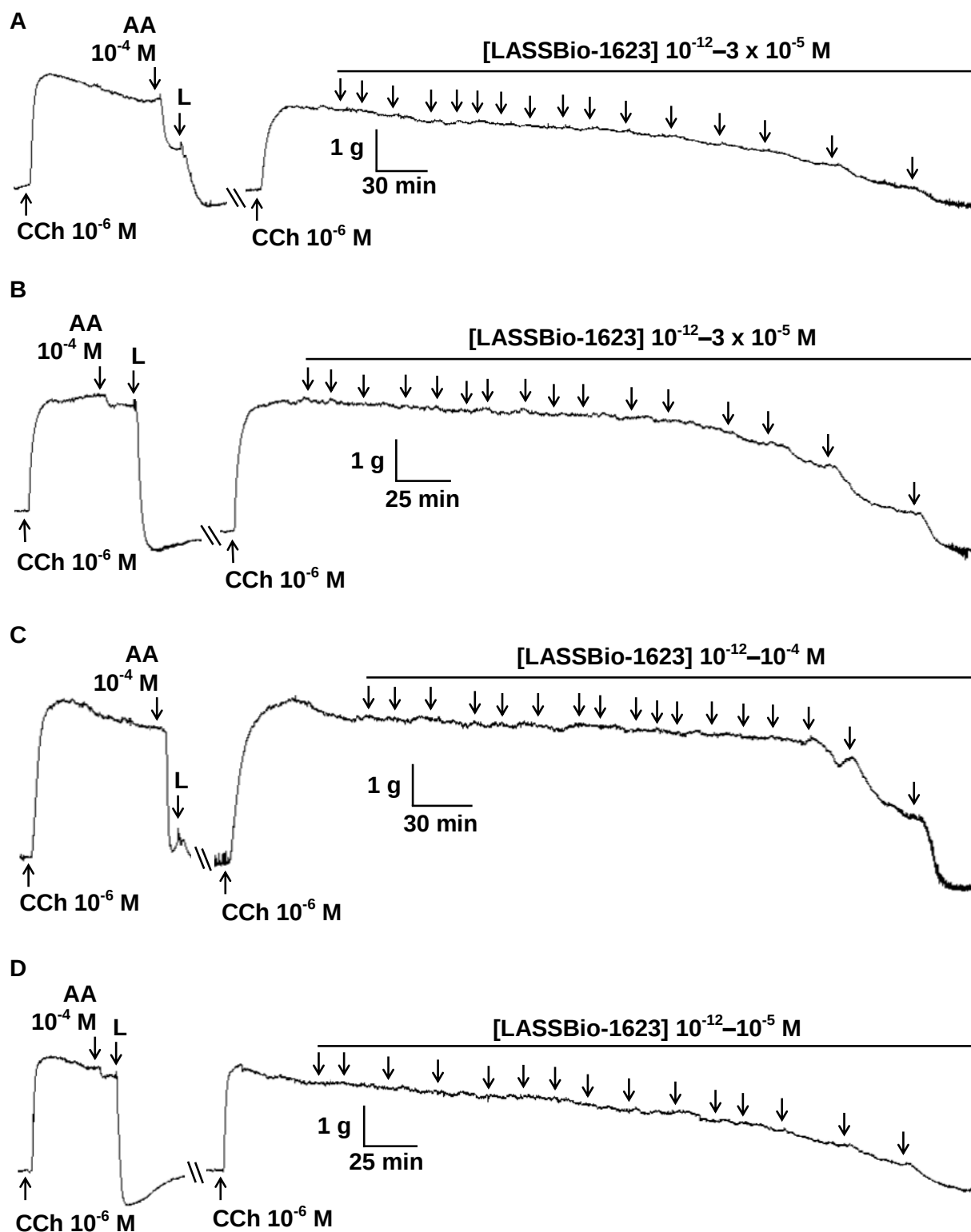
Tabela 5 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1612 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1612	GC		GIPAC	
	E+	E-	E+	E-
$E_{\max}$ (%)	$110,9 \pm 7,1$	$94,3 \pm 4,6$	$123,8 \pm 8,3$	$108,3 \pm 3,2^{\$}$
pCE_{50}	$5,28 \pm 0,07^{*\&}$	$4,44 \pm 0,18$	$4,79 \pm 0,19$	$4,96 \pm 0,08^{\$}$
R^2	$0,882 \pm 0,014$	$0,896 \pm 0,052$	$0,834 \pm 0,048$	$0,934 \pm 0,008$

Teste *t* de Student, $*p < 0,05$ (GC E+ vs. GC E-); $\&p < 0,05$ (GC E+ vs. GIPAC E+) e $^{\$}p < 0,05$ (GIPAC E- vs. GC E-), n = 5. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E- = ausência de epitélio funcional.

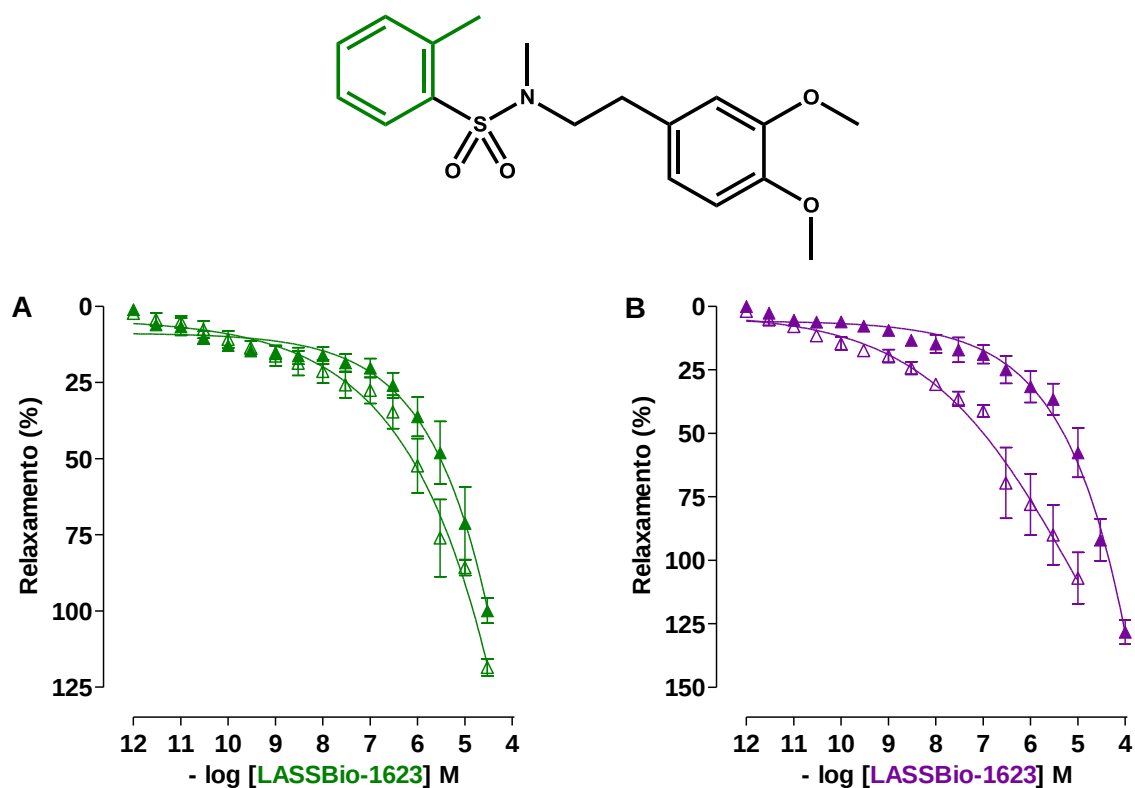
Fonte: Silva, 2019.

Figura 20 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1623 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1623 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Gráfico 7 – Efeito relaxante do LASSBio-1623 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contráida 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: Silva, 2019.

Tabela 6 – Valores de E_{max} , de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1623 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1623	GC		GIPAC	
	E+	E-	E+	E-
E_{max} (%)	$103,4 \pm 4,8$	$113,7 \pm 3,6$	$128,3 \pm 4,8^{\&}$	$112,9 \pm 6,6$
pCE_{50}	$5,76 \pm 0,25$	$6,10 \pm 0,25$	$5,15 \pm 0,16$	$6,78 \pm 0,07^{\#\$}$
R^2	$0,872 \pm 0,022$	$0,907 \pm 0,014$	$0,915 \pm 0,011$	$0,909 \pm 0,018$

Teste *t* de Student, $^{\#}p < 0,05$ (GIPAC E- vs. GIPAC E+); $^{\&}p < 0,05$ (GIPAC E+ vs. GC E+) e $^{\$}p < 0,05$ (GIPAC E- vs. GC E-), n = 5. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E- = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Silva, 2019.

5.1.3 Avaliação do efeito relaxante dos derivados sulfonamídicos (LASSBio-1622, -1613, -1722, -1629, -1625 e -1611) sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia isolada de cobaia controle e com IPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional

O LASSBio-1622 (10^{-9} – 3×10^{-4} M, $n = 3$) relaxou a traqueia isolada de cobaia controle e com IPAC pré-contraída com CCh, tanto na presença ($E_{\max} = 147,2 \pm 16,1$ e $104,0 \pm 7,0\%$; $pCE_{50} = 3,90 \pm 0,005$ e $4,15 \pm 0,09$; $R^2 = 0,924 \pm 0,020$ e $0,844 \pm 0,080$, respectivamente) como na ausência ($E_{\max} = 130,6 \pm 7,8$ e $114,5 \pm 12,9\%$; $pCE_{50} = 4,04 \pm 0,14$ e $4,07 \pm 0,09$; $R^2 = 0,850 \pm 0,057$ e $0,824 \pm 0,038$, respectivamente) de epitélio funcional (Figura 21, Gráfico 8 e Tabela 7). Ao comparar os valores de $E_{\max}$ e de pCE_{50} , não se observou diferenças estatísticas entre as eficácias e as potências relaxantes quando comparadas entre si e entre o GC e o GIPAC (Tabela 7).

Com relação à atividade relaxante do LASSBio-1613 (10^{-12} – 10^{-4} M, $n = 5$), observou-se que esse derivado relaxou, de maneira dependente de concentração, a traqueia isolada tanto do GC como do GIPAC na presença ($E_{\max} = 102,2 \pm 8,2$ e $107,3 \pm 7,7\%$; $pCE_{50} = 6,49 \pm 0,20$ e $5,99 \pm 0,13$; $R^2 = 0,851 \pm 0,044$ e $0,865 \pm 0,037$, respectivamente) e na ausência ($E_{\max} = 99,2 \pm 6,9$ e $118,9 \pm 6,1\%$; $pCE_{50} = 6,32 \pm 0,18$ e $6,23 \pm 0,29$; $R^2 = 0,895 \pm 0,017$ e $0,907 \pm 0,023$, respectivamente) de epitélio funcional, não se observando diferenças ao comparar as eficácias e as potências relaxantes entre si, nem entre os grupos experimentais (Figura 22, Gráfico 9 e Tabela 8).

Ao avaliar os resultados para o LASSBio-1722 (10^{-9} – 3×10^{-4} M, $n = 5$) também se observou um relaxamento dependente de concentração em traqueia isolada do GC na presença ($E_{\max} = 125,7 \pm 6,7\%$; $pCE_{50} = 4,26 \pm 0,05$; $R^2 = 0,944 \pm 0,009$) e na ausência ($E_{\max} = 116,4 \pm 6,2\%$; $pCE_{50} = 4,45 \pm 0,04$; $R^2 = 0,949 \pm 0,019$) de epitélio funcional, sendo 1,5 vezes mais potente em relaxar a traqueia na ausência do epitélio. Esse efeito também foi observado no GIPAC tanto na presença ($E_{\max} = 125,3 \pm 9,7\%$; $pCE_{50} = 4,72 \pm 0,08$; $R^2 = 0,920 \pm 0,026$) como na ausência ($E_{\max} = 143,6 \pm 15,6\%$; $pCE_{50} = 4,69 \pm 0,07$; $R^2 = 0,902 \pm 0,012$) de epitélio funcional, no entanto, sem diferença estatística entre as eficácias e as potências relaxantes (Figura 23, Gráfico 10 e Tabela 9). Ao comparar os parâmetros de eficácia e de potência entre os dois grupos, observou-se que o LASSBio-1722 foi 2,9

e 1,7 vezes mais potente em relaxar a traqueia na presença e na ausência de epitélio, respectivamente, no GIPAC do que no GC (Tabela 9).

Resultados semelhantes foram observados para o LASSBio-1629 (10^{-9} - 3×10^{-4} M, $n = 5$), que relaxou, de maneira dependente de concentração, a traqueia isolada de cobaia controle e com IPAC, tanto na presença ($E_{\max} = 111,7 \pm 10,7$ e $99,2 \pm 10,0\%$; $pCE_{50} = 4,32 \pm 0,13$ e $4,25 \pm 0,16$; $R^2 = 0,960 \pm 0,006$ e $0,929 \pm 0,010$, respectivamente) como na ausência ($E_{\max} = 116,0 \pm 8,0$ e $121,2 \pm 4,2\%$; $pCE_{50} = 4,39 \pm 0,20$ e $5,29 \pm 0,16$; $R^2 = 0,921 \pm 0,023$ e $0,848 \pm 0,039$, respectivamente) de epitélio funcional, sendo no GIPAC 11,0 vezes mais potente na ausência do que na presença de epitélio e 7,9 vezes mais potente quando comparado ao GC também sem epitélio (Figura 24, Gráfico 11 e Tabela 10).

Em relação ao LASSBio-1625 (10^{-12} - 10^{-4} M, $n = 5$), observou-se que esse derivado também relaxou, de maneira dependente de concentração, a traqueia isolada de cobaia pré-contraída com CCh, tanto na presença ($E_{\max} = 120,0 \pm 9,1$ e $107,4 \pm 5,2\%$; $pCE_{50} = 5,40 \pm 0,16$ e $6,63 \pm 0,24$; $R^2 = 0,899 \pm 0,029$ e $0,911 \pm 0,023$) como na ausência ($E_{\max} = 107,4 \pm 1,5$ e $116,3 \pm 7,0\%$; $pCE_{50} = 5,92 \pm 0,16$ e $5,32 \pm 0,13$; $R^2 = 0,928 \pm 0,016$ e $0,912 \pm 0,021$) de epitélio funcional no GC e no GIPAC, respectivamente (Figura 25, Gráfico 12 e Tabela 11). Quando comparado os valores de $E_{\max}$ e de pCE_{50} , observou-se que no GIPAC, o LASSBio-1625 foi 20,4 vezes mais potente em relaxar a traqueia na presença do que na ausência de epitélio. Já quando se comparou os dois grupos, também se observou que esse derivado no GIPAC foi 17,0 vezes mais potente do que no GC na presença de epitélio, assim como no GC foi 4,0 vezes mais potente do que no GIPAC na ausência de epitélio funcional (Tabela 11).

Para o LASSBio-1611 (10^{-12} - 3×10^{-5} M, $n = 5$), também se observou uma eficácia e uma potência relaxantes dependentes de concentração, tanto em traqueia com ($E_{\max} = 108,6 \pm 5,6$ e $112,6 \pm 11,4\%$; $pCE_{50} = 6,78 \pm 0,22$ e $6,61 \pm 0,17$; $R^2 = 0,939 \pm 0,011$ e $0,890 \pm 0,027$) como sem ($E_{\max} = 115,7 \pm 3,6$ e $118,3 \pm 8,2\%$; $pCE_{50} = 7,50 \pm 0,18$ e $7,70 \pm 0,13$; $R^2 = 0,932 \pm 0,009$ e $0,928 \pm 0,014$) epitélio funcional no GC e no GIPAC, respectivamente (Figura 26, Gráfico 13 e Tabela 12). Ao comparar os grupos experimentais entre si, observou-se um aumento da potência relaxante em 5,2 e 12,3 vezes do LASSBio-1611, no GC e no GIPAC, respectivamente, na ausência em relação a presença de epitélio (Tabela 12).

Quando se comparou o efeito relaxante de todos os derivados da subsérie sulfonamídica com o protótipo LASSBio-448, observou-se que o LASSBio-1622 foi mais eficaz em traqueia com epitélio funcional do GC, enquanto que no GIPAC, todos os LASSBios apresentaram a mesma eficácia do LASSBio-448 (Tabelas 13 e 14).

Ao avaliar-se os valores do pCE_{50} , observou-se que os LASSBios-1625, -1613 e -1611 tiveram suas potências relaxantes em traqueia de cobaia do GC aumentadas em relação ao protótipo em 7,4; 91,2 e 177,8 vezes, respectivamente, na presença de epitélio e em 36,3; 91,2 e 1.380,4 vezes, respectivamente, na ausência de epitélio funcional (Gráfico 14 e APÊNDICE A).

Para o GIPAC, observou-se que as potências relaxantes dos LASSBios-1625, -1613 e -1611 foram aumentadas em 44,7; 10,2 e 42,6 vezes, respectivamente, em traqueia com epitélio. Nesse grupo, em traqueia sem epitélio funcional, observou-se que as potências relaxantes dos LASSBios-1613 e -1611 foram aumentadas em 19,5 e 575,4 vezes, respectivamente, quando comparadas a potência do LASSBio-448 (Gráfico 15 e APÊNDICE B).

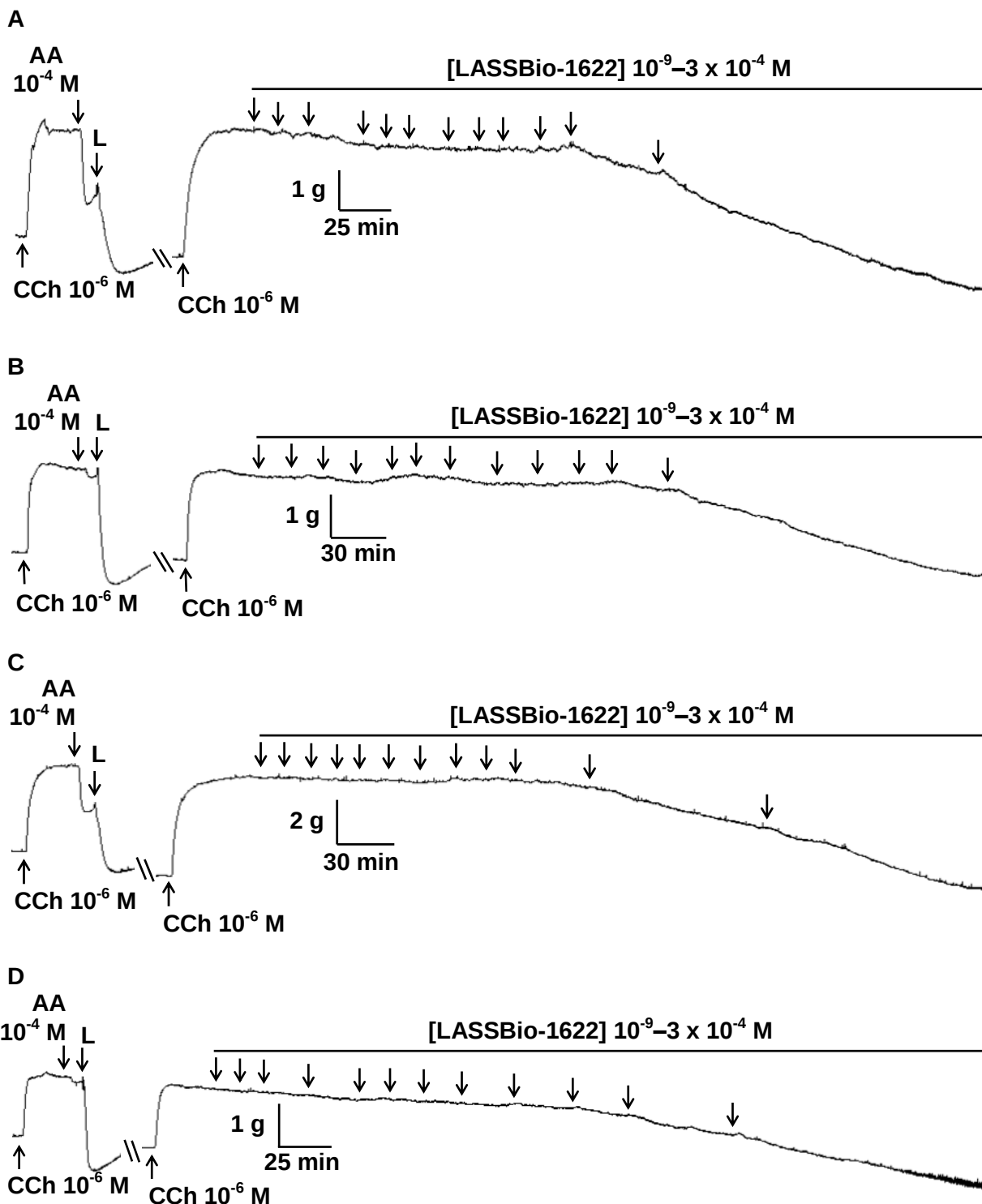
Além disso, ao se comparar as potências relaxantes dos derivados *N*-metilssulfonamídicos e sulfonamídicos, observou-se que o LASSBio-1611 foi mais potente em relaxar a traqueia isolada de cobaia no GC do que todos os outros LASSBios na ausência de epitélio funcional, bem como na presença de epitélio, nesse caso, exceto em relação ao LASSBio-1613, com quem não diferiu estatisticamente. Adicionalmente, no GIPAC, os LASSBios-1625 e -1611 se mostraram mais potentes em relaxar a traqueia do que todos os outros derivados, exceto em comparação ao LASSBio-1613, na presença de epitélio, enquanto que na ausência de epitélio funcional, o LASSBio-1611 foi o mais potente de todos os derivados (Gráficos 14 e 15; APÊNDICES A e B)

Os tempos de relaxamentos no GC para os LASSBios-1622, -1613, -1722, -1629, -1625 e -1611 foram de $426,3 \pm 48$; $343,4 \pm 20,0$; $183,8 \pm 16,2$; $280,2 \pm 28,9$; $443,2 \pm 39,5$ e $354,6 \pm 50,9$ minutos, respectivamente, na presença e de $332,7 \pm 28,9$; $306,6 \pm 23,5$; $159,4 \pm 3,9$; $235,0 \pm 25,6$; $281,2 \pm 13,1$ e $254,2 \pm 17,4$ minutos, respectivamente, na ausência epitélio funcional. Já no GIPAC foram de $271,0 \pm 49,7$; $328,6 \pm 15,0$; $261,2 \pm 24,7$; $304,0 \pm 36,9$; $392,6 \pm 49,2$ e $347,6 \pm 27,8$ minutos, respectivamente, na presença e de $337,3 \pm 15,1$; $269,4 \pm 22,5$;

181,4 $\pm$ 11,9; 225,8 $\pm$ 27,3; 307,8 $\pm$ 10,2 e 255,6 $\pm$ 19,0 minutos, respectivamente, na ausência de epitélio funcional (dados não mostrados).

Após 1 h da remoção dos compostos das preparações, a responsividade da traqueia ao CCh no GC para os LASSBios-1622, -1613, -1722, -1629, -1625 e -1611 foi revertida em aproximadamente 41, 49, 99, 56, 9 e 12%, respectivamente (na presença) e 46, 59, 65, 82, 82 e 26%, respectivamente (na ausência de epitélio funcional). Já no GIPAC, essa porcentagem foi de, aproximadamente, 73, 47, 62, 59, 29 e 1%, respectivamente (na presença), e de 27, 36, 69, 36, 56 e 95,1%, respectivamente (na ausência de epitélio) (dados não mostrados).

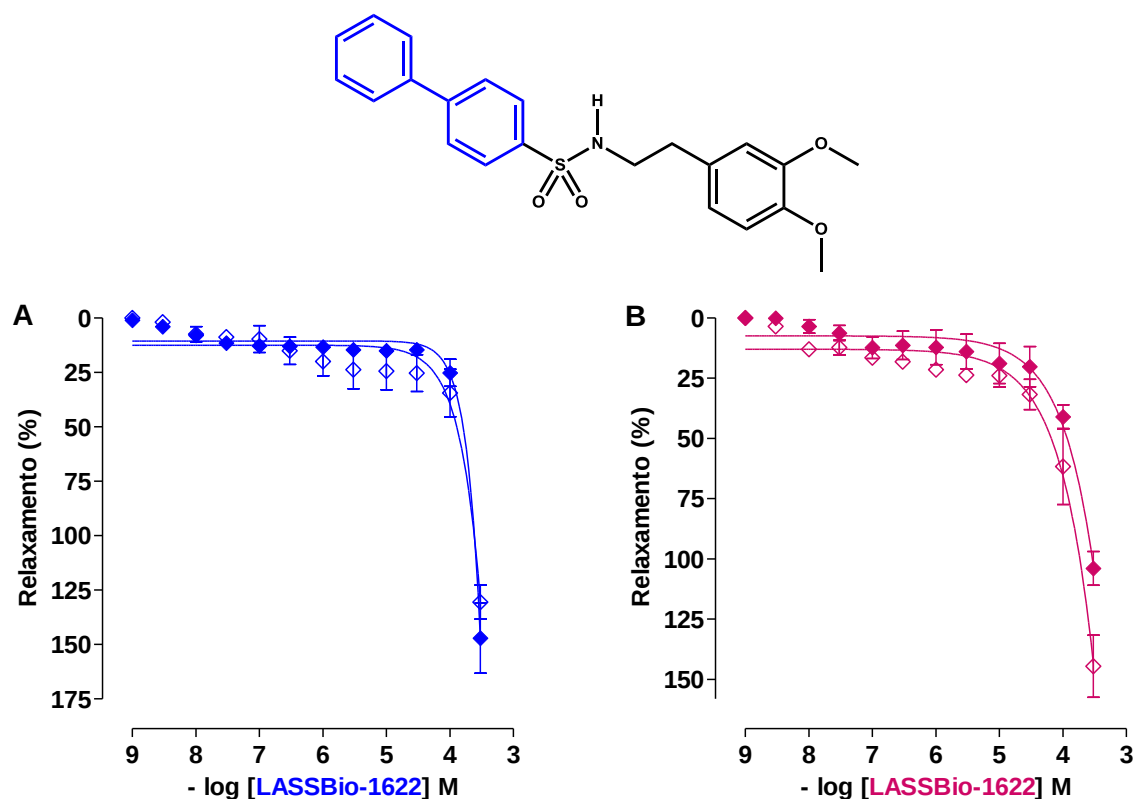
Figura 21 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1622 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1622 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 8 – Efeito relaxante do LASSBio-1622 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contráida 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 ($n = 3$).

Fonte: Silva, 2019.

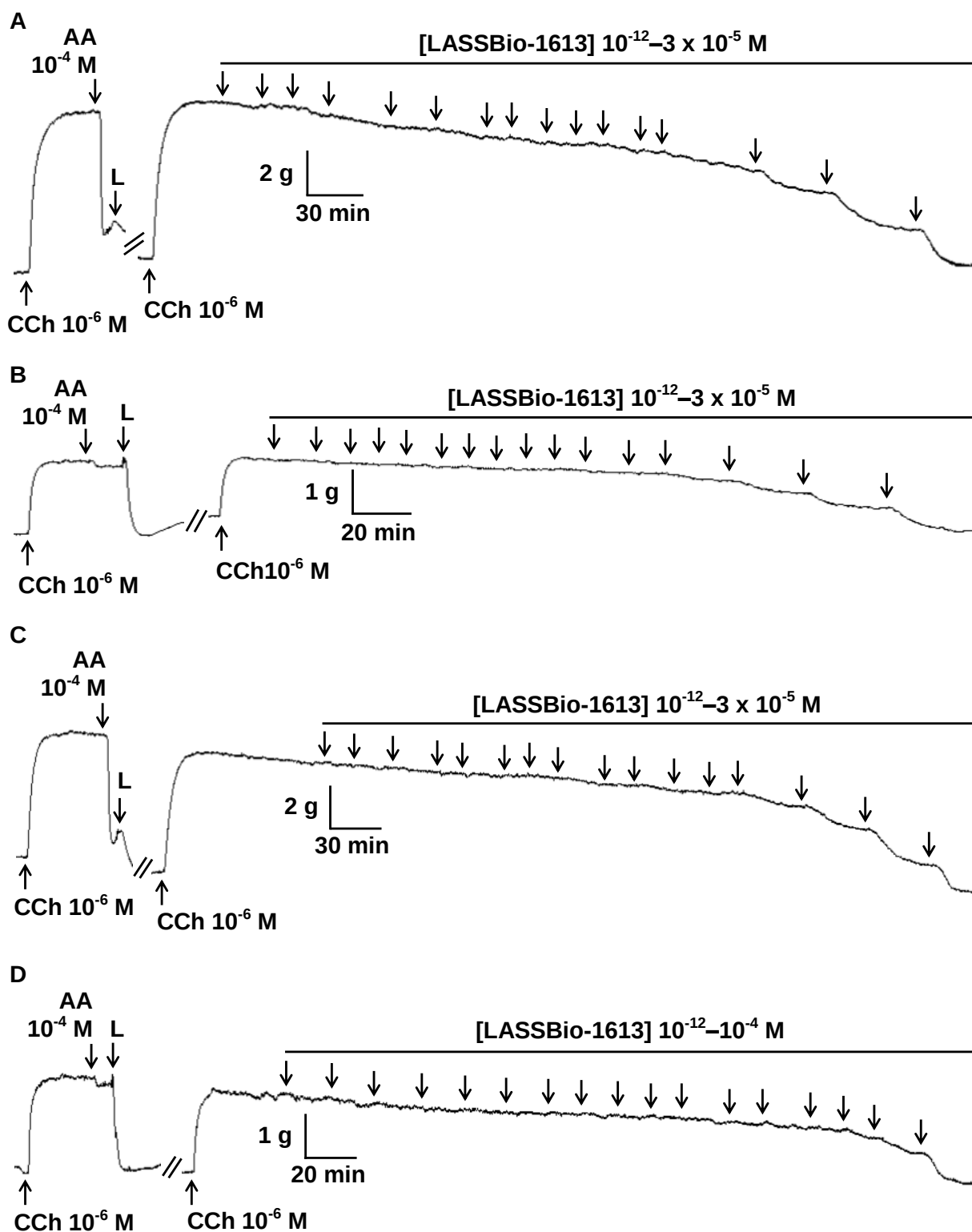
Tabela 7 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1622 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1622	GC		GIPAC	
	E+	E–	E+	E–
$E_{\max}$ (%)	$147,2 \pm 16,1$	$130,6 \pm 7,8$	$104,0 \pm 7,0$	$144,5 \pm 12,9$
pCE_{50}	$3,90 \pm 0,005$	$4,04 \pm 0,14$	$4,15 \pm 0,09$	$4,07 \pm 0,09$
R^2	$0,924 \pm 0,020$	$0,850 \pm 0,057$	$0,844 \pm 0,080$	$0,824 \pm 0,038$

Teste t de Student, $n = 3$. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E– = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Silva, 2019.

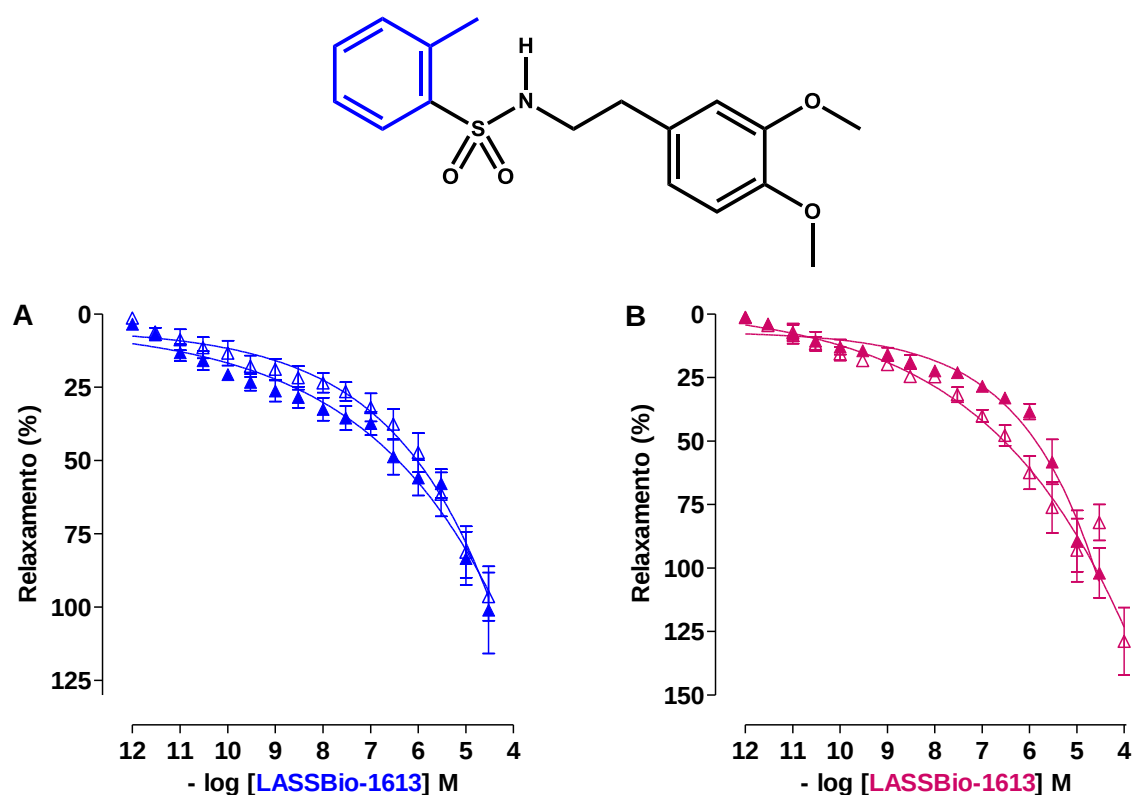
Figura 22 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1613 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1613 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 9 – Efeito relaxante do LASSBio-1613 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contráida 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: Silva, 2019.

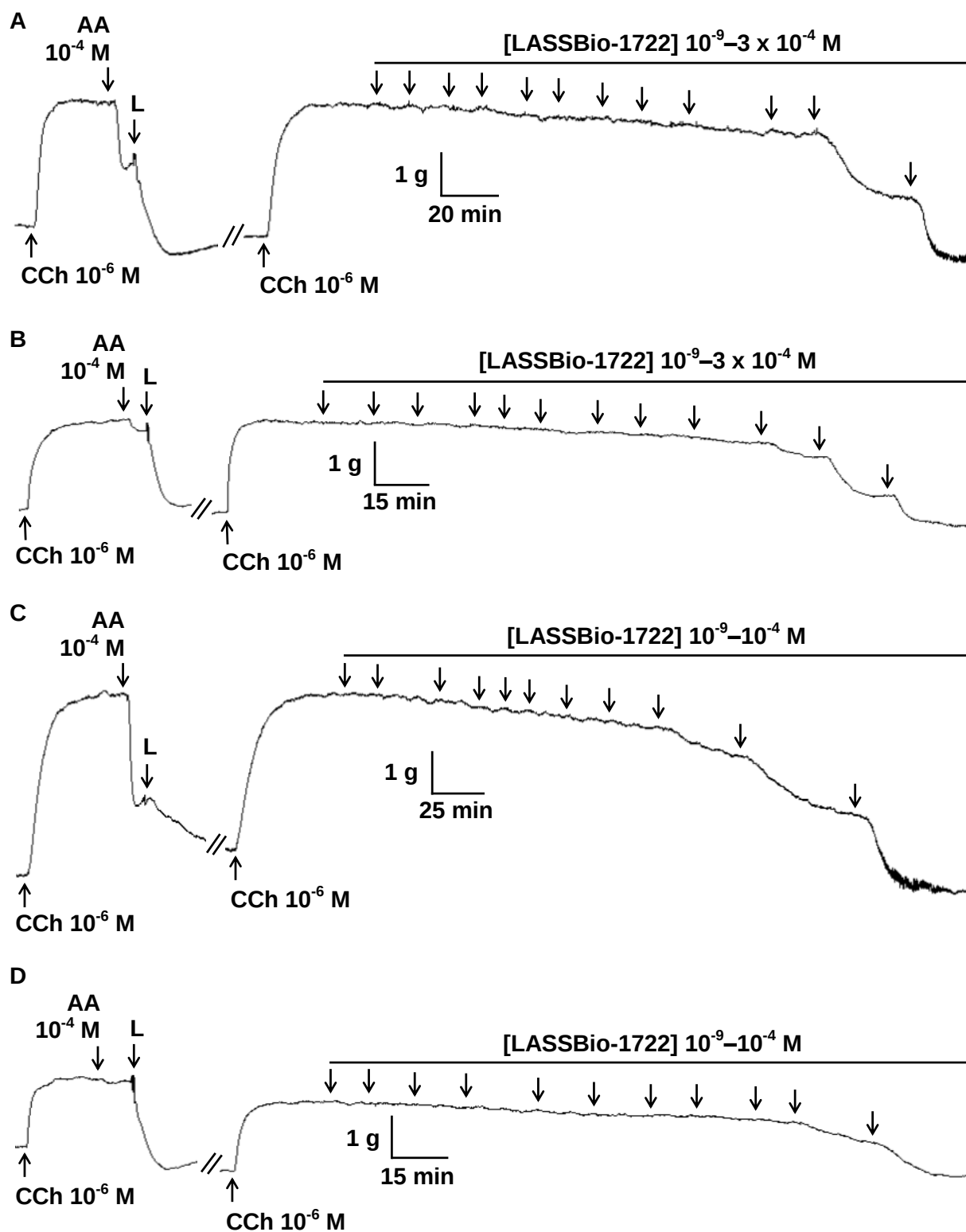
Tabela 8 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1613 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1613	GC		GIPAC	
	E+	E–	E+	E–
$E_{\max}$ (%)	$102,2 \pm 8,2$	$99,2 \pm 6,9$	$107,3 \pm 7,7$	$118,9 \pm 6,1$
pCE_{50}	$6,49 \pm 0,20$	$6,32 \pm 0,18$	$5,99 \pm 0,13$	$6,23 \pm 0,29$
R^2	$0,851 \pm 0,044$	$0,895 \pm 0,017$	$0,865 \pm 0,037$	$0,907 \pm 0,023$

Teste t de Student, $n = 5$. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E– = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Silva, 2019.

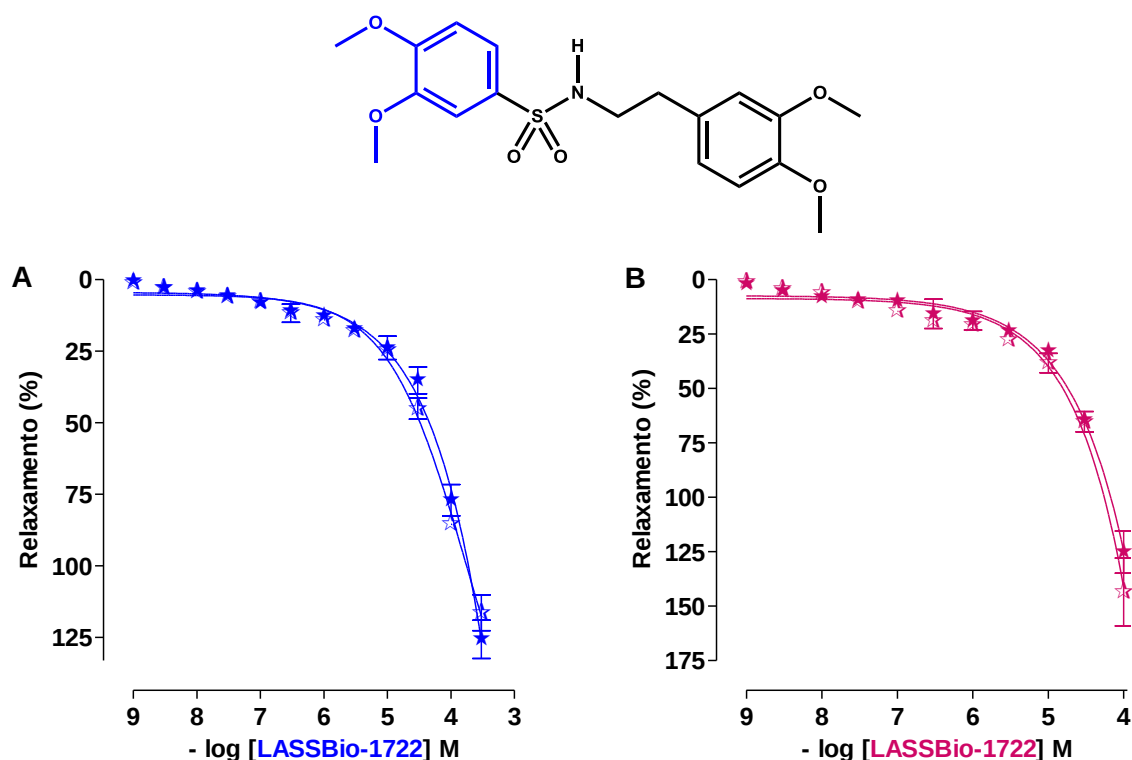
Figura 23 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1722 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1722 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 10 – Efeito relaxante do LASSBio-1722 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contraída 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: Silva, 2019.

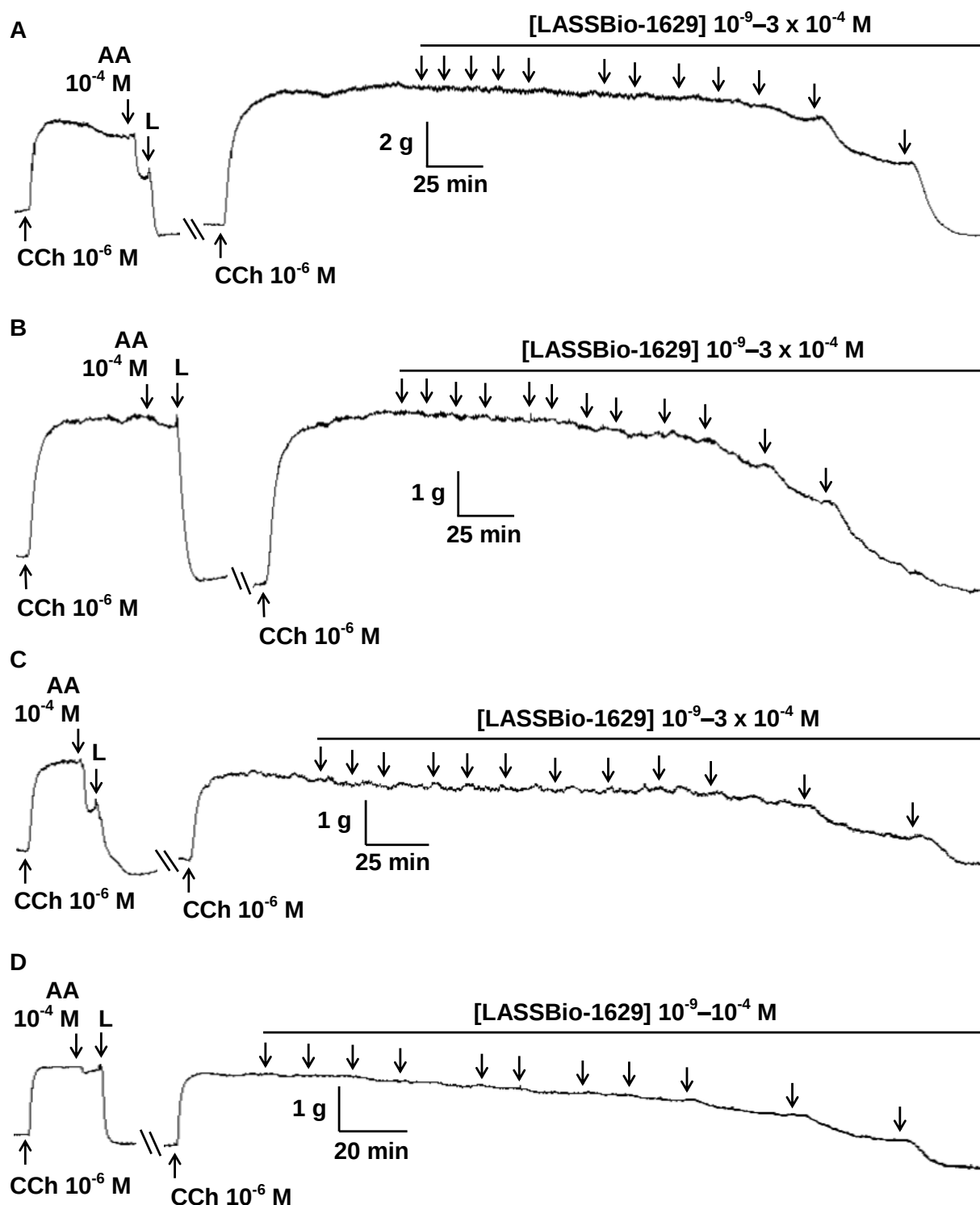
Tabela 9 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1722 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1722	GC		GIPAC	
	E+	E–	E+	E–
$E_{\max}$ (%)	125,7 ± 6,7	116,4 ± 6,2	125,3 ± 9,7	143,6 ± 15,6
pCE_{50}	4,26 ± 0,05	4,45 ± 0,04*	4,72 ± 0,08 ^{&}	4,69 ± 0,07 ^{\$}
R^2	0,944 ± 0,009	0,949 ± 0,019	0,920 ± 0,026	0,902 ± 0,012

Teste *t* de Student, **p* < 0,05 (GC E– vs. GC E+); &*p* < 0,05 (GIPAC E+ vs. GC E+) e ^{\$}*p* < 0,05 (GIPAC E– vs. GC E–), n = 5. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E– = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Silva, 2019.

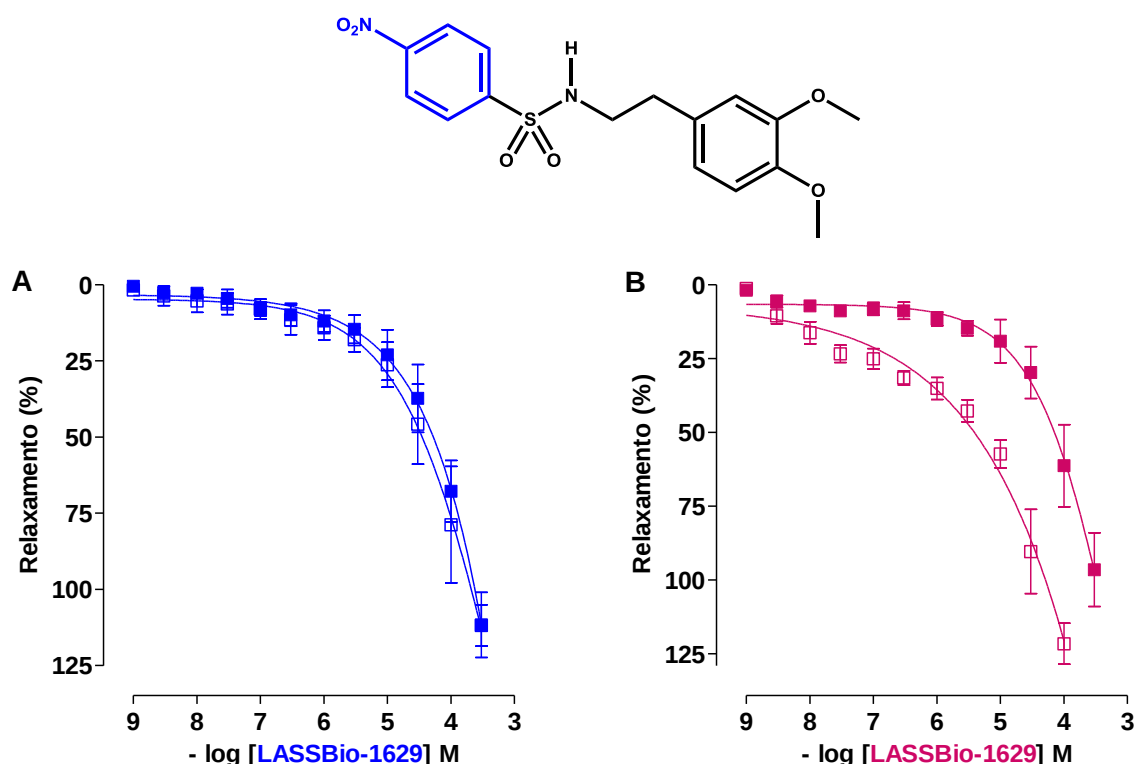
Figura 24 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1629 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1629 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 11 – Efeito relaxante do LASSBio-1629 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contraída 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: Silva, 2019.

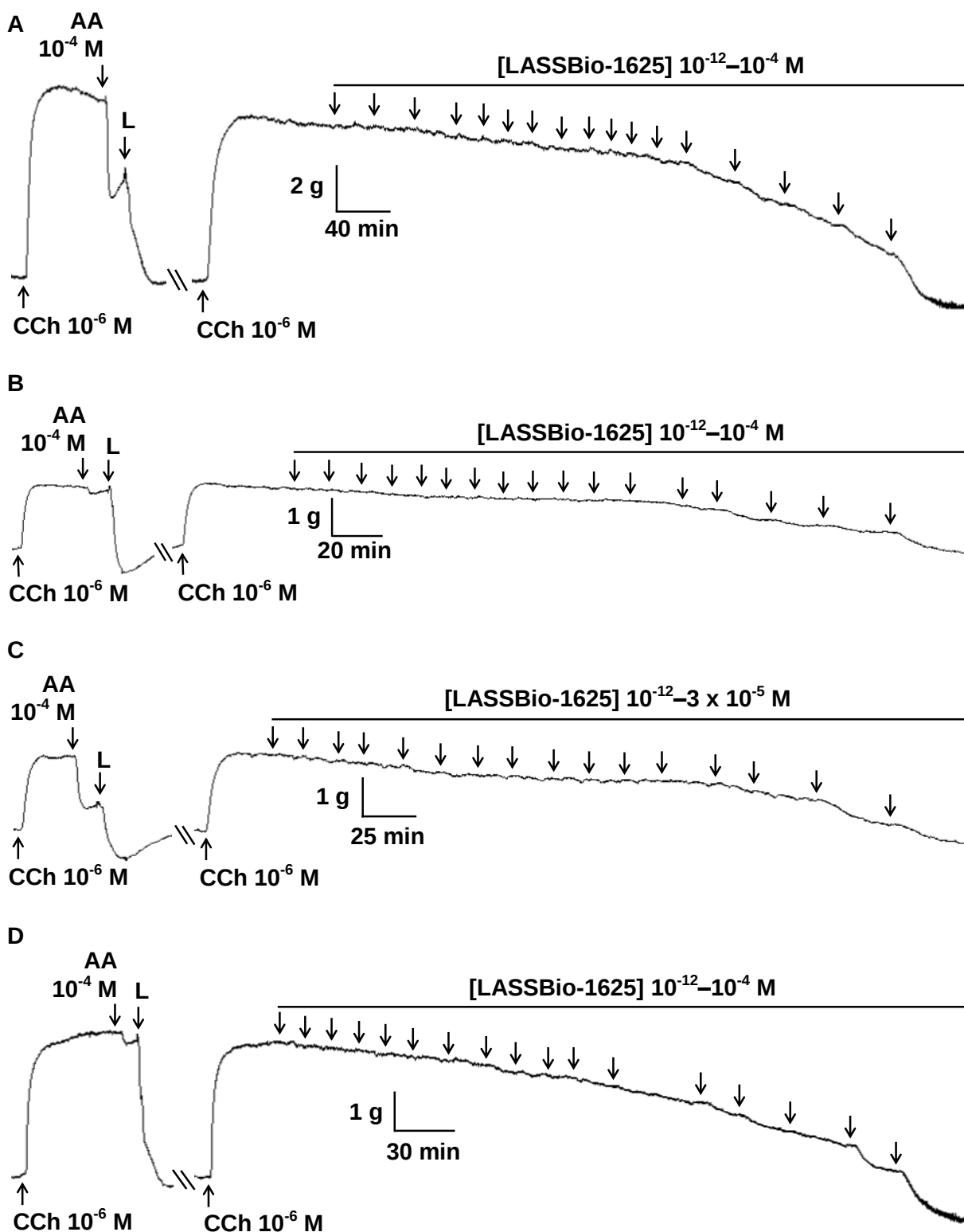
Tabela 10 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1629 em traqueia isolada de cobaia do grupo controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1629	GC		GIPAC	
	E+	E-	E+	E-
$E_{\max}$ (%)	$111,7 \pm 10,7$	$116,0 \pm 8,0$	$99,2 \pm 10,0$	$121,2 \pm 4,2$
pCE_{50}	$4,32 \pm 0,13$	$4,39 \pm 0,20$	$4,25 \pm 0,16$	$5,29 \pm 0,16^{\#\$}$
R^2	$0,960 \pm 0,006$	$0,921 \pm 0,023$	$0,929 \pm 0,010$	$0,848 \pm 0,039$

Teste *t* de Student, $^{\#}p < 0,05$ (GIPAC E- vs. GIPAC E+) e $^{\$}p < 0,05$ (GIPAC E- vs. GC E-), n = 5. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E- = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Silva, 2019.

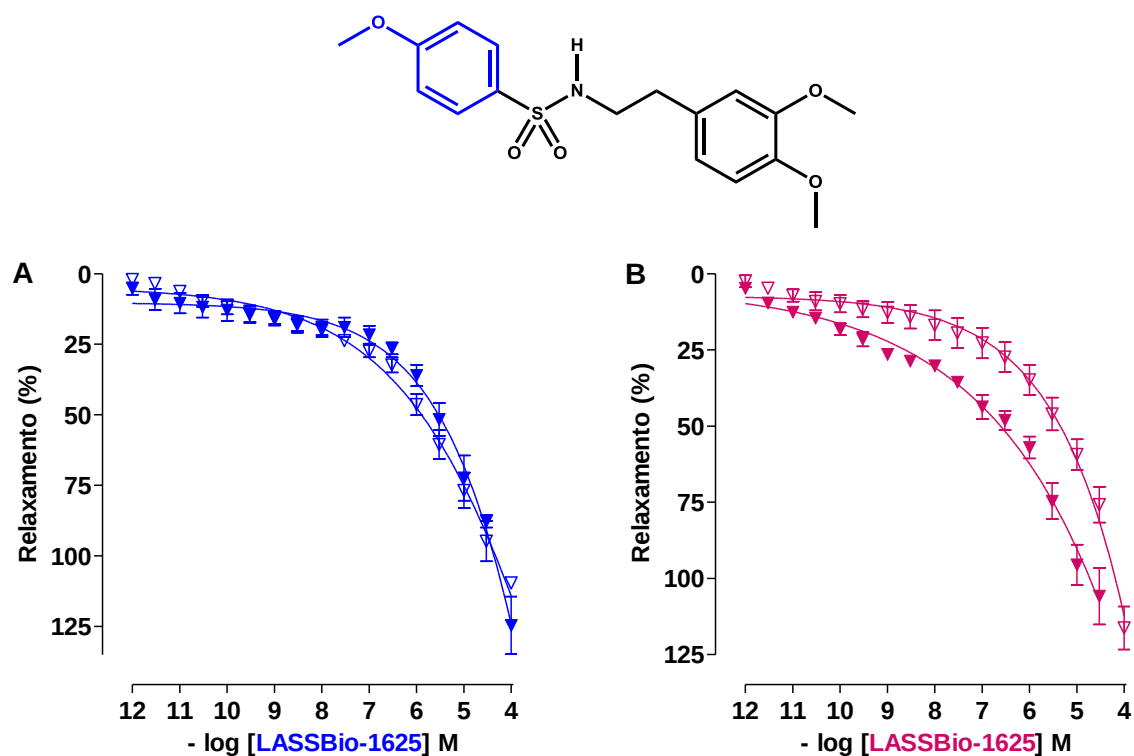
Figura 25 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1625 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1625 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 12 – Efeito relaxante do LASSBio-1625 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contráida 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: Silva, 2019.

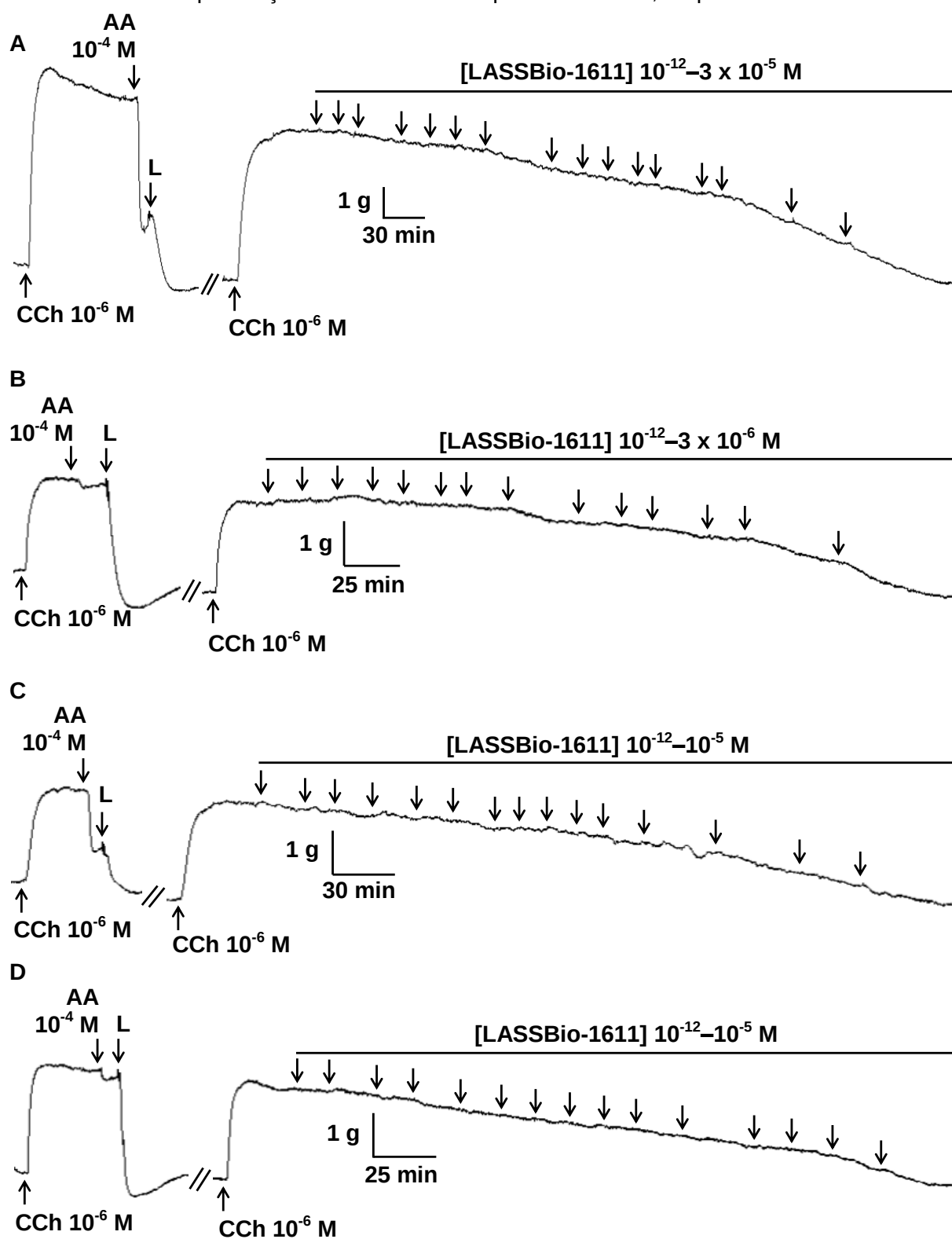
Tabela 11 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1625 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1625	GC		GIPAC	
	E+	E–	E+	E–
$E_{\max}$ (%)	120,0 ± 9,1	107,4 ± 1,5	107,4 ± 5,2	116,3 ± 7,0
pCE_{50}	5,40 ± 0,16	5,92 ± 0,16 ^{\$}	6,63 ± 0,24 ^{#&}	5,32 ± 0,13
R^2	0,899 ± 0,029	0,928 ± 0,016	0,911 ± 0,023	0,912 ± 0,021

Teste *t* de Student, [#]*p* < 0,05 (GIPAC E+ vs. GIPAC E–); [&]*p* < 0,05 (GIPAC E+ vs. GC E+) e ^{\$}*p* < 0,05 (GC E– vs. GIPAC E–), n = 5. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E– = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Silva, 2019.

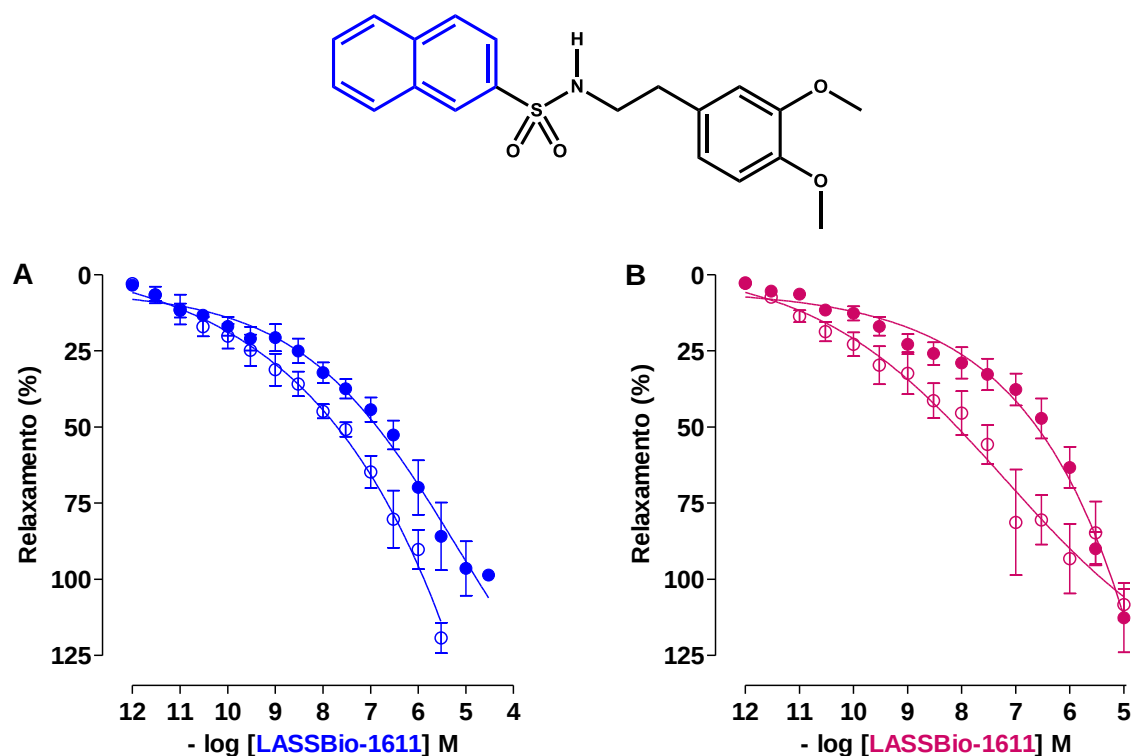
Figura 26 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A e B) e IPAC (C e D) pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1611 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 13 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle (A) e IPAC (B) pré-contraída 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: Silva, 2019.

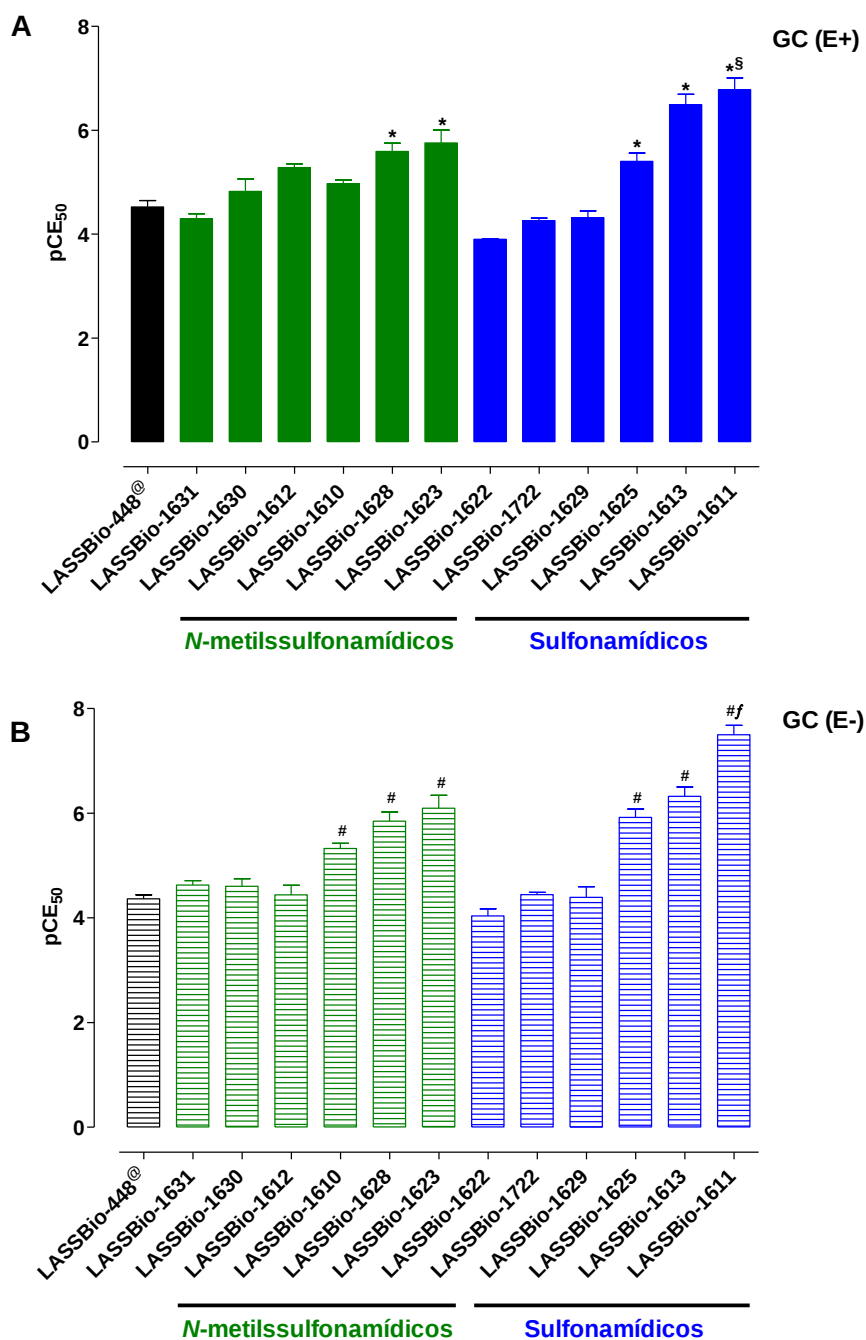
Tabela 12 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia dos grupos controle e IPAC pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBio-1611	GC		GIPAC	
	E+	E-	E+	E-
$E_{\max}$ (%)	$108,6 \pm 5,6$	$115,7 \pm 3,6$	$112,6 \pm 11,4$	$118,3 \pm 8,2$
pCE_{50}	$6,78 \pm 0,22$	$7,50 \pm 0,18^*$	$6,61 \pm 0,17$	$7,70 \pm 0,13^{\#}$
R^2	$0,939 \pm 0,011$	$0,932 \pm 0,009$	$0,890 \pm 0,027$	$0,928 \pm 0,014$

Teste *t* de Student, $*p < 0,05$ (GC E- vs. GC E+) e $^{\#}p < 0,05$ (GIPAC E- vs. GIPAC E+), n = 5. GC = grupo controle; GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E- = ausência de epitélio funcional.

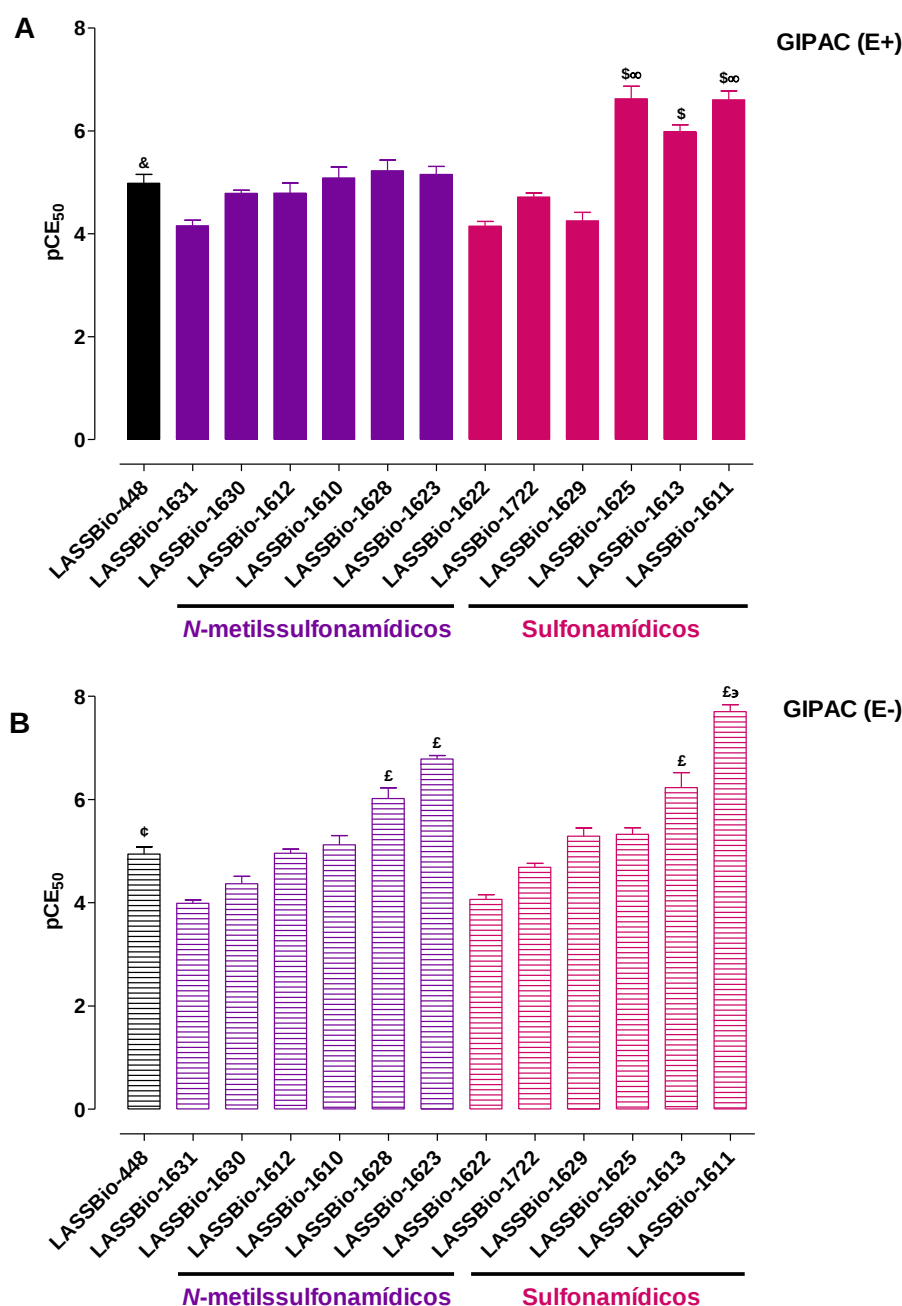
Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 14 – Valores de pCE_{50} dos LASSBio-448, -1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629, -1625, -1613 e -1611 em traqueia isolada de cobaia do grupo controle, na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3-5$). ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey, [E+ * $p < 0,05$ (LASSBio-1628, -1623, -1625, -1613 e -1611 vs. LASSBio-448); § $p < 0,05$ (LASSBio-1611 vs. LASSBio-1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629 e -1625)] e [E- # $p < 0,05$ (LASSBio-1610, -1628, -1623, -1625, -1613 e -1611 vs. LASSBio-448); f $p < 0,05$ (LASSBio-1611 vs. LASSBio-1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629, -1625 e -1613)]. GC = grupo controle; E+ = presença de epitélio funcional; E- = ausência de epitélio funcional. [@]Os resultados do LASSBio-448 foram obtidos por Martins (2016) em seu trabalho de tese.

Gráfico 15 – Valores de pCE_{50} dos LASSBio-448, -1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629, -1625, -1613 e -1611 em traqueia isolada de cobaia do grupo IPAC, na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3-5$). ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey, [E+ & $p < 0,05$ (LASSBio-448 vs. LASSBio-1631); \$ $p < 0,05$ (LASSBios-1625, -1613 e -1611 vs. LASSBio-448); ∞ $p < 0,05$ (LASSBios-1625 e -1611 vs. LASSBios-1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722 e -1629)] e [E- € $p < 0,05$ (LASSBio-448 vs. LASSBios-1631 e -1622); £ $p < 0,05$ (LASSBios-1628, -1623, -1613 e -1611 vs. LASSBio-448); ³ $p < 0,05$ (LASSBio-1611 vs. LASSBios-1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629, -1625 e -1613)]. GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E- = ausência de epitélio funcional.

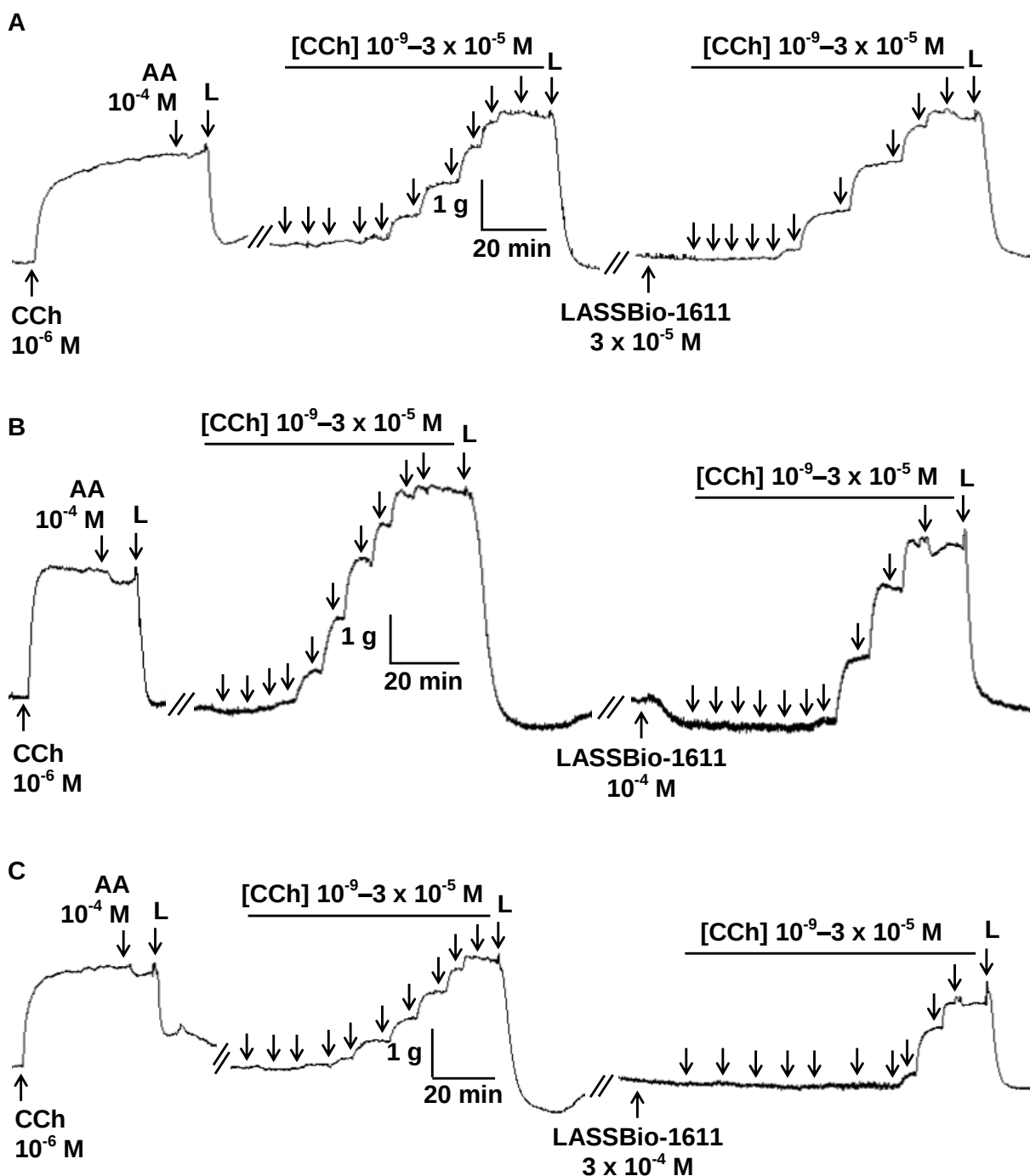
Fonte: Silva, 2019.

5.2 Caracterização do mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional

5.2.1 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos no efeito relaxante do LASSBio-1611

O LASSBio-1611 ($n = 5$) inibiu as contrações cumulativas induzidas por CCh em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional. A curva concentração-resposta cumulativa controle ($E_{\max} = 100\%$; $pCE_{50} = 6,42 \pm 0,03$; $R^2 = 0,998 \pm 0,0004$) foi desviada para a direita com redução do $E_{\max}$ e da potência, na presença de 3×10^{-5} ($E_{\max} = 104,7 \pm 5,3\%$; $pCE_{50} = 6,04 \pm 0,07$; $R^2 = 0,998 \pm 0,0003$), 10^{-4} ($E_{\max} = 79,8 \pm 3,6\%$; $pCE_{50} = 5,89 \pm 0,06$; $R^2 = 0,999 \pm 0,0004$) e 3×10^{-4} M ($E_{\max} = 71,7 \pm 5,2\%$; $pCE_{50} = 5,78 \pm 0,07$; $R^2 = 0,998 \pm 0,0007$) do LASSBio-1611 (Figura 27, Gráfico 16 e Tabela 13).

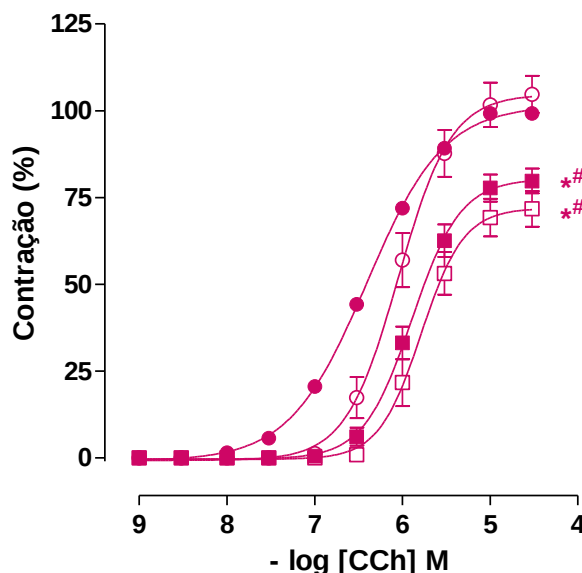
Figura 27 – Registros originais representativos da reatividade contrátil ao CCh em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência e na presença de 3×10^{-5} (A), 10^{-4} (B) e 3×10^{-4} M (C) do LASSBio-1611.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do CCh (A, B e C), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 16 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência (●) e na presença de 3×10^{-5} (○), 10^{-4} (■) e 3×10^{-4} M (□) do LASSBio-1611.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$ (controle vs. LASSBio-1611 10^{-4} e 3×10^{-4} M) e $^{\#}p < 0,05$ (LASSBio-1611 3×10^{-5} M vs. LASSBio-1611 10^{-4} e 3×10^{-4} M).

Fonte: Silva, 2019.

Tabela 13 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do CCh em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência (controle) e na presença de 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M do LASSBio-1611.

[LASSBio-1611] M	$E_{\max}$ (%)	pCE_{50}	R^2
Ausência	100	$6,42 \pm 0,03$	$0,998 \pm 0,0004$
3×10^{-5}	$104,7 \pm 5,3$	$6,04 \pm 0,07^*$	$0,998 \pm 0,0003$
10^{-4}	$79,8 \pm 3,6^{*\#}$	$5,89 \pm 0,06^*$	$0,999 \pm 0,0004$
3×10^{-4}	$71,7 \pm 5,2^{*\#}$	$5,78 \pm 0,07^{*\#}$	$0,998 \pm 0,0007$

ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$ (ausência vs. LASSBio-1611 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) e $^{\#}p < 0,05$ (LASSBio-1611 3×10^{-5} M vs. LASSBio-1611 10^{-4} e 3×10^{-4} M), $n = 5$.

Fonte: Silva, 2019.

5.2.2 Avaliação da participação da via do óxido nítrico no efeito relaxante do LASSBio-1611

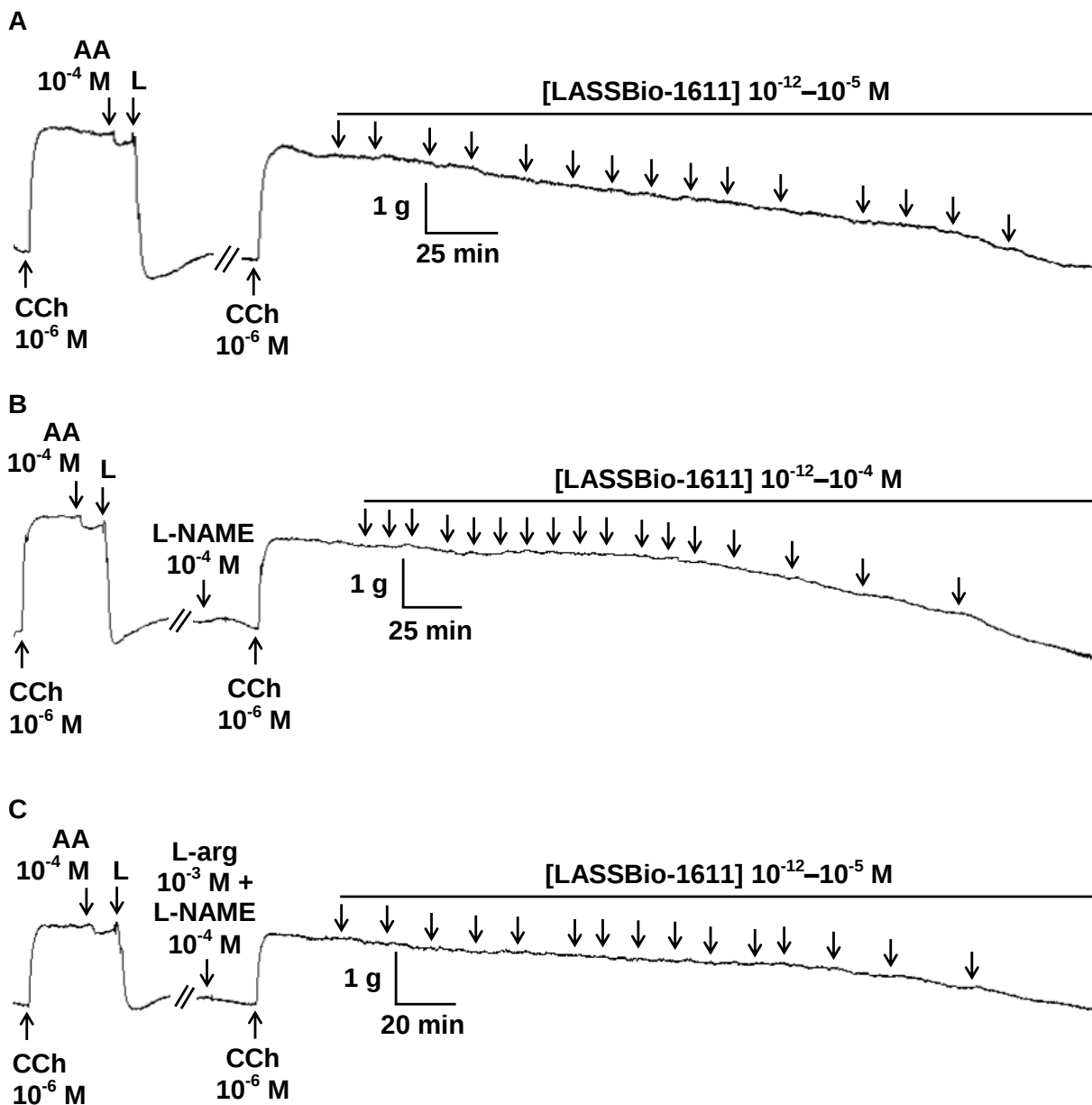
5.2.2.1 Avaliação da participação da sintase do óxido nítrico em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contráida com carbacol, na ausência e na presença de L-NAME e de L-arginina + L-NAME

A curva-controle de relaxamento do LASSBio-1611 ($E_{\max} = 118,3 \pm 8,2\%$; $pCE_{50} = 7,70 \pm 0,13$; $R^2 = 0,928 \pm 0,014$) foi desviada para a direita na presença de 10^{-4} M de L-NAME ($E_{\max} = 118,1 \pm 8,1\%$; $pCE_{50} = 5,47 \pm 0,17$; $R^2 = 0,916 \pm 0,016$), um inibidor não seletivo de NOS (Figura 28 e Gráfico 17, $n = 5$).

Ao comparar as curvas concentrações-resposta, observou-se que a potência relaxante do LASSBio-1611 foi reduzida em aproximadamente 170 vezes na presença do inibidor e que o $E_{\max}$ foi atingido nas concentrações de 10^{-5} e de 10^{-4} M, na ausência e na presença do L-NAME, respectivamente (Tabela 14).

O efeito inibitório do L-NAME sobre o relaxamento do LASSBio-1611 foi totalmente revertido na presença simultânea de 10^{-3} M de L-arginina e de 10^{-4} M de L-NAME, um substrato e um inibidor não seletivo de NOS, respectivamente ($E_{\max} = 107,6 \pm 1,6\%$; $pCE_{50} = 7,31 \pm 0,13$; $R^2 = 0,916 \pm 0,021$), sendo a curva concentração-resposta sobreposta a curva-controle em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional (Figura 28, Gráfico 17 e Tabela 14).

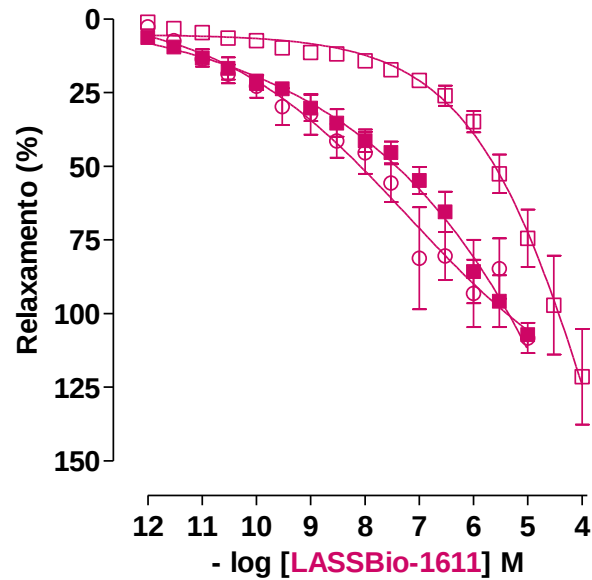
Figura 28 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (B) e de 10^{-3} M de L-arginina + 10^{-4} M de L-NAME (C).



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1611 (A, B e C), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem; L-NAME = N_{ω} -nitro-L-arginina metil éster; L-arg = L-arginina.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 17 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na ausência (○) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (□) e de 10^{-3} M de L-arginina + 10^{-4} M de L-NAME (■).



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

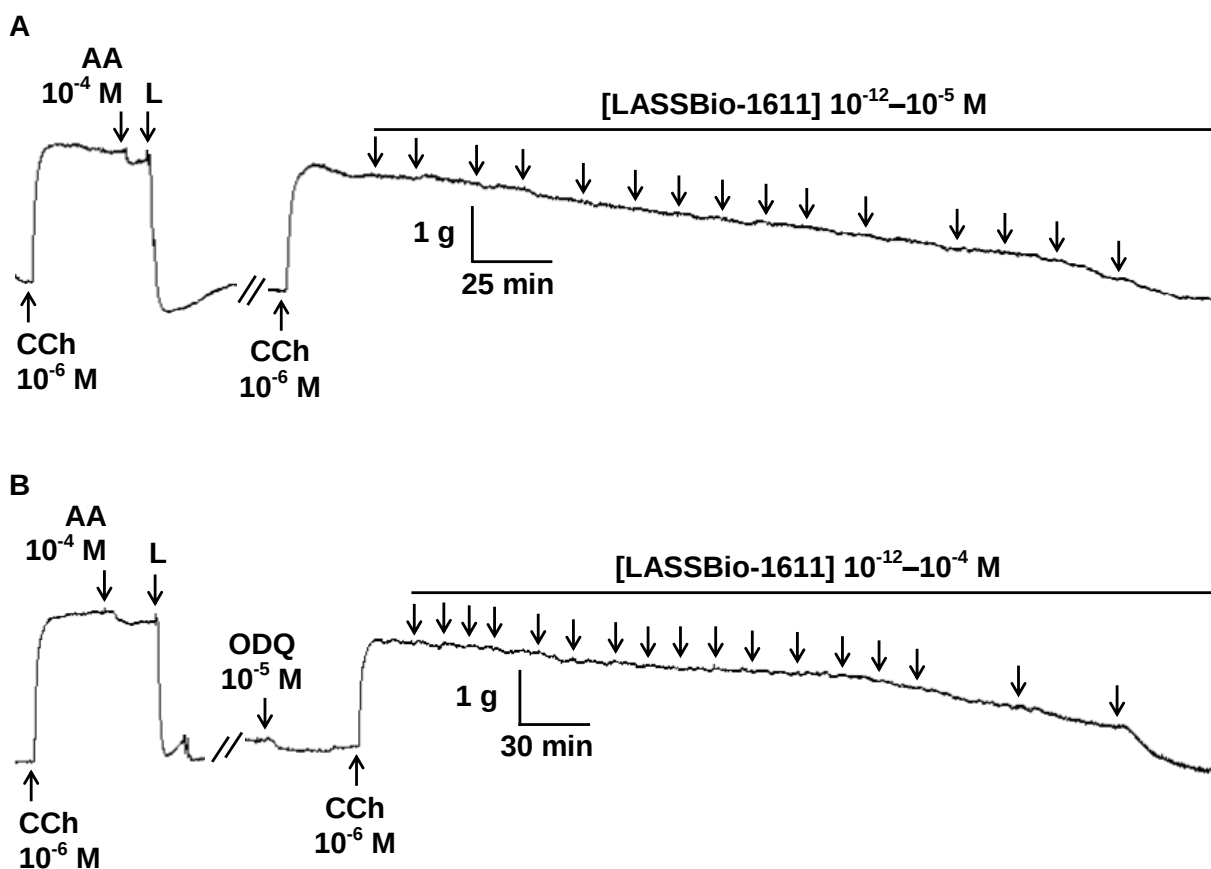
Fonte: Silva, 2019.

5.2.2.2 Avaliação da participação da ciclase de guanilil solúvel em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de ODQ

A curva concentração-resposta de relaxamento do LASSBio-1611 ($E_{\max} = 118,3 \pm 8,2\%$; $pCE_{50} = 7,70 \pm 0,13$; $R^2 = 0,928 \pm 0,014$) foi desviada para a direita, com redução da potência relaxante em aproximadamente 155 vezes, na presença de 10^{-5} M de ODQ ($E_{\max} = 119,0 \pm 4,0\%$; $pCE_{50} = 5,51 \pm 0,15$; $R^2 = 0,906 \pm 0,012$), um inibidor de sGC (Figura 29, Gráfico 18 e Tabela 14, $n = 5$).

O $E_{\max}$ do LASSBio-1611 foi atingido nas concentrações de 10^{-5} e de 10^{-4} M, na ausência e na presença de ODQ, respectivamente (Gráfico 18).

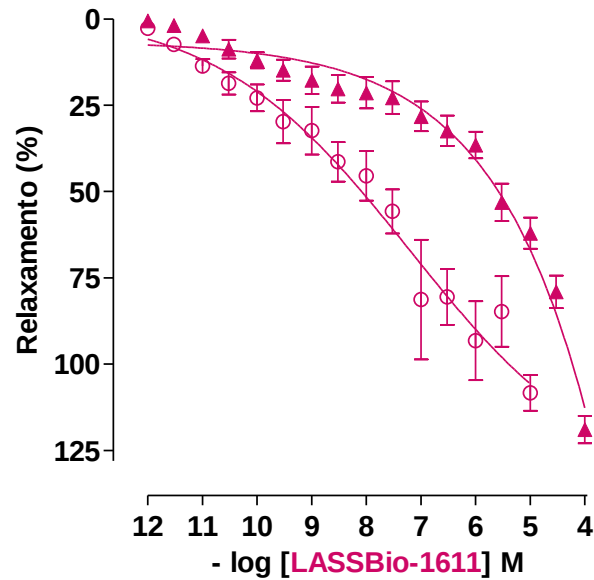
Figura 29 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-5} M de ODQ.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1611 (A e B), CCh = carbacol; ODQ = 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-ona; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 18 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (○) e na presença (▲) de 10^{-5} M de ODQ.



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

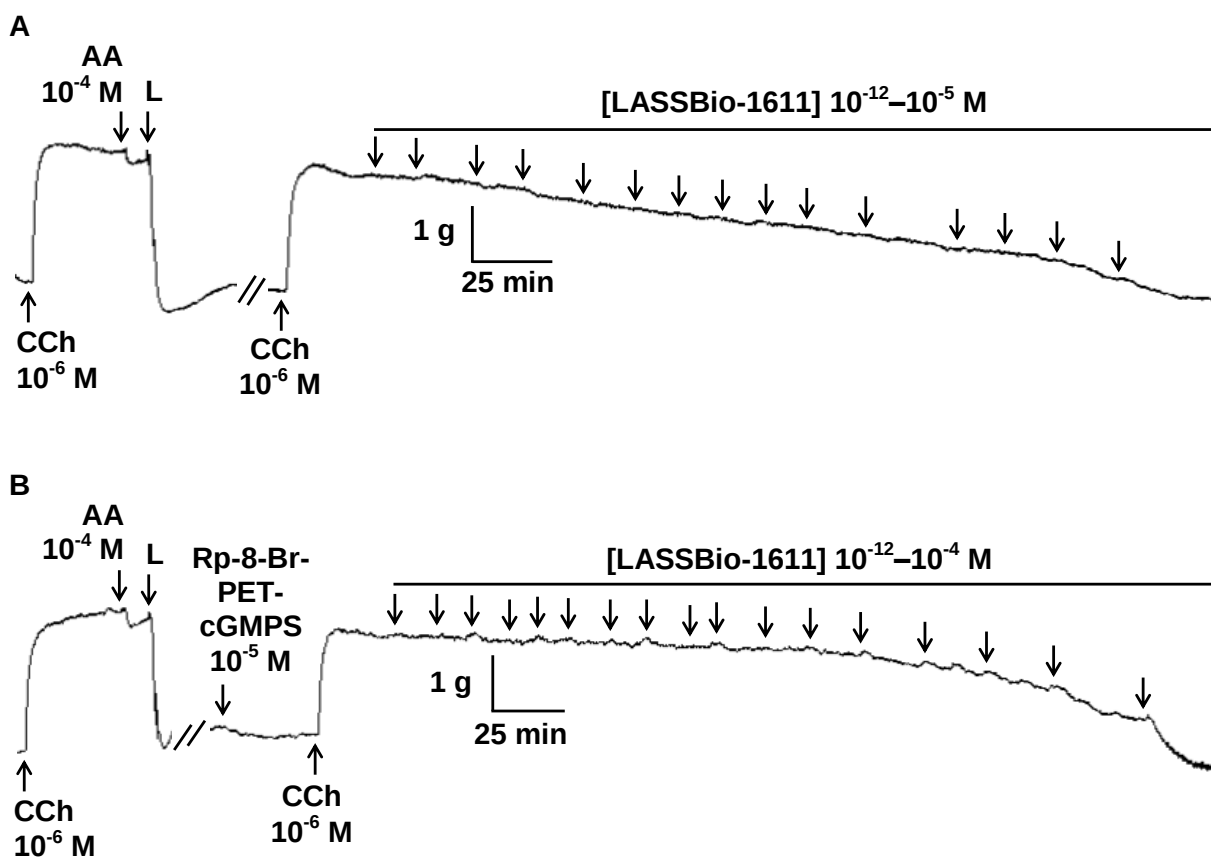
Fonte: Silva, 2019.

5.2.2.3 Avaliação da participação da proteína cinase G em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS

O LASSBio-1611 (10^{-12} - 10^{-4} M, $n = 5$) relaxou a traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional e na presença de 10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS, um inibidor de PKG ($E_{\max} = 106,5 \pm 9,6\%$; $pCE_{50} = 5,41 \pm 0,08$; $R^2 = 0,909 \pm 0,016$), desviando a curva-controle ($E_{\max} = 118,3 \pm 8,2\%$; $pCE_{50} = 7,70 \pm 0,13$; $R^2 = 0,928 \pm 0,014$) para a direita, diminuindo a potência relaxante em aproximadamente 195 vezes (Figura 30, Gráfico 19 e Tabela 14).

O $E_{\max}$ do LASSBio-1611 foi atingido nas concentrações de 10^{-5} e de 10^{-4} M, na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS, respectivamente (Gráfico 19).

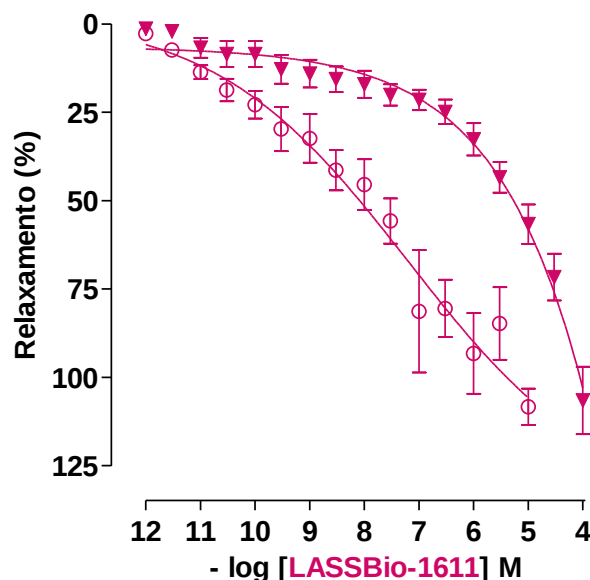
Figura 30 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1611 (A e B), CCh = carbacol; Rp-8-Br-PET-cGMPS = Rp-8-bromo- β -fenil-1, N^2 -etenoguanosina-3',5', monofosforotioato cíclico; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 19 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (○) e na presença (▼) de 10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS.



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

Fonte: Silva, 2019.

Tabela 14 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (controle) e na presença de substrato e/ou inibidores da via NOS/sGC/PKG/cGMP.

Substrato/inibidores	$E_{\max}$ (%)	pCE_{50}	R^2
Ausência	$118,3 \pm 8,2$	$7,70 \pm 0,13$	$0,928 \pm 0,014$
L-NAME	$118,1 \pm 8,1$	$5,47 \pm 0,17^{* \#}$	$0,916 \pm 0,016$
L-arginina + L-NAME	$107,6 \pm 1,6$	$7,31 \pm 0,13$	$0,916 \pm 0,021$
ODQ	$119,0 \pm 4,0$	$5,51 \pm 0,15^{* \#}$	$0,906 \pm 0,012$
Rp-8-Br-PET-cGMPS	$106,5 \pm 9,6$	$5,41 \pm 0,08^{* \#}$	$0,909 \pm 0,016$

Teste t de Student, $*p < 0,05$ (ausência vs. L-NAME, ODQ e Rp-8-Br-PET-cGMPS) e $^{\#}p < 0,05$ (L-arginina + L-NAME vs. L-NAME, ODQ e Rp-8-Br-PET-cGMPS), $n = 5$.

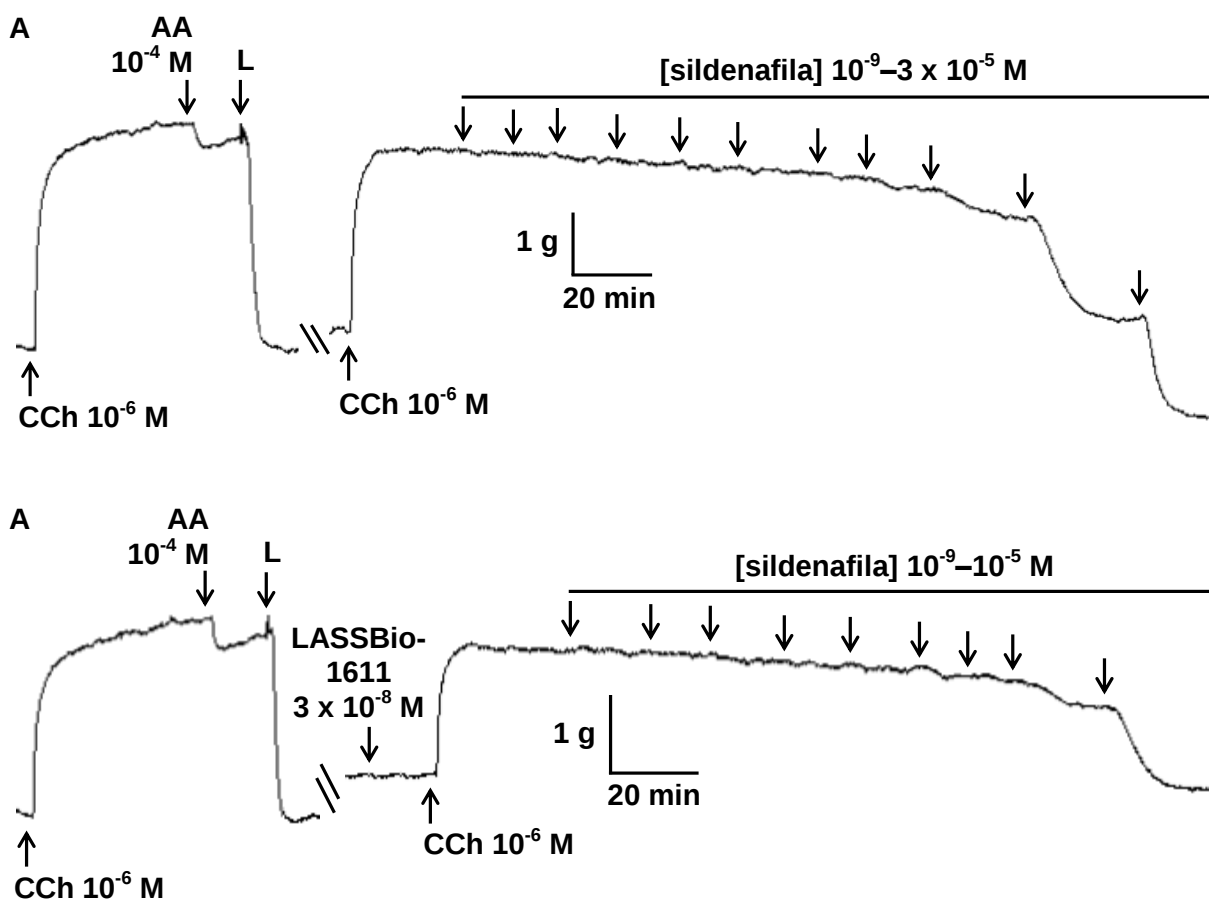
Fonte: Silva, 2019.

5.2.3 Avaliação da participação da fosfodiesterase 5 no efeito relaxante do LASSBio-1611

5.2.3.1 Avaliação do efeito relaxante da sildenafil em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com carbacol, na ausência e na presença do LASSBio-1611

A sildenafil (10^{-9} – 3×10^{-5} M, $n = 5$), um inibidor seletivo de PDE5, relaxou a traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional, pré-contraída com CCh ($E_{\max} = 132,6 \pm 10,2\%$; $pCE_{50} = 5,38 \pm 0,10$; $R^2 = 0,914 \pm 0,030$), sendo esse efeito potencializado em aproximadamente 2,8 vezes, na presença de 3×10^{-8} M do LASSBio-1611 ($E_{\max} = 115,6 \pm 5,7\%$; $pCE_{50} = 5,82 \pm 0,12$; $R^2 = 0,888 \pm 0,016$). A eficácia relaxante da sildenafil não foi alterada na presença do LASSBio-1611 (Figura 31A e B e Gráfico 20).

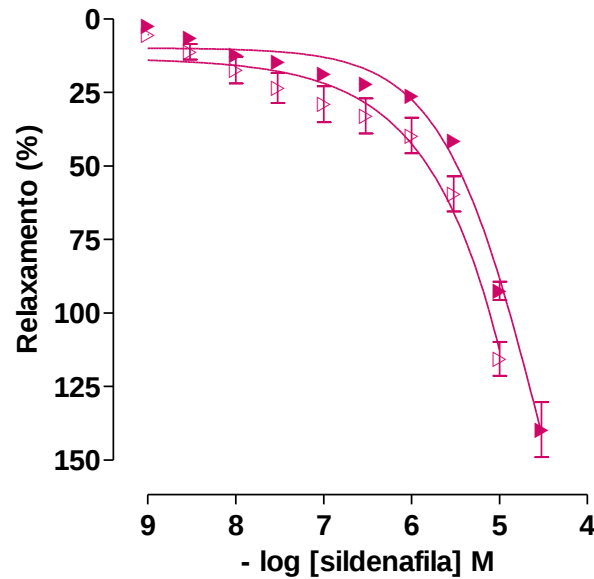
Figura 31 – Registros originais representativos do efeito relaxante da sildenafil em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 3×10^{-8} M do LASSBio-1611.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa da sildenafil (A e B), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 20 – Efeito relaxante da sildenafil em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contráída com 10^{-6} M de CCh na ausência (▶) e na presença (▷) de 3×10^{-8} M do LASSBio-1611.



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

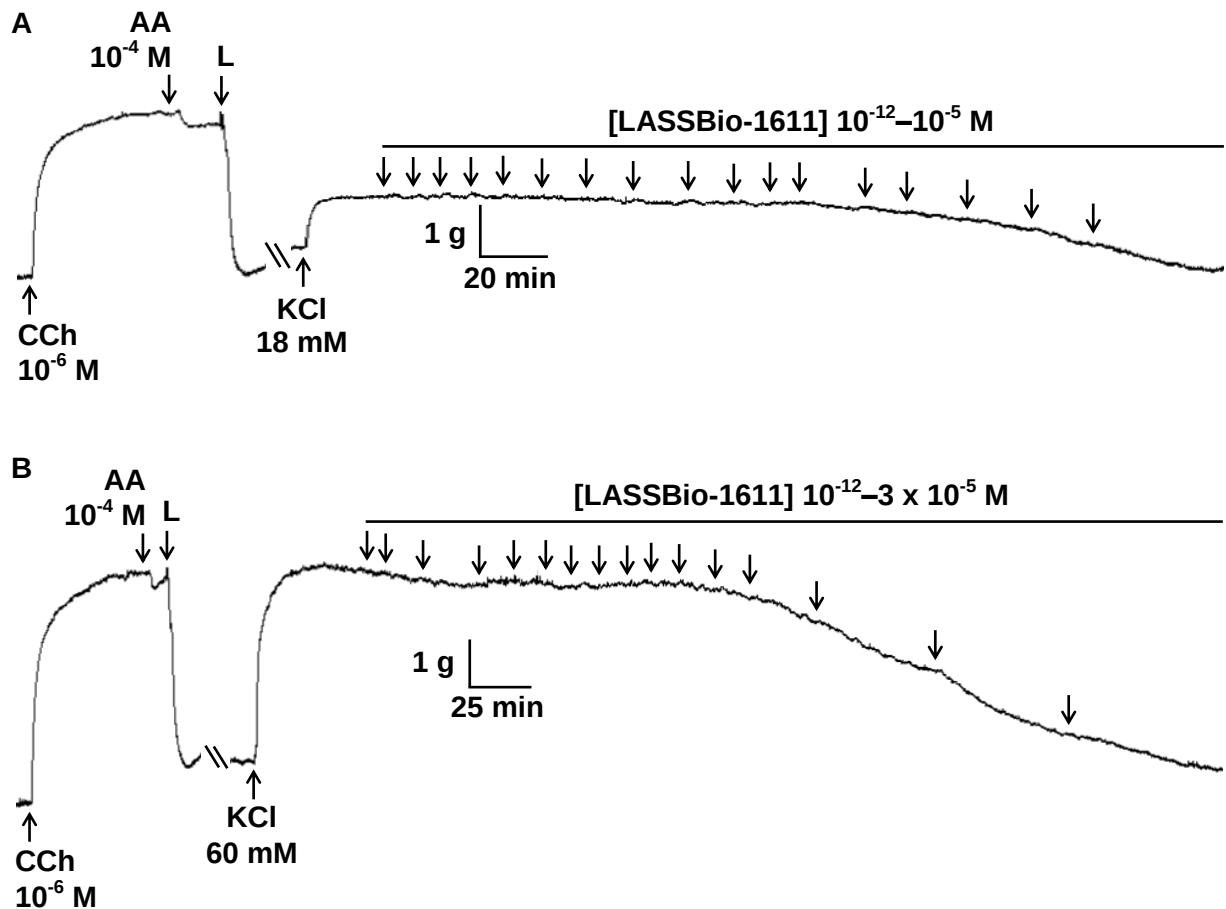
Fonte: Silva, 2019.

5.2.4 Avaliação da participação dos canais de potássio e/ou de cálcio dependentes de voltagem no efeito relaxante do LASSBio-1611

5.2.4.1 Avaliação do efeito relaxante do LASSBio-1611 sobre as contrações tônicas induzidas por 18 ou por 60 mM de KCl em traqueia isolada de cobaia com IPAC

O LASSBio-1611 (10^{-12} – 3×10^{-5} M, $n = 5$) relaxou, de maneira dependente de concentração, com a mesma eficácia e equipotente, a traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional, tanto pré-contraída com solução isomolar de 18 ($E_{\max} = 122,3 \pm 12,2\%$; $pCE_{50} = 6,37 \pm 0,20$; $R^2 = 0,937 \pm 0,024$) como de 60 mM ($E_{\max} = 123,8 \pm 9,1\%$; $pCE_{50} = 6,07 \pm 0,18$; $R^2 = 0,918 \pm 0,028$) de KCl (Figura 32 e Gráfico 21)

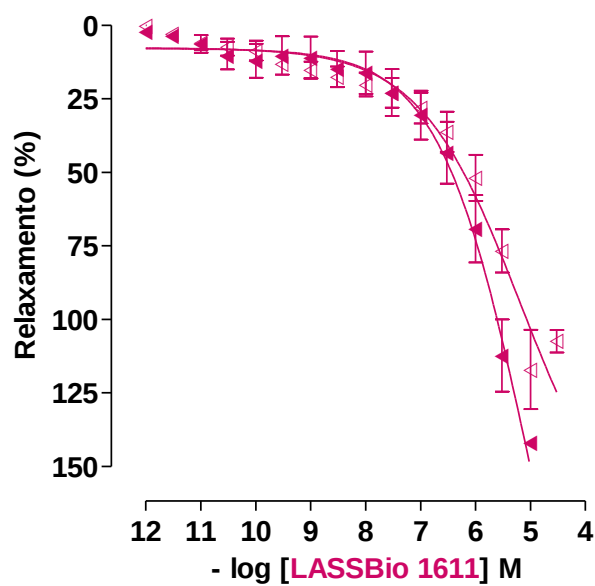
Figura 32 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contráida com 18 (A) ou 60 mM (B) de KCl.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1611 (A e B), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 21 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 18 (◄) ou 60 mM (◄) de KCl.



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

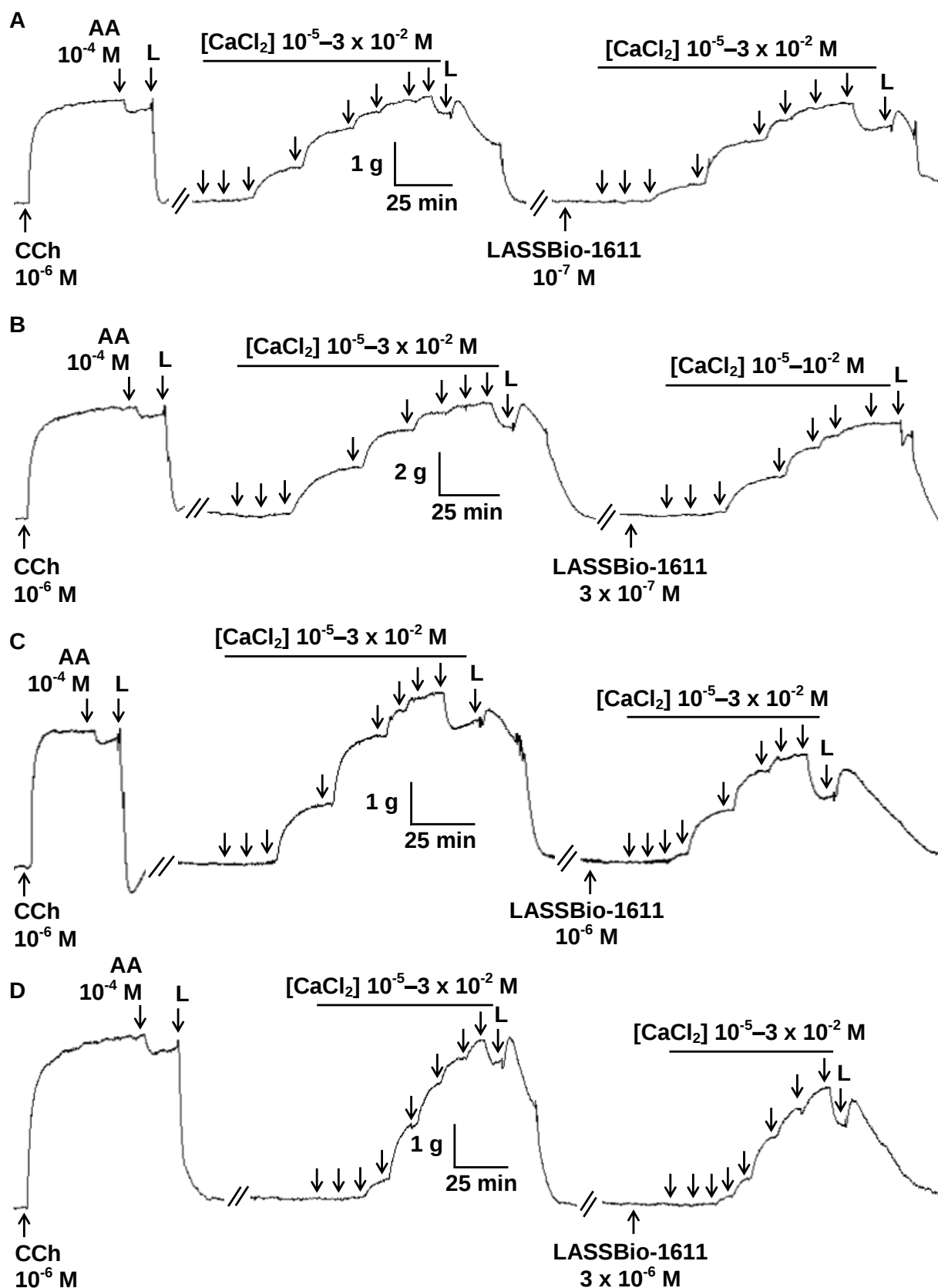
Fonte: Silva, 2019

5.2.4.2 Avaliação da reatividade contrátil ao cloreto de cálcio em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência e na presença do LASSBio-1611

O LASSBio-1611 ($n = 5$) inibiu, de maneira dependente de concentração, as contrações cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+} . A curva concentração-resposta cumulativa controle ($E_{\text{max}} = 100\%$; $R^2 = 0,996 \pm 0,002$) foi desviada para a direita de maneira não paralela e com redução do E_{max} , na presença de 10^{-7} ($E_{\text{max}} = 99,0 \pm 1,9\%$; $R^2 = 0,993 \pm 0,001$), 3×10^{-7} ($E_{\text{max}} = 85,6 \pm 1,4\%$; $R^2 = 0,995 \pm 0,002$), 10^{-6} ($E_{\text{max}} = 74,7 \pm 4,5\%$; $R^2 = 0,997 \pm 0,001$), 3×10^{-6} ($E_{\text{max}} = 71,1 \pm 2,8\%$; $R^2 = 0,995 \pm 0,001$), 10^{-5} ($E_{\text{max}} = 60,2 \pm 2,8\%$; $R^2 = 0,995 \pm 0,001$), 3×10^{-5} ($E_{\text{max}} = 36,3 \pm 4,1\%$; $R^2 = 0,993 \pm 0,012$) e 10^{-4} M ($E_{\text{max}} = 36,7 \pm 4,2\%$; $R^2 = 0,989 \pm 0,002$) do LASSBio (Figura 33, Gráfico 22 e Tabela 15).

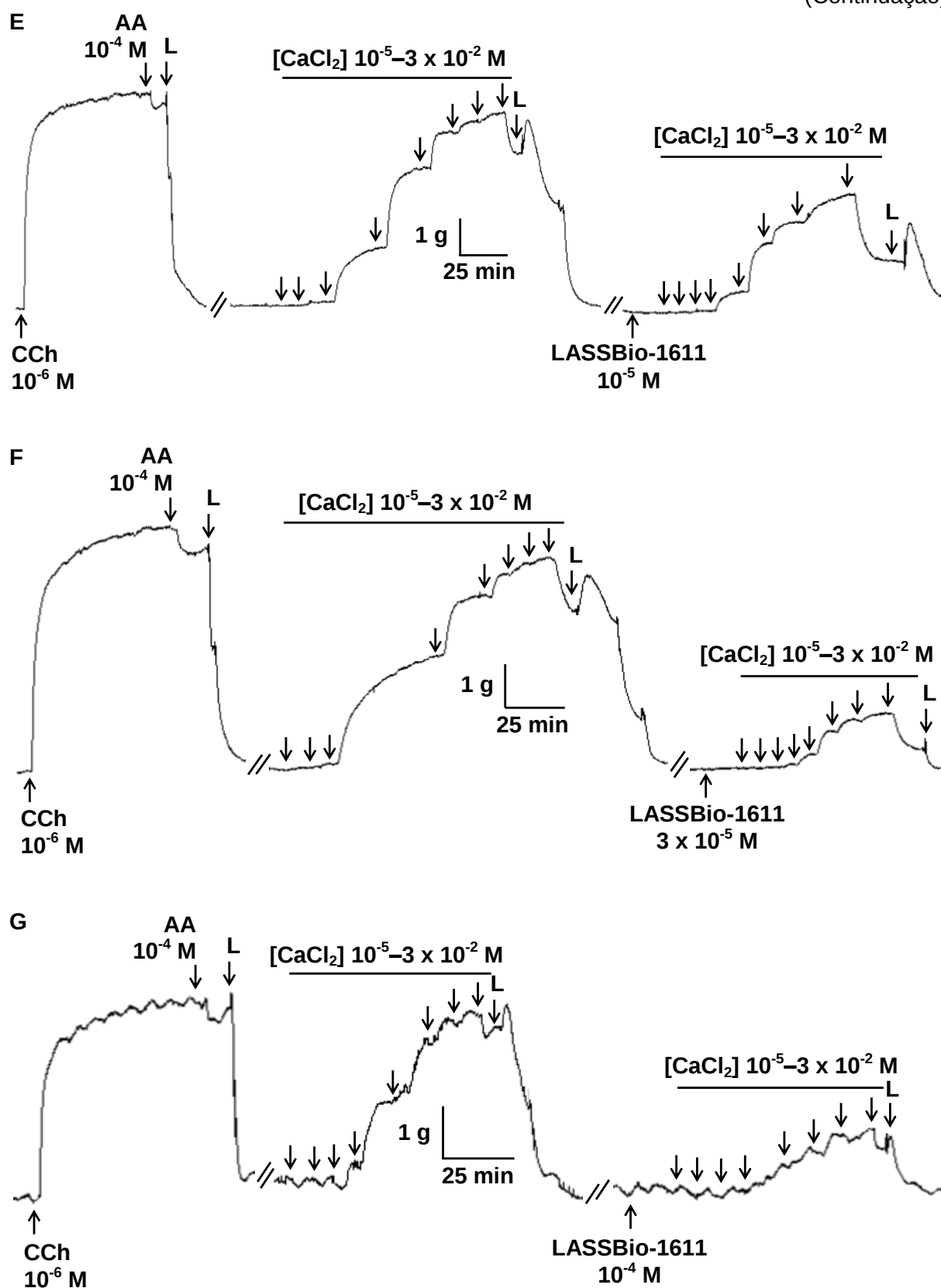
A potência contrátil do CaCl_2 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional, foi reduzida para ($\text{pCE}_{50} = 3,59 \pm 0,05$; $3,36 \pm 0,14$; $3,46 \pm 0,04$; $3,17 \pm 0,03$; $3,04 \pm 0,04$; $3,03 \pm 0,09$ e $2,78 \pm 0,03$, respectivamente), na presença do LASSBio-1611 em comparação a curva-controle ($\text{pCE}_{50} = 3,62 \pm 0,04$) (Tabela 15).

Figura 33 – Registros originais representativos da reatividade contrátil ao CaCl_2 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência e na presença de 10^{-7} (A), 3×10^{-7} (B), 10^{-6} (C), 3×10^{-6} (D), 10^{-5} (E), 3×10^{-5} (F) e 10^{-4} M (G) do LASSBio-1611.



(Continua)

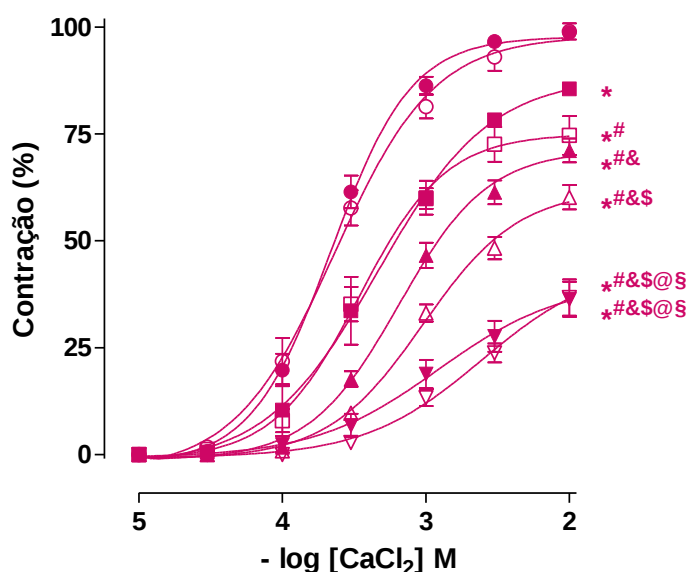
(Continuação)



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do CaCl₂ (A, B, C, D, E, F e G), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem.

Fonte: Silva, 2019.

Gráfico 22 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência (●) e na presença de 10^{-7} (○), 3×10^{-7} (■), 10^{-6} (□), 3×10^{-6} (▲), 10^{-5} (△), 3×10^{-5} (▼) e 10^{-4} M (▽) do LASSBio-1611.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$ (ausência vs. LASSBio-1611 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M); $\#p < 0,05$ (10^{-7} M vs. 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M); $\&p < 0,05$ (3×10^{-7} M vs. 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M); $\$p < 0,05$ (10^{-6} M vs. 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M); $@p < 0,05$ (3×10^{-6} M vs. 3×10^{-5} e 10^{-4} M) e $\epsilon p < 0,05$ (10^{-5} M vs. 3×10^{-5} e 10^{-4} M).

Fonte: Silva, 2019.

Tabela 15 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do CaCl_2 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na ausência (controle) e na presença de 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M do LASSBio-1611.

[LASSBio-1611] M	$E_{\max}$ (%)	pCE_{50}	R^2
Ausência	100	$3,62 \pm 0,04$	$0,996 \pm 0,002$
10^{-7}	$99,0 \pm 1,9$	$3,59 \pm 0,05$	$0,993 \pm 0,001$
3×10^{-7}	$85,6 \pm 1,4^*$	$3,36 \pm 0,14$	$0,995 \pm 0,002$
10^{-6}	$74,7 \pm 4,5^{*\#}$	$3,46 \pm 0,04$	$0,997 \pm 0,001$
3×10^{-6}	$71,1 \pm 2,8^{*\#\&}$	$3,17 \pm 0,03^{*\#}$	$0,995 \pm 0,001$
10^{-5}	$60,2 \pm 2,8^{*\#\&\$}$	$3,04 \pm 0,04^{*\#\&\$}$	$0,995 \pm 0,001$
3×10^{-5}	$36,3 \pm 4,1^{*\#\&\$@\epsilon}$	$3,03 \pm 0,09^{*\#\&\$}$	$0,993 \pm 0,012$
10^{-4}	$36,7 \pm 4,2^{*\#\&\$@\epsilon}$	$2,78 \pm 0,03^{*\#\&\$@}$	$0,989 \pm 0,002$

ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$ (ausência vs. LASSBio-1611 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M); $\#p < 0,05$ (10^{-7} M vs. 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M); $\&p < 0,05$ (3×10^{-7} M vs. 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M); $\$p < 0,05$ (10^{-6} M vs. 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M); $@p < 0,05$ (3×10^{-6} M vs. 3×10^{-5} e 10^{-4} M) e $\epsilon p < 0,05$ (10^{-5} M vs. 3×10^{-5} e 10^{-4} M), $n = 5$.

Fonte: Silva, 2019.

5.2.5 Avaliação da participação da via das ciclo-oxigenases no efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contráida com carbacol, na ausência e na presença de indometacina e de L-NAME + indometacina

A curva concentração-resposta de relaxamento do LASSBio-1611 (10^{-12} – 3×10^{-4} M, $n = 5$) em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, na presença de 10^{-5} M de indometacina, um inibidor não seletivo de COX ($E_{\max} = 106,4 \pm 2,9\%$; $pCE_{50} = 4,79 \pm 0,14$; $R^2 = 0,923 \pm 0,020$), foi desviada para a direita em comparação a curva-controle ($E_{\max} = 118,3 \pm 8,2\%$; $pCE_{50} = 7,70 \pm 0,13$; $R^2 = 0,928 \pm 0,014$) (Figura 34A e B; Gráfico 23).

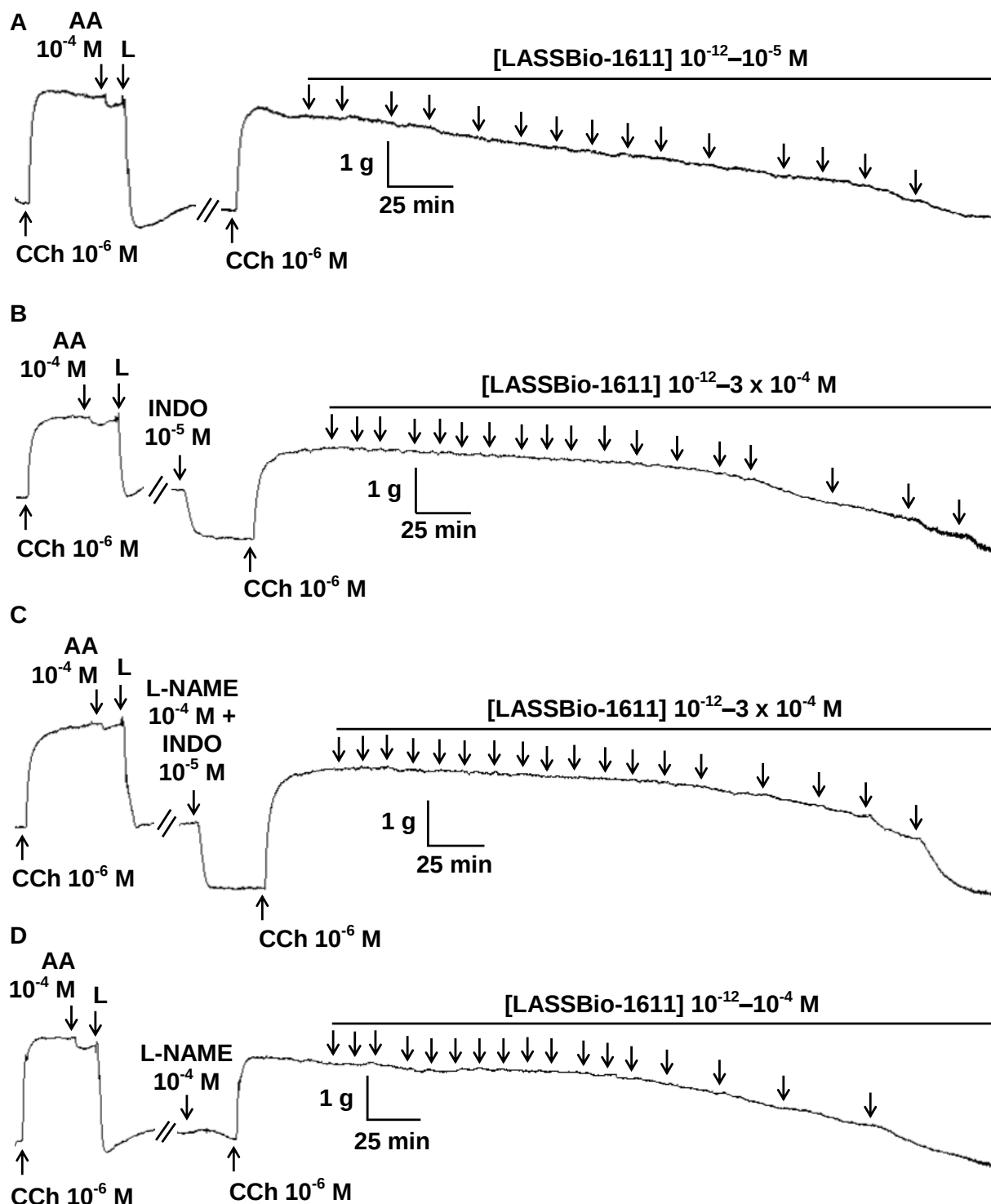
Ao analisar os valores de pCE_{50} , observou-se que a potência relaxante do LASSBio-1611 na presença da indometacina foi reduzida em aproximadamente 813 vezes quando comparada ao controle. Assim como também se observou que essa resposta inibitória da indometacina foi maior em aproximadamente 4,8 vezes em comparação a curva concentração-resposta do LASSBio na presença do L-NAME (Tabela 16).

O $E_{\max}$ do LASSBio-1611 foi atingido na concentração de 10^{-5} e de 3×10^{-4} M na ausência e na presença do inibidor, respectivamente (Gráfico 23).

Na presença simultânea de 10^{-4} M de L-NAME e de 10^{-5} M de indometacina, inibidores não seletivos de NOS e de COX, respectivamente, a curva-controle de relaxamento do LASSBio-1611 (10^{-12} – 3×10^{-4} M, $n = 5$) em traqueia de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional, foi desviada para a direita, atingindo o $E_{\max}$ em $102,3 \pm 4,0\%$ na concentração de 3×10^{-4} M (Figura 34C e Gráfico 23).

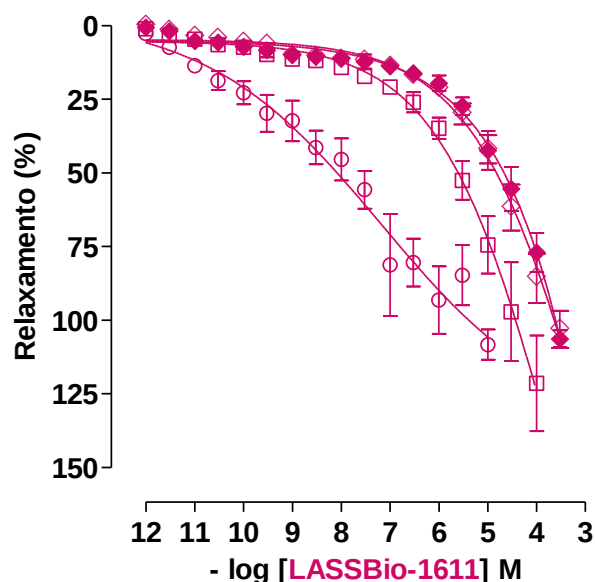
A potência relaxante do LASSBio-1611 na presença simultânea dos inibidores ($pCE_{50} = 4,97 \pm 0,14$; $R^2 = 0,920 \pm 0,017$) foi reduzida em aproximadamente 537 vezes em comparação ao controle ($pCE_{50} = 7,70 \pm 0,13$; $R^2 = 0,928 \pm 0,014$), sendo equipotente em relação as curvas na presença apenas, do L-NAME e/ou da indometacina (Figura 34D; Gráfico 23 e Tabela 16).

Figura 34 – Registros originais representativos do efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-5} M de indometacina (B), de 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-5} M de indometacina (C) e de 10^{-4} M de L-NAME (D).



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1611 (A, B, C e D), CCh = carbacol; AA = ácido araquidônico; L = lavagem; INDO = indometacina; L-NAME = N_{ω} -nitro-L-arginina metil éster.

Gráfico 23 – Efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (○) e na presença de 10^{-5} M de indometacina (◆), de 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-5} M de indometacina (◇) e de 10^{-4} M de L-NAME (□).



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

Fonte: Silva, 2019.

Tabela 16 – Valores de $E_{\max}$, de pCE_{50} e de R^2 do LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, sem epitélio funcional, pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (controle) e na presença de inibidores das vias NOS/COX.

Inibidores	$E_{\max}$ (%)	pCE_{50}	R^2
Ausência	$118,3 \pm 8,2$	$7,70 \pm 0,13$	$0,928 \pm 0,014$
L-NAME	$118,1 \pm 8,1$	$5,47 \pm 0,17^*$	$0,916 \pm 0,016$
Indometacina	$106,4 \pm 2,9$	$4,79 \pm 0,14^{* \#}$	$0,923 \pm 0,020$
Indometacina + L-NAME	$102,3 \pm 4,0$	$4,97 \pm 0,14^*$	$0,920 \pm 0,017$

ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$ (ausência vs. indometacina, L-NAME + indometacina e L-NAME) e $^{\#}p < 0,05$ (indometacina vs. L-NAME), n = 5.

Fonte: Silva, 2019.

5.2.6 Estudo de *docking* molecular

5.2.6.1 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou a L-arginina e as sintases do óxido nítrico induzível e neuronal

A entalpia de formação (ΔH_f) do complexo ligante-macromolécula entre o LASSBio-1611 e a iNOS foi de -90,37 kcal/mol, sendo ainda menor quando a enzima avaliada foi a nNOS (ΔH_f = -133,02 kcal/mol). Em contrapartida, ao se analisar essa entalpia entre o substrato L-arginina e as enzimas iNOS (ΔH_f = -65,77 kcal/mol) e nNOS (ΔH_f = -97,60 kcal/mol), observou-se uma menor estabilidade do complexo ligante-macromolécula.

Além disso, observou-se que as interações do LASSBio-1611 com a iNOS são do tipo estéricas (linhas pontilhadas vermelhas), que se formam entre átomos apolares, entre o átomo de oxigênio do grupo 4-metoxi e o resíduo de aminoácido prolina (Pro)³⁴⁴; entre um carbono do grupo naftila e a isoleucina (Ile)⁴⁵⁶, bem como interações do tipo Van der Waals com o glutamato (Glu)³⁷¹ (Figura 35A e B).

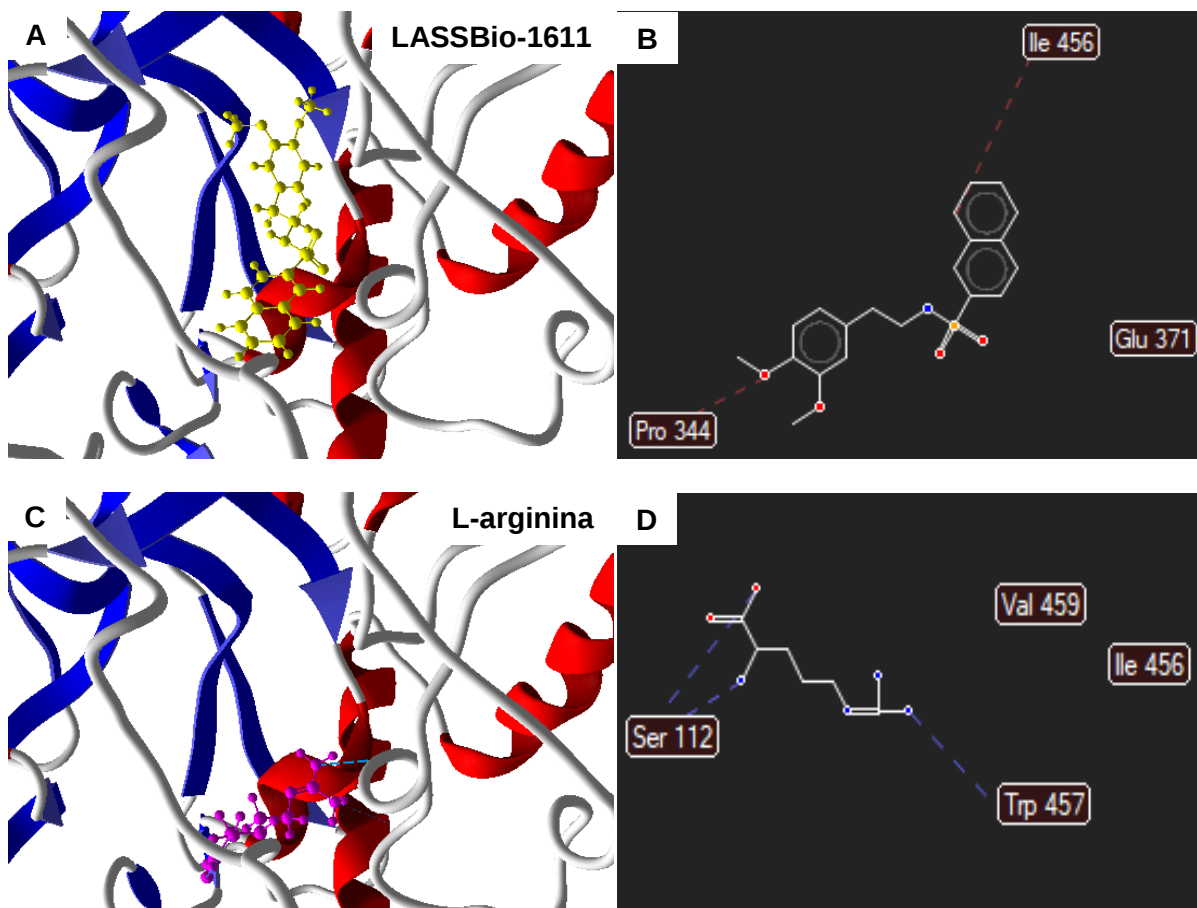
Já as interações observadas para a L-arginina foram do tipo ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis) entre os átomos de nitrogênio (ligado ao carbono 2) e de oxigênio do grupo ácido carboxílico com a serina (Ser)¹¹² e entre um nitrogênio do grupo diaminometilideno-amino com o triptofano (Trp)⁴⁵⁷ da iNOS. Além disso, observaram-se interações do tipo Van der Waals com a valina (Val)⁴⁵⁹ e a Ile⁴⁵⁶ (Figura 35C e D).

Em relação à nNOS, observou-se que o LASSBio-1611 formou interações do tipo ligação de hidrogênio (linha pontilhada azul) entre o oxigênio do grupo 3-metoxi e o Trp^{678(A)} e do tipo estéricas (linhas pontilhadas vermelhas) entre o carbono do grupo 3-metoxi com a metionina (Met)^{336(A)} e o Trp^{678(A)}; dois carbonos, o enxofre e um oxigênio da função sulfonamida com a Val^{677(A)}; um oxigênio da função sulfonamida com a Ser^{334(A)}; e carbonos do grupo naftila, sendo um com a arginina (Arg)^{596(A)}, dois com o Trp^{306(B)} e três com a histidina (His)^{692(B)}. Além disso, observou-se uma interação de Van der Waals com o Trp^{676(B)} (Figura 36A e B).

Enquanto que com a L-arginina, observaram-se algumas ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis) entre os átomos de nitrogênio (ligado ao carbono 2) e de oxigênio do grupo ácido carboxílico com a Ser^{334(B)} e entre um

nitrogênio do grupo diaminometilideno-amino com o Trp^{678(B)}; além de interações de Van der Waals com os aminoácidos Trp^{676(A)}, Phe^{691(A)}, Val^{677(B)} e Val^{680(B)} da nNOS (Figura 36C e D).

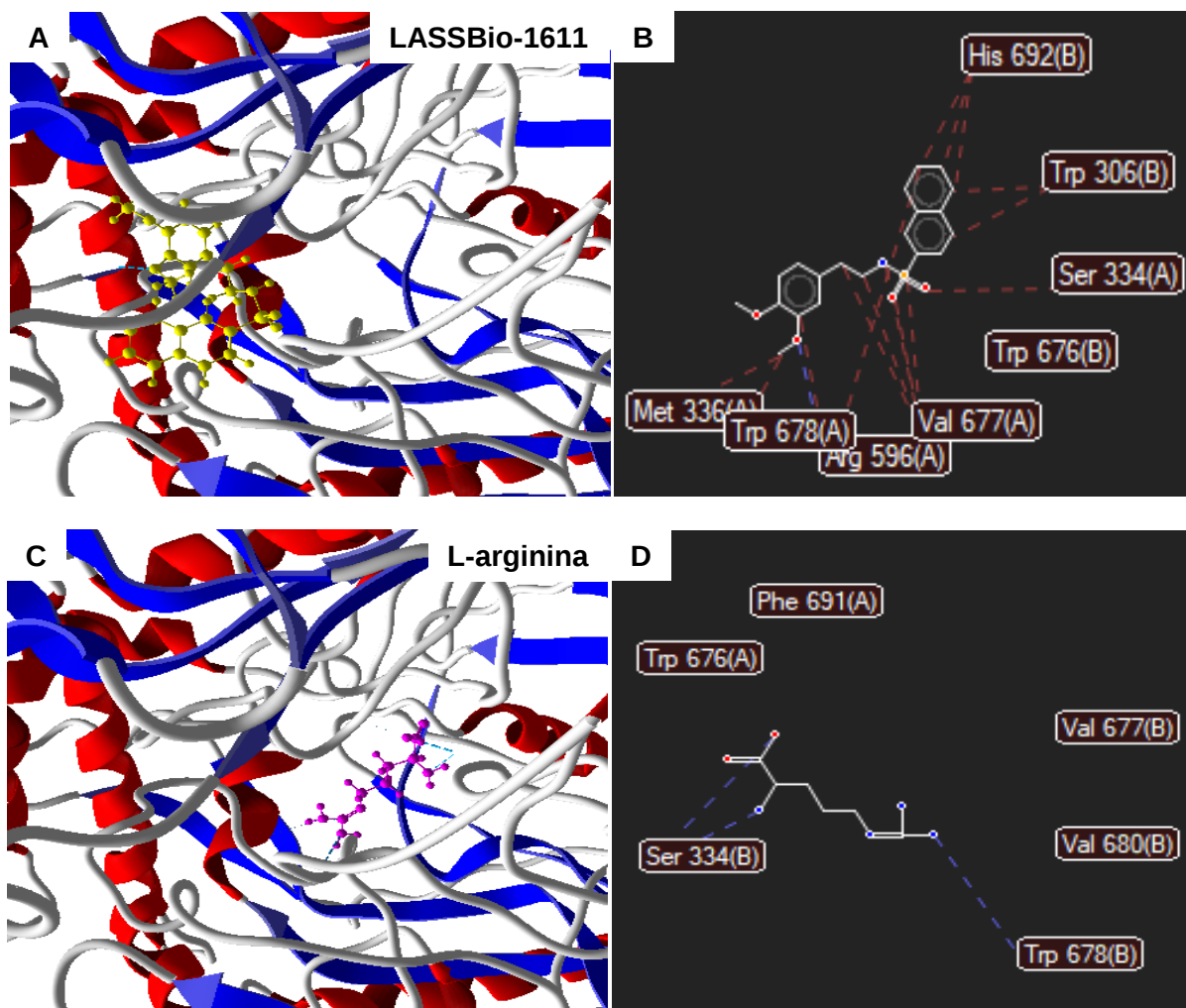
Figura 35 – Poses do *docking* molecular do LASSBio-1611 (amarelo) e da L-arginina (roxo) em condições de domínio de ligação com a NOS induzível (**A** e **C**) e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima (**B** e **D**), respectivamente.



Interações estéricas (linhas pontilhadas vermelhas); ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis); átomos de oxigênio (vermelhos); átomos de nitrogênio (azuis); átomo de enxofre (amarelo); Resíduos de aminoácidos: Pro = prolina; Ile = isoleucina; Glu = glutamato; Val = valina; Trp = triptofano; Ser = serina.

Fonte: Silva, 2019.

Figura 36 – Poses do *docking* molecular do LASSBio-1611 (amarelo) e da L-arginina (roxo) em condições de domínio de ligação com a NOS neuronal (**A** e **C**) e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima (**B** e **D**), respectivamente.



Interações estéricas (linhas pontilhadas vermelhas); ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis); átomos de oxigênio (vermelhos); átomos de nitrogênio (azuis); átomo de enxofre (amarelo); Resíduos de aminoácidos: His = histidina; Trp = triptofano; Ser = serina; Val = valina; Arg = arginina; Met = metionina; Phe = fenilalanina.

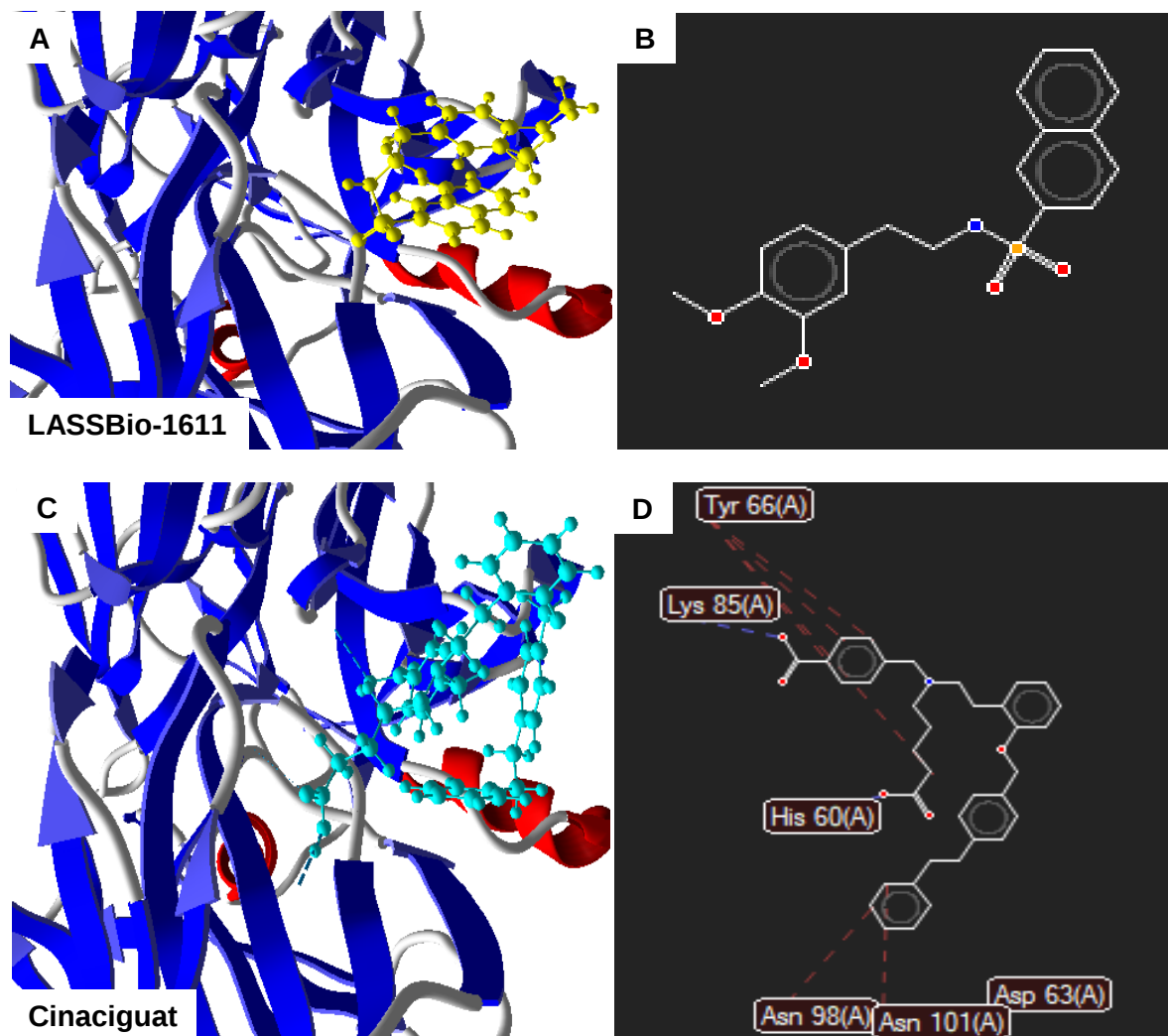
Fonte: Silva, 2019.

5.2.6.2 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou o cinaciguat e a ciclase de guanilil solúvel

A entalpia de formação entre o LASSBio-1611 e a sGC resultou em um ΔH_f de -45,28 kcal/mol, sendo bem maior do que a interação do cinaciguat ($\Delta H_f = -60,65$ kcal/mol), um ativador de sGC.

Com relação às interações, observou-se que não se formou nenhum tipo de interação entre o LASSBio-1611 e a sGC, na distância estabelecida pelo programa (Figura 37A e B). O mesmo não foi observado para o cinaciguat que apresentou ligações de hidrogênio entre átomos de oxigênio e os resíduos de aminoácidos lisina (Lys)^{85(A)} e His^{60(A)}. Além disso, observaram-se interações estéricas entre átomos de carbono, sendo quatro (um carbono do grupo 4-carboxibutil e três do grupo ácido benzoico) com a tirosina (Tyr)^{66(A)}; um com a asparagina (Asn)^{98(A)} e um com Asn^{101(A)}, ambos do grupo 2-feniletil, e interações de Van der Waals com o aspartato (Asp)^{63(A)} (Figura 37C e D).

Figura 37 – Poses do *docking* molecular do LASSBio-1611 (amarelo) e do cinaciguat (azul claro) em condições de domínio de ligação com a ciclase de guanilil solúvel (**A** e **C**) e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima (**B** e **D**), respectivamente.



Interações estéricas (linhas pontilhadas vermelhas); ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis); átomos de oxigênio (vermelhos); átomos de nitrogênio (azuis); átomo de enxofre (amarelo); Resíduos de aminoácidos: Tyr = tirosina; Lys = lisina; His = histidina; Asn = asparagina; Asp = aspartato.

Fonte: Silva, 2019.

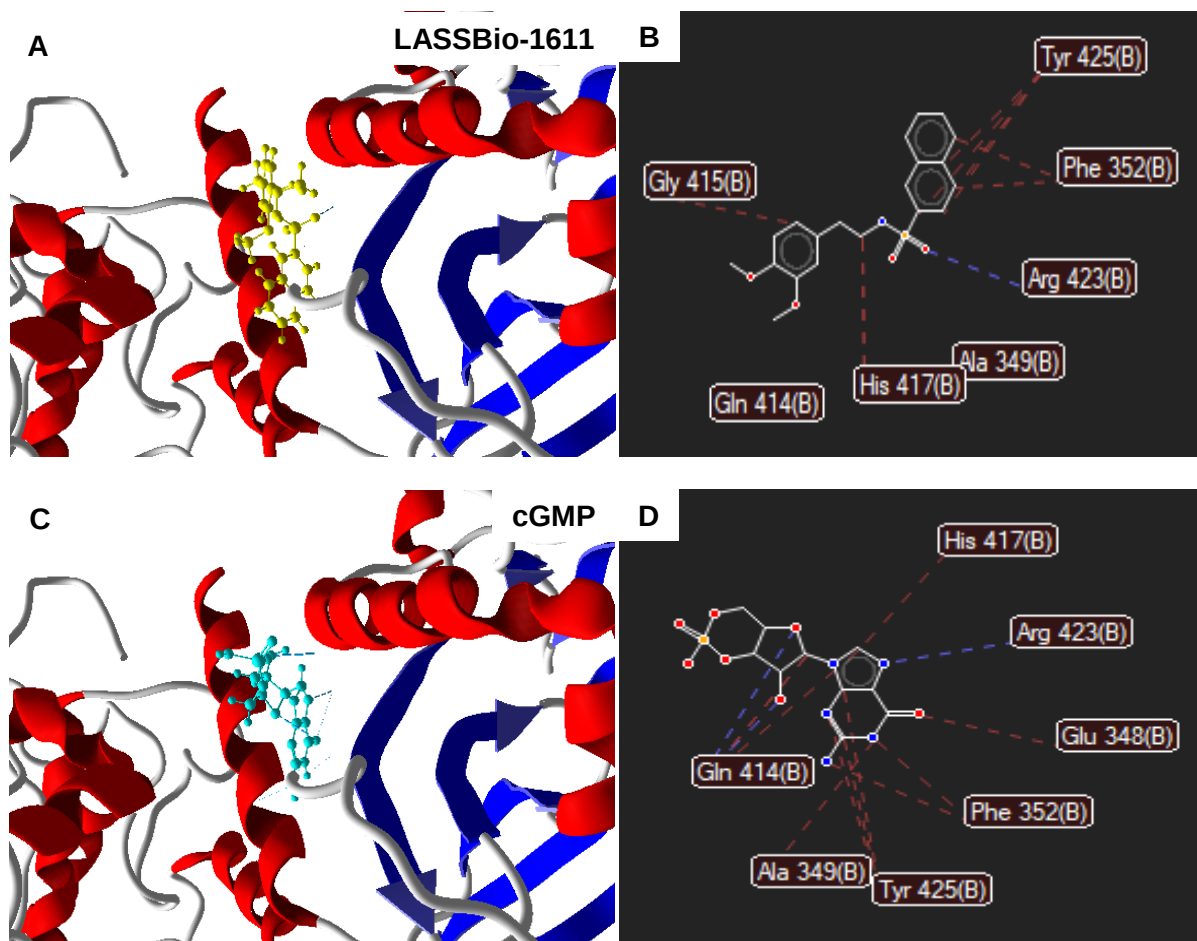
5.2.6.3 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou o cGMP e a proteína cinase G

O LASSBio-1611 apresentou uma ΔH_f de -114,21 kcal/mol e a PKG, sendo um pouco mais estável a formação desse complexo do que o complexo entre o cGMP (ΔH_f = -101,71 kcal/mol) e a PKG.

Além disso, o LASSBio-1611 apresentou interações do tipo ligação de hidrogênio (linha pontilhada azul) entre um átomo de oxigênio do grupo sulfonamida e o aminoácido Arg^{423(B)}; do tipo estéricas (linhas pontilhadas vermelhas) entre o carbono 6 do grupo 3,4-dimetoxifenetil e a Gly^{415(B)}, entre um carbono e a His^{417(B)} e entre carbonos do grupo naftila, sendo quatro com a Tyr^{425(B)} e dois com a Phe^{352(B)}. Adicionalmente, apresentou uma interação de Van der Waals com a Ala^{349(B)} (Figura 38A e B).

O cGMP mostrou interações estéricas entre átomos de carbono e aminoácidos da PKG, sendo um com a glutamina (Gln)^{414(B)}, dois com a Tyr^{425(B)} e um com His^{417(B)}; entre um átomo de oxigênio e a Glu^{348(B)} e entre quatro nitrogênios, sendo um com a Gln^{414(B)}, um com a Tyr^{425(B)} e dois com a Phe^{352(B)}. O cGMP também formou ligações de hidrogênio entre um nitrogênio e a Arg^{423(B)} e dois oxigênios e a Gln^{414(B)} (Figura 38C e D).

Figura 38 – Poses do *docking* molecular do LASSBio-1611 (amarelo) e do cGMP (azul claro) em condições de domínio de ligação com a proteína cinase G (**A** e **C**) e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima (**B** e **D**), respectivamente.



Interações estéricas (linhas pontilhadas vermelhas); ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis); átomos de oxigênio (vermelhos); átomos de nitrogênio (azuis); átomo de enxofre (amarelo); átomo de fósforo (laranja); Resíduos de aminoácidos: Tyr = tirosina; Phe = fenilalanina; Arg = arginina; Ala = alanina; Gln = glutamina; His = histidina; Gly = glicina; Glu = glutamato.

Fonte: Silva, 2019.

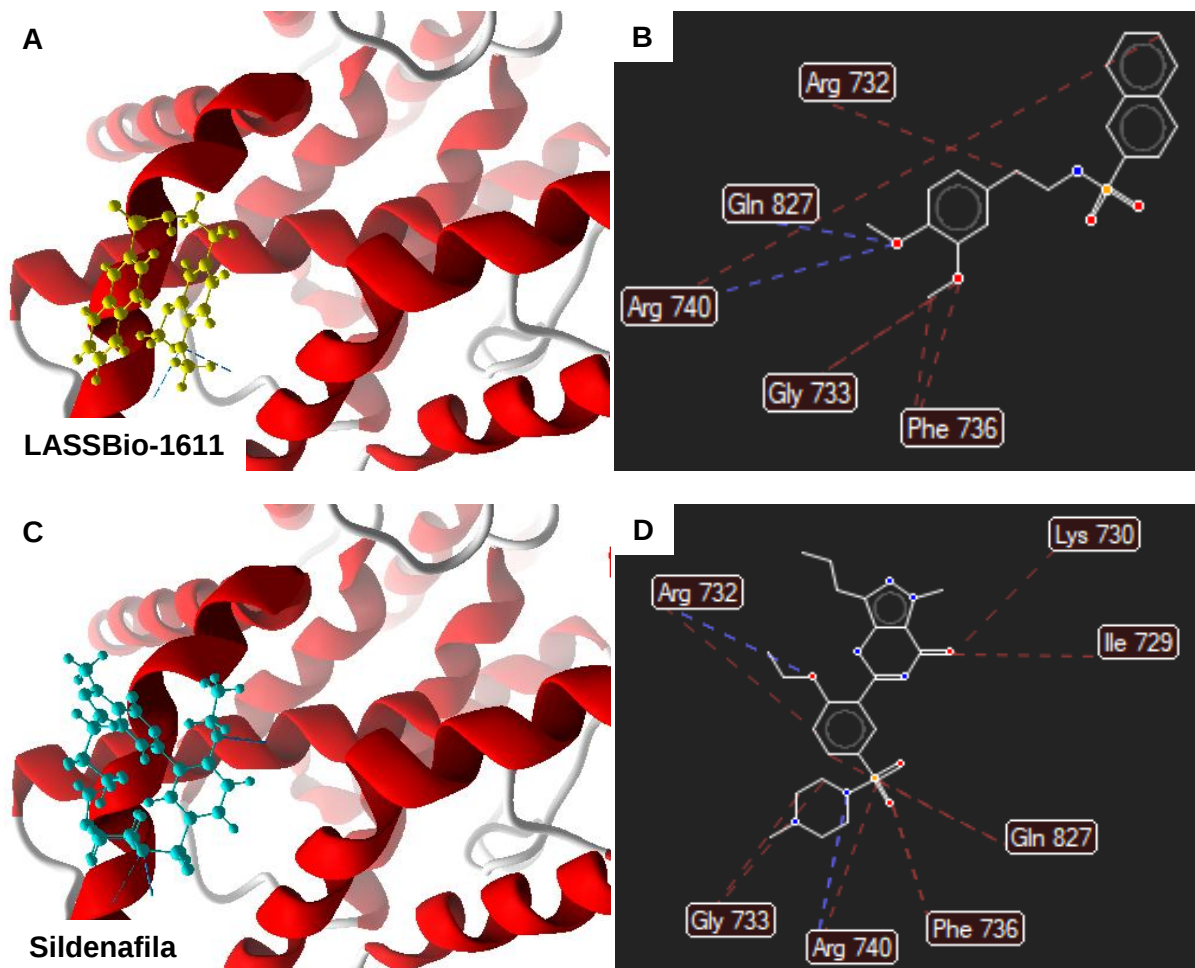
5.2.6.4 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou a sildenafil e a fosfodiesterase 5

A ΔH_f entre o LASSBio-1611 e a PDE5 foi -53,93 kcal/mol, um pouco maior do que a observada para a sildenafil ($\Delta H_f = -64,28$ kcal/mol), um inibidor seletivo de PDE5.

O LASSBio-1611 formou interações do tipo ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis) entre o oxigênio do grupo 4-metoxi e os aminoácidos Gln⁸²⁷ e Arg⁷⁴⁰ e do tipo estéricas (linhas pontilhadas vermelhas) entre o oxigênio do grupo 3-metoxi com a Phe⁷³⁶ e entre carbonos, sendo um do grupo 3-metoxi com a Gly⁷³³ e a Phe⁷³⁶, um do grupo naftila com a Arg⁷⁴⁰ e um com a Arg⁷³² (Figura 39A e B).

As interações da sildenafil também foram dos tipos ligações de hidrogênio e estéricas, sendo as primeiras entre um nitrogênio do grupo metilpiperazina e a Arg⁷⁴⁰ e outra entre o oxigênio do grupo etoxi e Arg⁷³². Já as interações estéricas foram entre átomos de carbono, sendo um com a Arg⁷³², dois com a Gly⁷³³ e um com Gln⁸²⁷; entre átomos de oxigênio, sendo um com a Phe⁷³⁶ e um com a Lys⁷³⁰ e Ile⁷²⁹ e entre o enxofre e os aminoácidos Gln⁸²⁷ e Arg⁷⁴⁰ (Figura 39C e D).

Figura 39 – Poses do *docking* molecular do LASSBio-1611 (amarelo) e da sildenafil (azul claro) em condições de domínio de ligação com a fosfodiesterase 5 (**A** e **C**) e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima (**B** e **D**), respectivamente.



Interações estéricas (linhas pontilhadas vermelhas); ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis); átomos de oxigênio (vermelhos); átomos de nitrogênio (azuis); átomo de enxofre (amarelo); Resíduos de aminoácidos: Arg = arginina; Ala = alanina; Gln = glutamina; Gly = glicina; Phe = fenilalanina; Ile = isoleucina; Lys = lisina.

Fonte: Silva, 2019.

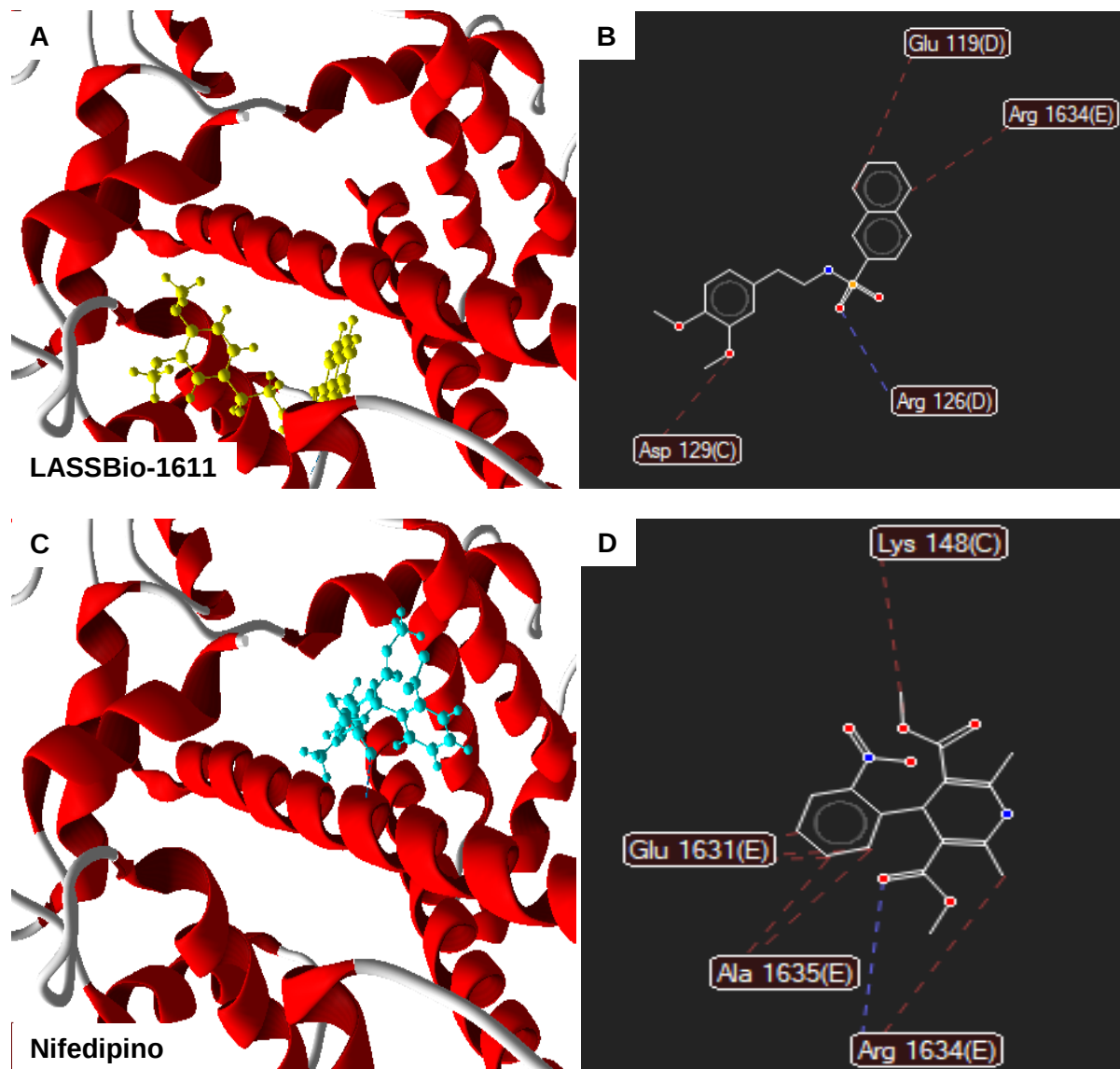
5.2.6.5 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou o nifedipino e o canal de cálcio dependente de voltagem do tipo 1.2

A ΔH_f entre o LASSBio-1611 e o $Ca_v1.2$ ($\Delta H_f = -101,17$ kcal/mol) foi menor do que a entalpia formada entre o nifedipino, um bloqueador de Ca_v , e o canal ($\Delta H_f = -94,25$ kcal/mol).

O LASSBio-1611 formou interações do tipo ligação de hidrogênio (linha pontilhada azul) entre um oxigênio do grupo sulfonamida e a Arg^{126(D)} e do tipo estéricas (linhas pontilhadas vermelhas) entre o oxigênio do grupo 3-metoxi com o Asp^{129(C)} e entre dois carbonos do grupo naftila com a Arg^{1634(E)} e com o Glu^{119(D)} (Figura 40A e B).

Já as interações estéricas (linhas pontilhadas vermelhas) do nifedipino foram entre carbonos, sendo um com a Lys^{148(C)}, um com a Arg^{1634(E)}, dois com a Ala^{1635(E)} e três com o Glu^{1631(E)}. o nifedipino também formou ligação de hidrogênio (linha pontilhada azul) entre um oxigênio e a Arg^{1634(E)} (Figura 40C e D).

Figura 40 – Poses do *docking* molecular do LASSBio-1611 (amarelo) e do nifedipino (azul claro) em condições de domínio de ligação e o canal de cálcio dependente de voltagem do tipo 1.2 (**A** e **C**) e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do canal (**B** e **D**), respectivamente.



Interações estéricas (linhas pontilhadas vermelhas); ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis); átomos de oxigênio (vermelhos); átomos de nitrogênio (azuis); átomo de enxofre (amarelo); Resíduos de aminoácidos: Glu = glutamato; Arg = arginina; Ala = alanina; Asp = aspartato; Lys = lisina.

Fonte: Silva, 2019.

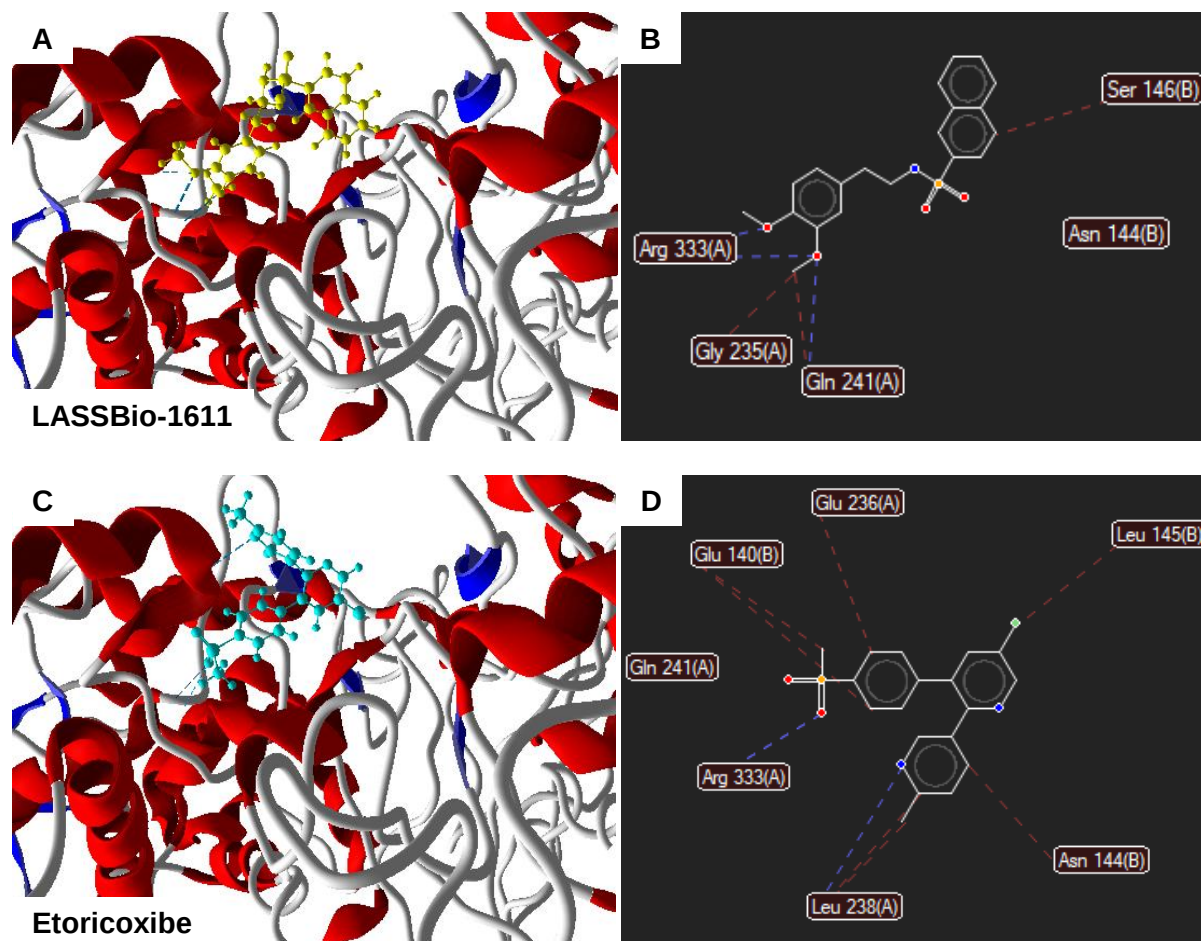
5.2.6.6 Avaliação da interação molecular entre o LASSBio-1611 e/ou o etoricoxibe e a ciclo-oxigenase-2

A ΔH_f do complexo ligante-macromolécula entre o LASSBio-1611 e a COX-2 foi de -114,94 kcal/mol, sendo um pouco menor do que a ΔH_f para a interação da enzima com o etoricoxibe ($\Delta H_f = -109,63$ kcal/mol), um inibidor seletivo de COX-2.

As interações formadas pelo LASSBio-1611 foram do tipo ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis) entre os oxigênios dos grupos 3- e 4-metoxi com a Arg^{333(A)} e do grupo 3-metoxi com a Gln^{241(A)}; do tipo estéricas entre o carbono do grupo 3-metoxi com a Gly^{235(A)} e a Gln^{241(A)} e um carbono do grupo naftila com a Ser^{146(B)} e do tipo Van der Waals com o aminoácido Asn^{144(B)} (Figura 41A e B).

Em relação ao etoricoxibe, as interações também foram do mesmo tipo, sendo as ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis) entre um oxigênio e a Arg^{333(A)} e um nitrogênio e a Leu^{238(A)}. As interações estéricas ocorreram entre átomos de carbono, sendo um com o Glu^{236(A)}, dois com o Glu^{140(B)}, dois com a Leu^{238(A)} e um com a Asn^{144(B)} e entre o cloro e a Leu^{145(B)}. Também se observou uma interação de Van der Waals com a Gln^{241(A)} (Figura 41C e D).

Figura 41 – Poses do *docking* molecular do LASSBio-1611 (amarelo) e do etoricoxibe (azul claro) em condições de domínio de ligação com a ciclo-oxigenase-2 (**A** e **C**) e mapas de ligação representando as interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da enzima (**B** e **D**), respectivamente.



Interações estéricas (linhas pontilhadas vermelhas); ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis); átomos de oxigênio (vermelhos); átomos de nitrogênio (azuis); átomo de enxofre (amarelo); átomo de cloro (verde); Resíduos de aminoácidos: Ser = serina; Glu = glutamato; Asn = asparagina; Arg = arginina; Gly = glicina; Gln = glutamina; Leu = leucina.

Fonte: Silva, 2019.

5.2.7 Análise teórica, calculada *in silico*, de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos para o LASSBio-1611

As propriedades físico-químicas do LASSBio-1611 foram calculadas de acordo com a massa molecular de 371,45 g/mol, apresentando um coeficiente de partição (logP) de 3,42 e mesmos valores de coeficientes de dissociação, mimetizando tanto o duodeno (logD_{4,6}) como o plasma (logD_{7,4}). Além disso, esse LASSBio se apresentou como um ácido fraco (pKa = 11,1 ± 0,4) e de baixíssima solubilidade em água (0,004 mg/mL) (Tabela 17).

Paralelamente, foram calculadas as propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) e o LASSBio-1611 apresentou uma predição de alta permeação (Caco-2 = 241 x 10⁻⁶ cm/s), elevada ligação as proteínas plasmáticas (PPB = 99%) e baixo volume de distribuição (Vd = 2,0 L/kg). Adicionalmente, o LASSBio-1611 apresentou moderada biodisponibilidade oral (F_{oral} = 64%), fraca penetração ao SNC (escore_{SNC} = -3,17) e sem efeito mutagênico, de acordo com o ensaio *Salmonella*/microsoma (ensaio de AMES) de 0,29. Em contrapartida, a estabilidade metabólica microssomal (*human liver microsome* – HLM) indicou indefinição (HLM = 0,55). Além disso, também não foi possível predizer a capacidade do LASSBio-1611 em inibir o gene *hERG*, que codifica um subtipo de canal de potássio, responsável por controlar a atividade elétrica do coração, uma vez que o valor de escore ficou na faixa de indefinição (escore = 0,42), não podendo definir o poder cardiotóxico (Tabela 18).

Tabela 17 – Propriedades físico-químicas, calculadas *in silico*, para o LASSBio-1611.

Composto	Propriedades físico-químicas					
	PM (g/mol)	logP	logD _{4,6}	logD _{7,4}	pKa	Solubilidade (mg/mL)
LASSBio-1611	371,45	3,42	3,42	3,42	11,1 ± 0,4	0,004

PM = peso molecular; logP = coeficiente de partição; logP_{4,6} = coeficiente de dissociação no duodeno; logP_{7,4} = coeficiente de dissociação no plasma; pKa = constante de ionização.

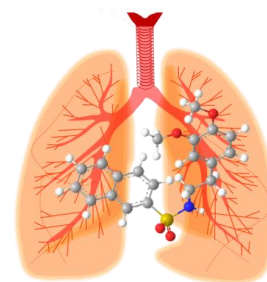
Fonte: Silva, 2019.

Tabela 18 – Propriedades farmacocinéticas, calculadas *in silico*, para o LASSBio-1611.

Composto	Propriedades farmacocinéticas							
	Caco-2 (cm/s)	PPB (%)	Vd (L/kg)	F _{oral} (%)	SNC	AMES	HLM	hERG
LASSBio-1611	241 x 10 ⁻⁶	99	2,0	64	-3,17	0,29	0,55	0,42

Caco-2 = células de adenocarcinoma de cólon humano; PPB = ligação a proteínas plasmáticas; Vd = volume de distribuição; F_{oral} = biodisponibilidade oral; SNC = capacidade de penetração ao sistema nervoso central; AMES = ensaio mutagênico *Salmonella*/microssoma; HLM = estabilidade metabólica microssomal; hERG = gene que codifica um subtipo de canal de potássio no coração.

Fonte: Silva, 2019.



6 Discussão

Neste estudo, investigou-se e se comparou a atividade relaxante do LASSBio-448, um inibidor de PDE4 e análogo do rolipram, e de seus derivados *N*-metilssulfonamídicos (LASSBios-1630, -1610, -1631, -1628, -1612 e -1623) e sulfonamídicos (LASSBios-1622, -1613, -1722, -1629, -1625 e -1611) em traqueia isolada de cobaia dos GC e GIPAC. De maneira geral, todos os compostos apresentaram efeito relaxante, tanto no GC como no GIPAC, sendo o LASSBio-1611 o mais potente, na ausência de epitélio funcional nos dois modelos quando comparado ao LASSBio-448. Dessa forma, demonstra-se pela primeira vez, que o LASSBio-1611 modula positivamente as vias NOS/sGC/PKG e COXs e negativamente a PDE5 e os Ca_v , levando ao relaxamento do músculo liso traqueal em cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional.

Os inibidores seletivos de PDE4 vêm sendo estudados ao longo dos anos como uma alternativa não esteroide, mas com foco anti-inflamatório e broncodilatador para o tratamento da asma. Essa busca por novos medicamentos para tratar essa doença se torna relevante, uma vez que, o seu tratamento ainda não é curativo e apresenta diversos efeitos colaterais/adversos como aqueles apresentados pelos inibidores não seletivos de PDE e pelos glicocorticoides (MOGHADAM-KIA; WERTH, 2010; BEGHÈ; RABE; FABBRI, 2013; KAWAMATAWONG, 2017).

Na constante busca por novos inibidores de PDE4, bem como por uma molécula com efeitos colaterais/adversos reduzidos e/ou múltiplos alvos de ação para o tratamento de doenças crônicas multifatoriais, o LASSBio®/UFRJ planejou e sintetizou, a partir do LASSBio-448, uma série de 12 compostos. Nas etapas de síntese dessa série de derivados sulfonamídicos foram utilizadas aminas secundárias e primárias, gerando duas subséries: a dos derivados *N*-metilssulfonamídicos (metilados no nitrogênio da função sulfonamida) e a dos

sulfonamídicos (H no nitrogênio da função sulfonamida), respectivamente (NUNES, 2013).

Com essa perspectiva, nos últimos anos, o nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos com derivados do LASSBio-448, na tentativa de descobrir uma molécula com potencial ação antiasmática. Recentemente, Medeiros (2015) e Martins (2016) evidenciaram o efeito relaxante do LASSBio-448 e de alguns de seus derivados *N*-sulfonilidrazônicos (LASSBios-1824, -1832, -1846, -1847, -1848, -1849, -1850 e -1851) em traqueia de cobaia não asmático e com asma alérgica, sendo o LASSBio-1847 o derivado mais potente, com mecanismo de ação por modulação positiva da via AC/PKA/cAMP e por inibição de PDEs (MARTINS, 2016).

Diante do exposto e considerando que não há dados na literatura sobre efeito relaxante do LASSBio-448 em traqueia de cobaia com IPAC, modelo recentemente implantado em nosso laboratório (VASCONCELOS et al., 2019), decidiu-se, inicialmente, investigar esse possível efeito e comparar com o efeito relaxante observado por Martins (2016) em traqueia isolada de cobaia controle.

De fato, observou-se que o LASSBio-448 relaxou a traqueia isolada de cobaia com IPAC pré-contraída com CCh, independente de epitélio funcional, sugerindo que esse efeito não é mediado pela liberação de fatores relaxantes derivados do epitélio (Figura 14 e Gráfico 1). Ao comparar os valores de pCE_{50} com aqueles observados por Martins (2016) no grupo GC, observou-se que o LASSBio-448 foi mais eficaz no GIPAC do que no GC, na presença de epitélio funcional e 3,8 vezes mais potente em relaxar a traqueia de cobaia no GIPAC do que no GC, na ausência de epitélio funcional, sugerindo que o alvo para ação desse composto pode estar mais expresso no músculo liso do GIPAC.

Sabendo-se do efeito relaxante do LASSBio-448, prosseguiu-se com a investigação do possível efeito relaxante de cada subsérie derivada dessa molécula. Para tanto, utilizou-se um modelo de músculo liso traqueal de cobaia controle e com IPAC e se comparou as eficácias e as potências relaxantes com o observado para o LASSBio-448.

Inicialmente, observou-se que, de maneira geral, todos os LASSBios tanto os *N*-metilssulfonamídicos como os sulfonamídicos relaxaram a traqueia do GC e do GIPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional (Figuras 15-26 e Gráficos 2-13).

Analizando os resultados da subsérie *N*-metilssulfonamídica, observou-se que o LASSBio-1631 foi menos potente do que o protótipo em relaxar a traqueia de cobaia com IPAC, na presença e na ausência de epitélio (Gráfico 15 e APÊNDICE B), sugerindo que a inserção do substituinte 1-bifenila ligado a função sulfonamida desfavorece esse efeito relaxante, possivelmente devido a sua alta hidrofobicidade. Já para o LASSBio-1610, a inserção do grupo 3,4-dimetoxifenila, mimetizando duas unidades farmacofóricas no derivado, aumentou sua potência em relação ao LASSBio-448, apenas na ausência de epitélio no GC (Gráfico 14B e APÊNDICE A). Assim como o LASSBio-1610, os LASSBios-1628 e -1623 foram mais potentes em relaxar a traqueia do que o LASSBio-448, só que sendo na presença de epitélio do GC e na ausência de epitélio funcional, tanto do GC como do GIPAC (Gráficos 14A e 15; APÊNDICES A e B). Mais uma vez, sugere-se que o aumento da potência relaxante esteja relacionado à mudança estrutural das moléculas, onde a substituição do grupo metilenodioxila do LASSBio-448 pelos substituintes *para*-metoxila e *orto*-metila (grupos doadores de elétrons) nos LASSBios-1628 e -1623, respectivamente, favorece esse aumento de potência.

Com relação aos derivados da subsérie sulfonamídica, observou-se que no GC, os LASSBios-1625, -1613 e -1611 foram mais potentes em relaxar a traqueia isolada de cobaia pré-contráida por CCh do que o LASSBio-448, tanto na presença como na ausência de epitélio funcional. Resultados semelhantes foram observados no GIPAC, onde esses três derivados foram mais potentes em traqueia com epitélio e em traqueia sem epitélio, apenas os LASSBios-1613 e -1611 foram mais potentes do que o protótipo das subséries (Gráficos 14 e 15; Tabelas 13 e 14). Assim como para os LASSBios-1628 e -1623, os substituintes *para*-metoxila e *orto*-metila (grupos doadores de elétrons) também aumentaram a potência relaxante dos LASSBios-1625 e -1613, respectivamente, provavelmente devido ao aumento da densidade eletrônica no sistema aromático e da lipofilicidade. Já para o LASSBio-1611, o substituinte 1-naftila aumentou essa potência relaxante, possivelmente devido a alta lipofilicidade desse grupo, o que pode aumentar a capacidade da molécula atravessar a membrana celular.

Dessa maneira, o LASSBio-1611 foi o derivado que apresentou a maior potência, em traqueia sem epitélio tanto no GC como no GIPAC, em relação ao LASSBio-448. Sendo assim, decidiu-se dar continuidade a esse estudo com o LASSBio-1611, objetivando elucidar o seu mecanismo de ação relaxante em

traqueia sem epitélio e, apenas no modelo com IPAC, uma vez que, não se evidenciou diferenças entre o GC e o GIPAC, bem como visando atender ao princípio dos 3Rs (*Reduction, Refinement and Replacement*), que no Brasil são traduzidos como Redução, Refinamento e Substituição ao uso de animais na pesquisa e/ou no ensino (BRASIL, 2016).

Apesar do LASSBio-1611 ter sido desenhado com base em um inibidor de PDE4, ao realizar um teste bioquímico de inibição enzimática para essa isoforma humana, observou-se que o mesmo foi praticamente inativo na concentração de 10 μ M. Já na concentração de 100 μ M apresentou pouca ou nenhuma melhora da atividade inibitória em relação ao LASSBio-448 e essa ação foi bastante reduzida quando comparada ao padrão rolipram, ambos inibidores de PDE4 (NUNES, 2013; SOUZA, 2015). Então de acordo com esses dados e com os resultados observados em nossos experimentos, decidiu-se direcionar este estudo para a investigação de outros alvos potenciais nas vias de sinalização celular que levam ao relaxamento em traqueia de cobaia.

Fisiologicamente, a traqueia é revestida na parte luminal pelo epitélio, que é considerado uma barreira física, de permeabilidade e imunológica, que regula respostas a diversos agentes fisiológicos e patológicos do músculo liso das vias aéreas (GANESAN; COMSTOCK; SAJJAN, 2013; BRUNE et al., 2015). Alguns estudos apontam que sua remoção mecânica pode aumentar a responsividade da traqueia a vários agentes contráteis como a histamina, os leucotrienos, as endotelinas e a ACh, assim como a agentes relaxantes, a exemplo da isoprenalina e do nitroprussiato de sódio (AKBAR; SHARMA, 1992; SHIKADA; TANAKA, 1995; FEDAN; VAN SCOTT; JOHNSTON, 2001; AL-AYED, 2018).

Nas vias aéreas, a inervação parassimpática representa uma importante via broncoconstritora e tem como neurotransmissor a ACh, cujos efeitos são mediados por receptores metabotrópicos dos subtipos M_2 e M_3 , sendo a contração desencadeada, primariamente, pelos receptores M_3 , mesmo naqueles músculos lisos em que a proporção de $M_2:M_3$ é de 90:10. Em traqueia de cobaia essa proporção é praticamente igual para ambos os receptores (50-60% de M_2) e pode variar dependendo da idade do animal, quanto mais jovem, maior a população de receptor M_2 . Em modelos de inflamação das vias aéreas e na asma, ocorre uma disfunção dos receptores M_2 , o que contribui para a liberação elevada da ACh pelo nervo vago, para o aumento da atividade reflexa colinérgica em resposta à inalação

de agentes estimulantes e para a hiper-responsividade (EGLEN; HEGDE; WATSON, 1996; BARNES, 1998; MEURS; GOSENS; ZAAGSMA, 2008).

Sabendo-se da importância da via muscarínica na contração das vias aéreas, decidiu-se avaliar a participação dos receptores muscarínicos no efeito relaxante do LASSBio-1611. Para tanto, foram realizadas curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh na ausência e na presença de diferentes concentrações do LASSBio-1611. O fato da curva-controle do CCh ter sido deslocada para a direita, com uma redução no E_{max} de 20 e 28%, apenas nas concentrações mais altas, sugere-se que o LASSBio-1611 estaria inibindo os receptores M_3 , mas não por antagonismo competitivo, podendo estar modulando outro passo da via de sinalização contrátil do CCh (Figura 27, Gráfico 16 e Tabela 13).

Em músculo liso das vias aéreas, o principal mediador broncodilatador liberado pela inervação NANC é o NO formado a partir da ativação nNOS, podendo também ser formado por eNOS e iNOS. Além do sistema NANC, o NO pode ser produzido por diversas células, entre elas, epiteliais, endoteliais vasculares e inflamatórias, dependendo da isoforma e da localização da NOS. No trato respiratório, existem as três isoformas de NOS, sendo a eNOS localizada no epitélio dos brônquios, dos alvéolos e da traqueia; a iNOS localizada em macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais vasculares e epiteliais das vias aéreas; e a nNOS encontrada em nervos que inervam a lâmina própria, os vasos e o músculo liso das vias aéreas de humanos e de animais como o cobaia (HAMAD et al., 2003; RICCIARDOLO, 2003; RICCIARDOLO et al., 2004; ANTOSOVA et al., 2017).

Em sendo o NO um importante mediador da broncodilatação nas vias aéreas, decidiu-se avaliar sua participação no efeito relaxante do LASSBio-1611 e se verificou que a curva-controle de relaxamento foi desviada para a direita na presença de L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS (BOER et al., 1996), diminuindo a potência relaxante do LASSBio-1611 em cerca de 170 vezes (Figura 28 e Gráfico 17). Esses dados sugerem uma hipótese de que o LASSBio-1611 modula positivamente a NOS para promover relaxamento em traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio.

Com a premissa de que o NO causa broncodilatação, espera-se que a inibição da NOS aumente a reatividade contrátil ou diminua a reatividade relaxante do músculo liso. Condizente com o exposto, Boer et al. (1996) demonstraram que a

deficiência de NO contribui para a hiper-reatividade precoce das vias aéreas em cobaias desafiados com OVA. Além disso, estudos observaram que o pré-tratamento com L-NAME aumentou a reatividade contrátil à histamina, bem como diminuiu o relaxamento induzido por estimulação elétrica sobre a contração tônica com CCh em traqueia de cobaia sensibilizado com OVA. Nesse último caso, também se observou que a inibição do relaxamento foi revertida na presença de L-arginina, um substrato para a NOS (PARLAK et al., 2012; ANTOŠOVÁ et al., 2014).

O aminoácido L-arginina é o único substrato para as isoformas de NOS, que promovem uma reação catalítica de oxidação, formando NO e L-citrulina. O L-NAME é considerado um falso substrato das NOS, dessa forma não sofre catálise e atua por um mecanismo de competição pelo sítio de ligação da L-arginina, inibindo a enzima (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; ANTOSOVA et al., 2017). É relatado que a formação de ONOO^- pode ocorrer durante a produção simultânea de NO e de O_2^- pela iNOS e isso é possível, devido a baixa disponibilidade de L-arginina. Uma vez aumentada a concentração desse substrato, aumenta-se a produção de NO, reduzindo-se a geração tanto de O_2^- como de ONOO^- e, dessa forma, aumenta-se a reatividade relaxante nas vias aéreas (MAARSINGH et al., 2009).

Diante dos achados e com o intuito de verificar a reversibilidade do efeito inibitório do L-NAME, bem como de comprovar a participação da NOS no efeito relaxante do LASSBio-1611, decidiu-se aumentar a oferta de substrato para a NOS na presença de L-NAME. Se o LASSBio-1611 estivesse modulando positivamente a NOS para promover o relaxamento em traqueia de cobaia com IPAC, a L-arginina deveria reverter o efeito inibitório do L-NAME e, sendo assim, a curva concentração-resposta na presença simultânea de L-arginina e de L-NAME deveria ser sobreposta a curva-controle (Adaptado de SCHLEMPER; CALIXTO, 1994). De fato, foi o que aconteceu, a L-arginina reverteu o efeito inibitório do L-NAME sobre o efeito relaxante do LASSBio-1611 (Figura 28 e Gráfico 17), confirmando que o mecanismo de ação do LASSBio-1611 envolve a ativação da NOS.

Pelo estudo do *docking* molecular foi possível observar a interação do LASSBio-1611 com o sítio ativo tanto da iNOS como da nNOS, sendo que para a nNOS, o número de interações foi bem maior do que para a iNOS, isso pode ter proporcionado uma maior estabilidade, resultando em uma menor entalpia para a formação do complexo com a nNOS. Além disso, observou-se que as entalpias de

formação dos complexos LASSBio-1611-iNOS e LASSBio-1611-nNOS foram bem menores do que as observadas para os complexos L-arginina-iNOS e L-arginina-nNOS, sendo as diferenças de entalpia de 24,6 e de 35,42 kcal/mol, respectivamente (Figuras 35 e 36). Quando se compara a interação entre um determinado alvo biológico e diferentes moléculas e se observa uma menor entalpia de formação do complexo para uma das moléculas, essa, teoricamente, apresentará melhor atividade biológica (BARROS, 2015), desse modo, sugere-se que o LASSBio-1611 estaria ativando as duas isoformas de NOS, sendo mais seletivo para a nNOS.

De acordo com o *docking*, com a localização das isoformas das NOS nas vias aéreas e utilizando um modelo de IPAC com remoção do epitélio da traqueia, pode-se sugerir que o LASSBio-1611 estaria ativando a nNOS, uma vez que está localizada na inervação nitrérgica do músculo liso, dessa forma, contribuiria mais para o relaxamento desse músculo. No entanto, o LASSBio também poderia estar ativando a iNOS, já que o modelo em estudo possui um componente inflamatório, descartando, em parte, a eNOS, cuja localização é no epitélio. Contudo, como o efeito relaxante do LASSBio-1611 não foi completamente abolido na presença de L-NAME, sugere-se que o derivado pode estar agindo em um passo *dowstream* dessa via de relaxamento ou até mesmo atuando em outro(a)s sítios/vias de sinalização para relaxar a traqueia de cobaia com IPAC, na ausência epitélio.

O NO, uma vez formado, tem como um dos seus mecanismos ativar o receptor sGC, que catalisa a formação de cGMP a partir do GTP e no músculo liso das vias aéreas, o aumento de cGMP culmina em relaxamento (ARNOLD et al., 1977; STONE; MARLETTA, 1994; ELLIS, 1997; LUCAS et al., 2000). A sGC é uma enzima citosólica e medeia funções como inibição da agregação plaquetária, bem como transdução de sinais em neurônios, imunomodulação e relaxamento do músculo liso (COLLIER; VALLANCE, 1989).

Estudos demonstraram que a exposição à fumaça de cigarro diminui a expressão de sGC, causando broncoconstrição em camundongo, assim como a estimulação dessa enzima previne o estresse oxidativo e a inflamação pulmonar em um modelo de DPOC em cobaia. Além disso, também há relatos de que a ativação de sGC pelo NO reduz a reatividade contrátil ao CCh em traqueia de rato, bem como a atenuação e/ou abolição do relaxamento de um doador de NO em brônquio

humano e em traqueia de cobaia na presença de ODQ (ELLIS, 1997; GLAZA et al., 2011; GLYNOS et al., 2013; PAUL et al., 2018).

Uma vez que, comprovou-se a participação da NOS no efeito relaxante do LASSBio-1611 em traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio e, sabendo-se que a formação de NO ativa a sGC, nos questionamos se esse derivado estaria modulando positivamente a atividade dessa enzima. Para investigar essa hipótese, utilizou-se o ODQ, um inibidor de sGC (HWANG; WU; TENG, 1998), e se observou que a potência relaxante do derivado foi reduzida em aproximadamente 155 vezes quando a enzima foi inibida (Figura 29 e Gráfico 18), sugerindo o envolvimento da sGC/cGMP no efeito relaxante do LASSBio-1611.

No entanto, o envolvimento da sGC pode ser por ativação indireta, a partir da ativação da NOS e formação do NO, uma vez que, no *docking* molecular foi observado que a entalpia de formação do complexo LASSBio-1611-sGC foi maior em 15,37 kcal/mol do que para o complexo formado entre o cinaciguat-sGC, um ativador de sGC, e a enzima. Além disso, não se observou nenhum tipo de interação, seja estérica, por ligação de hidrogênio ou de Van der Waals entre o alvo biológico e o LASSBio (Figura 37).

Um aumento de cGMP em decorrência da ativação sGC leva a ativação de algumas proteínas, a exemplo de PDEs, de canais iônicos e da PKG. Essa proteína cinase, uma vez ativada, fosforila ativando e/ou inibindo diversos alvos para relaxar o músculo liso vascular e das vias aéreas (MURAD, 1994; MULLERSHAUSEN et al., 2006; WAGENAAR; HIEMSTRA; GOSENS, 2015). Entre os alvos ativados por essa proteína cinase estão SERCA, PMCA, MLCP, NCX e canais de potássio, a exemplo do BK_{Ca}, enquanto entre os inibidos estão IP₃R, MLCK e Ca_v (REMBOLD, 1992; REMBOLD, 1996; CARVAJAL et al., 2000; WOODRUM; BROPHY, 2001; PEREZ-ZOGHBI; BAI; SANDERSON, 2010).

Evidenciando-se a participação da via NOS/sGC como parte do mecanismo de ação do LASSBio-1611 em traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio, hipotetizou-se que o próximo passo da via, a PKG, poderia também ser alvo desse derivado. Para comprovar ou descartar essa hipótese, foram realizados experimentos utilizando o Rp-8-Br-PET-cGMPS, um inibidor de PKG (LI et al., 2001). Os resultados demonstraram que a potência relaxante do LASSBio-1611 foi atenuada em cerca de 195 vezes na presença desse inibidor (Figura 30 e Gráfico 19). Sendo assim, infere-se que, em nível funcional, esse LASSBio ativaria a

PKG, ainda que indiretamente, para assim, relaxar a traqueia de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio.

No entanto, pelo estudo do *docking* molecular, essa ativação pode ser diretamente pelo LASSBio-1611, pois a entalpia de formação com a PKG foi menor em 12,5 kcal/mol do que aquela observada quando se usou o ligante cGMP, o que promoveria uma maior estabilidade do complexo LASSBio-1611-PKG, consequentemente, a ativação da proteína cinase (Figura 38).

Analizando o efeito relaxante do LASSBio-1611 sobre a via NOS/sGC/PKG, observou-se que sua potência foi atenuada na presença dos inibidores de NOS, de sGC e de PKG com a mesma magnitude, assim como ao aumentar a oferta de substrato para a NOS com L-arginina, constatou-se a reversão da inibição do L-NAME sobre o efeito relaxante do LASSBio (Tabela 14). Esses resultados são sugestivos de que o LASSBio-1611 estaria, majoritariamente, ativando a NOS e, como já relatado anteriormente, essa enzima quando ativada, produz NO, que por sua vez, ativa a sGC, aumentando os níveis de cGMP e ativando a PKG que fosforila diversos alvos para promover relaxamento do músculo liso das vias aéreas.

Há poucos estudos na literatura em relação ao efeito de derivados sulfonamídicos sobre a via de sinalização do NO. Em revisão, Carradori et al. (2015) chamaram a atenção para derivados sulfonamídicos com potencial doador de NO e inibição da anidrase carbônica como uma abordagem farmacológica dupla para tratar glaucoma, câncer e osteoporose. Assim como derivados sulfonamídicos com propriedades doadoras de NO, também já foram relatados por possuírem atividades analgésicas e anti-inflamatórias e um derivado arilsulfonamida, o LASSBio-596, que teve seu efeito gastroprotetor reduzido na presença de L-NAME e 1400W, inibidores não seletivo da NOS e seletivo da iNOS, respectivamente (DOS SANTOS et al., 2010; SOUSA, 2018).

As concentrações de nucleotídeos cíclicos são reguladas pelas PDEs, uma classe de enzimas que, dependendo da especificidade do substrato, hidrolisa cAMP, cGMP ou ambos os nucleotídeos (KODIMUTHALI; JABARIS; PAL, 2008; FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011). Com base nisso e em dados da literatura, relata-se que a potência relaxante de substâncias com a capacidade de aumentar a concentração intracelular desses segundos mensageiros, geralmente, é aumentada com a inibição das PDEs em músculo liso. É o caso dos derivados sulfonilidrazônicos, LASSBios-1846 e -1847 em traqueia de cobaia (MARTINS, 2016).

Nas vias aéreas, além da PDE4, também é relatada a presença das PDEs 1, 3, 5 e 7, sendo a PDE5 a única responsável por hidrolisar cGMP, além de exercer um papel central no controle da regulação do tônus do músculo liso pelo NO, pelo peptídio natriurético atrial e por outros vasodilatadores endógenos (HALPIN, 2008). Em um modelo pulmonar, o relaxamento induzido por NO nas vias aéreas foi aumentado por inibidores seletivos de PDE5, bem como o relaxamento de doadores de NO tiveram suas potências aumentadas na presença da sildenafil em traqueia de rato (LUGNIER, 2006; PEREZ-ZOGHBI; BAI; SANDERSON, 2010; SOUSA et al., 2011; MOKRY et al., 2018).

Uma vez demonstrado a ação do LASSBio-1611 sobre a via NOS/SGC/PKG e sabendo-se que a ativação dessa via leva ao aumento de cGMP, decidiu-se avaliar se esse nucleotídeo seria aumentado pelo LASSBio. Uma maneira de verificar isso indiretamente, em nível funcional, é utilizando um inibidor de PDE5 como a sildenafil (LUGNIER, 2006; RODRÍGUEZ-RAMOS; GONZÁLEZ-ANDRADE; NAVARRETE, 2011). Para tanto, realizou-se um experimento em que o LASSBio-1611 era pré-incubado, posteriormente, a traqueia era contraída e sobre o componente tônico da contração, a sildenafil era adicionada de maneira cumulativa. Se a hipótese fosse verdadeira, esperaria-se uma potencialização do efeito relaxante desse inibidor seletivo de PDE5 na presença do LASSBio-1611. De fato, observou-se que a potência relaxante da sildenafil foi aumentada em aproximadamente 2,8 vezes (Figura 31 e Gráfico 20), indicando que esse derivado estaria inibindo a PDE5, no entanto, pela baixa potencialização apresentada, esse não seria o seu mecanismo de ação principal para relaxar a traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio.

Essa baixa potencialização é corroborada pela interação observada no *docking* molecular, onde a entalpia do complexo LASSBio-1611-PDE5 foi 10,53 kcal/mol maior do que a entalpia da sildenafil-PDE5, sugerindo uma menor estabilidade, levando a uma baixa inibição da PDE5 pelo LASSBio-1611 como observado *in vitro* nos experimentos funcionais (Figura 39). No entanto, não se descarta a hipótese de que o LASSBio ativaria a via do NO e uma vez que, a sildenafil inibe a PDE5, o efeito relaxante da mesma seria potencializada na presença do LASSBio-1611.

Diante dos achados e se evidenciando que a participação da PDE5 não é o mecanismo majoritário para aumentar cGMP, infere-se que o efeito relaxante do

LASSBio-1611 em traqueia até aqui é, principalmente, por ativação da via NOS/sGC/PKG e que, essa via uma vez ativada, possibilita a fosforilação de diversos alvos pela PKG, entre eles, a ativação dos canais de K^+ e a inibição dos Ca_v . Os canais de K^+ quando ativados, permitem a hiperpolarização da membrana plasmática e, conseqüentemente, o bloqueio indireto dos Ca_v , favorecendo o relaxamento do músculo liso. Nas vias aéreas, o principal canal de K^+ é o BK_{Ca} , que além de ser ativado pela PKG, também pode ser ativado diretamente pelo NO (REMBOLD, 1992; 1996; HALL, 2000; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005; ANTOSOVA et al., 2017).

Diversos estudos evidenciaram a importância no aumento da atividade de distintos canais de K^+ para promover o relaxamento do músculo liso de traqueia, tanto em nível funcional como eletrofisiológico, entre eles pode-se citar: K_v , K_{ATP} e SK_{Ca} em traqueia de cobaia (SHIKADA; TANAKA, 1995; MARTINS et al., 2013; MACÊDO et al., 2015) e BK_{Ca} em traqueia de cão (WADE; SIMS, 1993), de porco (KUME et al., 1994; KANNAN; JOHNSON, 1995; YAMAKAGE; HIRSHMAN; CROXTON, 1996) e de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994; RIBEIRO, 2007; MARTINS et al., 2013).

A ativação dos canais de K^+ culmina com inativação dos Ca_v , um mecanismo adicional a fosforilação pela PKG. O influxo de cálcio nas vias aéreas pode ocorrer por dois tipos de canais: 1) os Ca_v , que são, principalmente, ativados pela despolarização de membrana em resposta a altas $[K^+]_e$ e, em contraste, são parcialmente envolvidos no influxo de Ca^{2+} ativado por GPCRs; 2) os canais de cálcio operados por receptor (ROCs), que são ativados por substâncias como a ACh, a histamina, as prostaglandinas e os leucotrienos, aumentando o influxo de Ca^{2+} e liberando mais Ca^{2+} do RS por meio da produção de IP_3 (KIRKPATRICK; JENKINSON; CAMERON, 1975; CUTHBERT et al., 1994; YAMAKAGE et al., 2001; EVANGELISTA et al., 2007; PEREZ-ZOGHBI et al., 2009; KUME, 2015).

Com o intuito de investigar se os canais de K^+ e/ou de Ca^{2+} estariam envolvidos no mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1611, utilizou-se um protocolo em que a contração em traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio, era induzida por uma solução isomolar com moderadas (KCl 18 mM) e elevadas (KCl 60 mM) $[K^+]_e$. Esse protocolo se baseia nas propriedades eletroquímicas da membrana celular e um aumento moderado na $[K^+]_e$ reduz o efluxo desse íon, promovendo uma pequena despolarização membranar e abrindo Ca_v . Entretanto, se

e elevar essa $[K^+]_e$ para 60 mM, a despolarização terá grande magnitude e abrirá uma quantidade maior de Ca_v . É relatado que substâncias que são mais potentes em relaxar o músculo liso contraído por moderadas $[K^+]_e$ são mais eficientes em ativar canais de K^+ . No entanto, as substâncias que se mostrarem mais potentes em relaxar o músculo liso contraído por elevadas $[K^+]_e$ ou aquelas equipotentes, tanto para KCl 18 como para 60 mM, são mais eficientes em bloquear Ca_v (RAEBURN; GIEMBYCZ, 1995; MACÊDO et al., 2015).

Os resultados demonstraram que o efeito relaxante do LASSBio-1611 foi equipotente, tanto quando a traqueia foi pré-contraída com moderadas como com elevadas $[K^+]_e$, indicando que um provável mecanismo desse LASSBio é por bloqueio do influxo de cálcio (Figura 32 e Gráfico 21). Esse bloqueio pode ser por meio dos Ca_v ou dos ROCs, uma vez que, ao comparar-se as potências do LASSBio-1611 em traqueia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh ($pCE_{50} = 7,70 \pm 0,13$) e com 60 mM de KCl ($pCE_{50} = 6,07 \pm 0,18$), observou-se que o derivado sulfonamídico foi mais potente em relaxar a traqueia quando contraída com CCh.

Os Ca_v são classificados em três famílias: Ca_v1 ou Ca_v-L , Ca_v2 ou Ca_v-P/Q , N e R e Ca_v3 ou Ca_v-T . As duas primeiras famílias são ativadas por alta voltagem, enquanto a do Ca_v3 é sensível a baixa voltagem e quanto a sensibilidade à substâncias, as duas últimas famílias se mostram insensíveis à di-hidropiridinas, diferentemente da família do Ca_v1 que é sensível a essa classe de substâncias (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011; CATTERALL, 2011; ALEXANDER et al., 2017). Em músculo liso, o Ca_v1 é o principal, e muitas vezes o único, tipo de canal de Ca^{2+} expresso e envolvido no acoplamento excitação-contração (THORNELOE; NELSON, 2005; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005), sendo alvo de bloqueadores usados na terapêutica como o nifedipino e o verapamil (WATERMAN, 2000). Em traqueia de cobaia foram identificados os subtipos $Ca_v1.2$ e 1.3 (REYES-GARCÍA et al., 2016).

Com o intuito de confirmar se o LASSBio-1611 estaria ou não bloqueando o influxo de cálcio através dos Ca_v em traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio, foram realizadas curvas concentrações-resposta cumulativas ao $CaCl_2$ em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem cálcio, na ausência e na presença de diferentes concentrações do derivado. Este protocolo se baseia no fato de que a contração ocorrerá, quase que exclusivamente, pelo Ca^{2+} proveniente do meio

extracelular, já que a despolarização promovida pelo aumento da $[K^+]_e$ induz a abertura dos Ca_v (REMBOLD, 1996).

O fato da curva-controle ao $CaCl_2$ ter sido deslocada para a direita de maneira não paralela, com redução do E_{max} e da potência contrátil na presença do LASSBio-1611 (Figura 33, Gráfico 22 e Tabela 15) é sugestivo de que o mesmo esteja agindo por bloqueio do influxo de cálcio através dos Ca_v para exercer seu efeito relaxante em traqueia de cobaia com IPAC. No entanto, o efeito contrátil ao $CaCl_2$ não foi abolido na presença do LASSBio-1611, sendo o E_{max} atingido na concentração de 3×10^{-5} M, isso pode ser indicativo de um efeito indireto ou de que além dos Ca_v , o LASSBio-1611 poderia estar bloqueando o influxo de cálcio por outra via, a exemplo dos ROCs.

No *docking* molecular, observou-se que a interação do LASSBio-1611 com o sítio ativo do $Ca_v1.2$ gerou uma entalpia 6,92 kcal/mol menor do que aquela observada para a interação nifedipino- $Ca_v1.2$, sugerindo que o LASSBio bloqueia esse canal de cálcio (Figura 40).

Além dos alvos citados anteriormente que podem ser modulados positivamente a partir da ativação da NOS, há relatos que as vias NOS e COX estão interligadas e que a ativação de uma via pode aumentar a atividade da outra. As COXs (COX-1 e COX-2) são enzimas da rota metabólica do AA que geram as prostaglandinas derivadas da membrana nuclear e plasmática e estão presentes em células estruturais e imunes das vias aéreas. Além disso, COX-2, que tem um alto potencial inflamatório, tem sua expressão induzível em macrófagos, mastócitos, eosinófilos, fibroblastos, células endoteliais, epiteliais e musculares lisas das vias aéreas. Desde a década de 1960 que há relatos do papel das PGs em doenças alérgicas, a partir da observação de que PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ são liberados durante anafilaxia em pulmões de cobaia e que essa produção pode ser inibida pelo AAS e pela indometacina. De fato, esses dois mediadores lipídicos juntamente com a PGD_2 , a PGI_2 e TxA_2 quando liberados nas vias aéreas implicam em diversas respostas que podem levar a broncoconstrição ou a broncodilatação, agravando ou melhorando o quadro asmático (PETERS-GOLDEN, 2002; TILLEY et al., 2003; CLAAR; HARTERT; PEEBLES, 2015; MAHER et al., 2015).

Sabendo-se que as COXs são importantes enzimas envolvidas na liberação de mediadores que agravam ou melhoram a hiper-responsividade das vias aéreas na asma, decidiu-se investigar o papel dessas enzimas no relaxamento induzido

pelo LASSBio-1611 em traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio. Para tanto, utilizou-se a indometacina, um inibidor não seletivo das COXs (Adaptado de CHOU; CHEN; LIN-SHIAU, 1996), observando-se que a potência relaxante desse LASSBio foi reduzida em, aproximadamente, 813 vezes e o $E_{\max}$ foi atingido na concentração de 3×10^{-4} M, enquanto que no controle essa concentração foi de 10^{-5} M (Figura 34, Gráfico 23 e Tabela 16). Também se observou que esse desvio para a direita da curva na presença da indometacina foi maior em, aproximadamente, 4,8 vezes do que a curva na presença do L-NAME, um inibidor de NOS (Tabela 16).

Esses dados nos levam a sugerir que o LASSBio-1611 pode estar modulando positivamente as COXs para exercer seu efeito relaxante em traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio. Dessa maneira, aumentando a biossíntese de mediadores relaxantes nas vias aéreas, a exemplo da PGE_2 e da PGI_2 , entretanto, mais estudos serão necessários para elucidar essa atividade do LASSBio sobre as COXs.

O estudo do *docking* molecular revelou que as interações entre o LASSBio-1611 e a COX-2 são por ligação de hidrogênio e por interações estéricas e que a entalpia de formação do complexo se mostrou menor em 5,31 kcal/mol do que a interação entre o inibidor etoricoxibe e a enzima. Esse dado poderia sugerir que o LASSBio seria um inibidor de COX, no entanto, alguns aminoácidos para a interação ao etoricoxibe foram distintos, o que explicaria a diferença de ação (Figura 41).

Todavia, a interação entre as vias NOS e COXs é possível, uma vez que diversos estudos relatam essa interligação, no entanto, esse mecanismo parece não estar bem esclarecido. Há relatos do possível mecanismo de ativação da COX-2 num processo inflamatório, ser mediado diretamente ou indiretamente pelo $ONOO^-$ formado a partir do aumento da produção de NO pela iNOS (NEEDLEMAN; MANNING, 1999). Salvemini et al. (1993) já evidenciavam que o NO exercia um papel crucial para a liberação de PGE_2 por ativação direta de COX em cultura primária de macrófagos. Assim como foi evidenciado que em pulmão de rato, o aumento ou a diminuição de NO, aumenta ou diminui, respectivamente, a geração de 6-ceto- PGF_1 , análogo da $PGF_{2\alpha}$; em músculo liso de aorta, a liberação de PGE_2 por IL-13 é mediada, em parte pela ativação de COX-2 por NO; em células endoteliais humanas o aumento de NO aumenta significativamente os níveis de PGs; em pulmões de ratos tratados com lipopolissacarídeo, observou-se o aumento tanto de NO como de PGs, a exemplo da PGI_2 que tem sua liberação aumentada por L-arginina, ao mesmo tempo em que é diminuída por inibidores de NOS e em

pulmões de ratos tratados com endotoxina, a inibição de NOS foi acompanhada de liberação diminuída de PGI_2 (SAUTEBIN; ROSA, 1994; DI ROSA et al., 1996; VASSALLE et al., 2003; CUZZOCREA; SALVEMINI, 2007).

Seguindo a hipótese de que NO ativa COX, Nieri et al. (2006) avaliaram a expressão de COX, bem como a interligação entre as NOS e as COXs em traqueia de cobaia normal e sensibilizado com OVA. Eles comprovaram a expressão de COX-1, apenas em epitélio, enquanto que a COX-2 está presente em epitélio, lâmina própria, condrócitos e músculo liso de traqueia, tanto em animal normal como sensibilizado. Além disso, esses autores também sugerem que há uma interação entre COX-1/NOS/COX-2, uma vez que se observou que ocorre ativação da COX-2 e isso é devido à inibição da NOS pela COX-1 no epitélio de traqueia cobaia normal. No modelo sensibilizado não ocorre essa interação (COX-1/NOS/COX-2) devido ao dano epitelial, no entanto, há uma superexpressão de COX-2 no músculo liso, liberando, majoritariamente, PGI_2 .

Diante dessa possibilidade, hipotetizou-se a interligação dessas vias no mecanismo de ação do LASSBio-1611. Para confirmar ou descartar essa hipótese, utilizou-se, simultaneamente, ambos os inibidores não seletivos de NOS e de COX. Se o LASSBio-1611 estivesse ativando tanto a NOS como a COX se esperava que na presença dos dois inibidores, a potência do LASSBio fosse ainda menor do que àquelas observadas na presença dos inibidores em experimentos isolados, uma vez que ambas as enzimas estariam inibidas. Entretanto, não foi o que aconteceu, a curva concentração-resposta foi sobreposta tanto à curva na presença, apenas da indometacina como, apenas do L-NAME (Figura 34, Gráfico 23 e Tabela 16), sugerindo que o LASSBio-1611 estaria ativando as duas enzimas, não se descartando a possibilidade de haver uma interação entre a NOS e a COX nesse modelo analisado. Estudos moleculares serão necessários para se confirmar ou descartar essa possibilidade.

Adicionalmente, parâmetros como, dissolução, solubilidade e permeabilidade ao SNC podem ser preditos *in silico*. A finalidade desse estudo teórico foi avaliar se o LASSBio-1611 possui características essenciais para que possa ser considerado como possível fármaco antiasmático e, assim, evitar gastos desnecessários durante o processo de pesquisa e/ou desenvolvimento (AFONSO, 2008).

Com relação às propriedades físico-químicas do LASSBio-1611, observou-se massa molecular de 371,45 g/mol e alta lipofilicidade, calculada pelo logP. Ambos os

parâmetros se encontram em concordância com a regra de *Lipinski*, conhecida como regra dos cinco, que prediz que substâncias com boa biodisponibilidade oral e sujeitas a absorção por difusão passiva devam possuir: a) peso molecular < 500 kDa; b) $\log P < 5$; c) número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (HBA) ≤ 10 ; d) número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBD) ≤ 5 (LIPINSKI et al., 1997). Considerando, que sulfonamidas não alquiladas possuem hidrogênio ácido ligado ao nitrogênio vizinho ao grupo sulfona (R_1SO_2NH), permitindo a possibilidade de equilíbrio entre espécies ionizadas e não ionizadas dependente de pH, foram calculados o pKa do grupo sulfonamida e o logD em pH 4,6 e 7,4, mimetizando o pH do duodeno e do plasma, respectivamente. Os resultados evidenciaram que o LASSBio-1611 é um ácido fraco, com lipofilicidade adequada a permeação e insolúvel em água (Tabela 17).

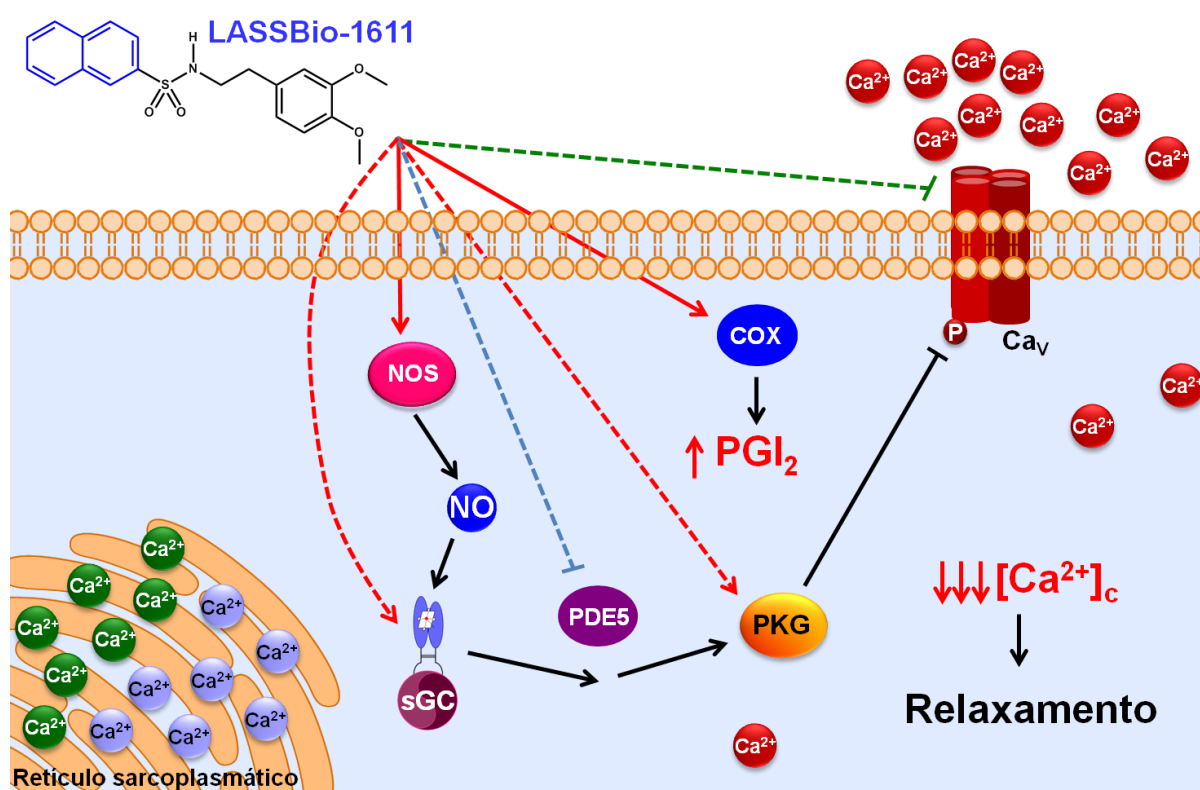
Além disso, o cálculo *in silico* das propriedades ADMET do LASSBio-1611 demonstrou predição de alta permeação pelo ensaio de Caco-2, corroborando os bons valores de logP e de logD, bem como elevada ligação as proteínas plasmáticas, devido a alta lipofilicidade do composto, baixo volume de distribuição e moderada biodisponibilidade oral. Além disso, considerando, que um dos efeitos colaterais associados ao tratamento aos inibidores de PDE4 é a êmese, por inibição de suas isoformas presentes no SNC, propôs predizer a capacidade do LASSBio-1611 atravessar a barreira hematoencefálica. Os resultados, expressos em valores de escore, permitem observar que o LASSBio-1611 seria fraco penetrante do SNC (escore = > -3,5 e < -3,0) (Tabela 18).

Com relação ao potencial mutagênico e cardiotoxico, segunda principal causa de toxicidade de moléculas candidatas a fármacos, o LASSBio-1611 foi predito como não mutagênico pelo ensaio de AMES *in silico*. Entretanto, o Programa ACD/Percepta não foi capaz de predizer a capacidade do LASSBio-1611 em inibir os canais *hERG* (escore > 0,33 e < 0,67 = indefinido), não determinando o potencial cardiotoxico, bem como não foi possível prever se o derivado seria metabolicamente (HLM) estável (escore $\leq 0,33$) ou instável (escore > 0,67) (Tabela 18).

É notável a importância de estudos envolvendo o músculo liso de traqueia em um modelo de IPAC, uma vez que esse modelo mimetiza um quadro asmático, na tentativa de se conhecer melhor a fisiopatologia dessa doença, bem como em busca da descoberta de novos fármacos para o seu tratamento. Em sendo a asma uma doença crônica multifatorial, o LASSBio-1611 desponta como uma molécula, cujos

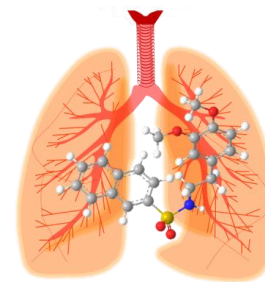
estudos devem ser aprofundados, visto que, demonstra-se, pela primeira vez, seu mecanismo de ação como sendo multialvo em traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio (Figura 42). O mecanismo de ação multialvo é, atualmente, uma aposta dos Químicos Medicinais para se tratar doenças crônicas multifatoriais e esses resultados evidenciam que compostos sulfonamídicos, com substituinte naftila ligado a função sulfonamida, podem ser uma alternativa promissora para o tratamento de tais doenças, a exemplo da asma.

Figura 42 – Proposta de mecanismo de ação relaxante para o LASSBio-1611 em traqueia isolada de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio funcional.



O LASSBio-1611 modula positivamente direta (setas vermelhas cheias) ou indiretamente (setas vermelhas pontilhadas) as vias NOS/sGC/PKG e COXs, essa última aumenta a formação de prostanoídes relaxantes como a PGI_2 . Além disso o LASSBio-1611 modula negativamente, com uma menor potência, a PDE5 (linhas azuis pontilhadas) e bloqueia o influxo de cálcio através dos Ca_v , seja direta (linhas verdes pontilhadas) ou indiretamente via PKG. Esses eventos intracelulares culminariam com a diminuição da concentração citosólica de cálcio, promovendo o relaxamento do músculo liso em traqueia de cobaia com IPAC, na ausência de epitélio. NOS = sintase do óxido nítrico; NO = óxido nítrico; sGC = ciclase de guanilil solúvel; PDE5 = fosfodiesterase do tipo 5; PKG = proteína cinase G; COX = ciclo-oxigenase; PGI_2 = prostaglandina I_2 ; Ca_v = canal de cálcio dependente de voltagem; $[\text{Ca}^{2+}]_c$ = concentração citosólica de cálcio.

Fonte: Silva, 2019.



7 Conclusões

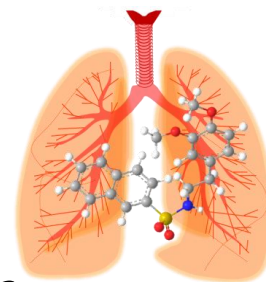
Na investigação do efeito relaxante do LASSBio-448 e de seus 12 derivados sulfonamídicos em traqueia de cobaia controle e com IPAC, na presença e na ausência de epitélio funcional, pode-se concluir que:

- O protótipo, LASSBio-448, relaxa a traqueia isolada de cobaia com IPAC, e todos os seus derivados relaxam esse órgão tanto na condição controle como na de IPAC;
- O LASSBio-1611 foi mais potente que todos os derivados testados, na ausência de epitélio nos dois grupos avaliados e isso pode ser devido a alta lipofilicidade do substituinte 1-naftila ligado a função sulfonamida, aumentando a permeabilidade celular da molécula.

Na caracterização do mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1611 em traqueia de cobaia com IPAC, sem epitélio, e com base no estudo de *docking* molecular, propõe-se que este derivado se apresenta como uma molécula multialvo por modular:

- Positivamente a NOS, que aumentaria os níveis de NO, ativando a sGC e, posteriormente, a PKG; bem como a COX, podendo ser por ativação direta ou via formação de NO, que levaria ao aumento de prostanoídes relaxantes com a PGI_2 ;
- Negativamente a PDE5 e o influxo de cálcio através dos Ca_v , podendo ser direta ou indiretamente pela PKG, o que levaria a diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e, dessa maneira, promovendo o relaxamento do músculo liso.

Na avaliação dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos, *in silico*, observou-se que o LASSBio-1611 obedece a regra de *Lipinski*, assim como apresenta características farmacocinéticas essenciais para um bom candidato a medicamento para o tratamento da asma.



Referências

AFONSO, Ilidio Ferreira. **Modelagem molecular e avaliação da relação estrutura-atividade acoplados a estudos farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* de derivados heterocíclicos com atividade antimicrobiana**. 2008. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

AHMAD, F.; MURATA, T.; SHIMIZU, K.; DEGERMAN, E.; MAURICE, D.; MANGANIELLO, V. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: important signaling modulators and therapeutic targets. **Oral Diseases**, v. 21, n. 1, p. e25-e50, 2015.

AKBAR, A.; SHARMA, J. N. Influence of indomethacin on histamine- and acetylcholine-induced responses in the intact and denuded epithelium of guinea pig tracheal smooth muscle. **Pharmacological Research**, v. 25, n. 3, p. 279-286, 1992.

AL-AYED, M. S. Z. Relaxant effect of ghrelin on guinea pig isolated tracheal smooth muscle: role of epithelial NO and PGE₂. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 470, n. 6, p. 949-958, 2018.

ALBUQUERQUE, A. A. S.; CARVALHO, M. T. M.; EVORA, P. M.; NADAI, T. R. DE; CELOTTO, A. C.; EVORA, P. R. B. *In vitro* reactivity ("organ chamber") of guinea pig tracheal rings-methodology considerations. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 11, p. 216-216, 2016.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to receptors and channels (GRAC), 5nd edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164 (Supl. 1), p. S1-S324, 2011.

ALEXANDER, S. P.; STRIESSNIG, J.; KELLY, E.; MARRION, N. V.; PETERS, J. A.; FACCENDA, E.; HARDING, S. D.; PAWSON, A. J.; SHARMAN, J. L.; SOUTHAN, C.; DAVIES, J. A.; CGTP Collaborators. The concise guide to Pharmacology 2017/18: voltage-gated ion channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. S160-S194, 2017.

ANGELI, P.; PRADO, C. M.; XISTO, D. G.; SILVA, P. L.; PÁSSARO, C. P.; NAKAZATO, H. D.; LEICK-MALDONADO, E. A.; MARTINS, M. A.; ROCCO, P. R. M.; TIBÉRIO, I. F. L. C. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 294, n. 6, p. L1197-L1205, 2008.

ANTOSOVA, M.; MOKRA, D.; PEPUCHA, L.; PLEVKOVA, J.; BUDAY, T.; STERUSKY, M.; BENCOVA A. Physiology of nitric oxide in the respiratory system. **Physiological Research**, v. 66, Suppl. 2, p. S159-S172, 2017.

ANTOŠOVÁ, M.; STRAPKOVÁ, A.; MIKOLKA, P.; MOKRÝ, J.; MEDVEĎOVÁ, I.; MOKRÁ, D. The influence of L-NAME on iNOS expression and markers of oxidative stress in allergen-induced airway hyperreactivity. *In*: POKORSKI, M. **Allergens and Airway Hyperreactivity**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p. 1-10.

ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.

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. L332-L343, 2004.

BARNES, P. J. Pharmacology of airway smooth muscle. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 58, n. 5, p. S123-132, 1998.

BAROFFIO, M.; CRIMI, E.; BRUSASCO, V. Review: airway smooth muscle as a model for new investigative drugs in asthma. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, v. 2, n. 3, p. 129-139, 2008.

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

BARROS, Maria Ester de Sá Barreto. **Estudos de *docking* molecular, síntese e atividade biológica de análogos da (-)-massoialactona e da combretastatina A-4**. 2015. Tese (doutorado em Química) – Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

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

BEGHÈ, B.; RABE, K. F.; FABBRI, L. M. Phosphodiesterase-4 inhibitor therapy for lung diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 188, n. 3, p. 271-278, 2013.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.

BERRIDGE, M. J. Cell signalling pathways. *In*: BERRIDGE, M. J. **Cell Signalling Biology**, v. 6, p. 1-138, 2014. Disponível em: <http://csb.portlandpresspublishing.com/content/6/csb0001002>. Acesso em: 16 jan. 2019.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium - a life and death signal. **Nature**, v. 395, n. 6703, p. 645-648, 1998.

BILLINGTON, C. K.; PENN, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respiratory Research**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2003.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, v. 34, p. 289-330, 1989.

BLOBAUM, A. L.; MARNETT, L. J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1425-1441, 2007.

BOER, J.; MEURS, H.; COERS, W.; KOOPAL, M.; BOTTONE, A. E.; VISSER, A. C.; TIMENS, W.; ZAAGSMA, J. Deficiency of nitric oxide in allergen-induced airway hyperreactivity to contractile agonists after the early asthmatic reaction: an ex vivo study. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, n. 6, p. 1109-1116, 1996.

BOLTON, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BOSWELL-SMITH, V.; CAZZOLA, M.; PAGE, C. P. Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 6, p. 1237-1243, 2006.

BRASIL. [Conselho Federal de Medicina Veterinária (2013)]. **Guia brasileiro de boas práticas em eutanásia em animais – Conceitos e procedimentos recomendados**. Brasília, DF: Comissão de Ética, Bioética e Bem-estar Animal/CFMV [2013]. Disponível em: <http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/Guia%20de%20Boas%20Pr%C3%A1ticas%20para%20Eutanasia.pdf.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

BRASIL. **Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012**. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Brasília: Conselho Federal de Medicina Veterinária, [2012]. Disponível em: <http://portal.cfmv.gov.br/lei/index/id/326>. Acesso em: 15 out. 2018.

BRASIL. [Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) (2016)]. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**, Brasília, DF: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, [2016]. Disponível em: <http://www.ceuaics.ufba.br/sites/ceuaics.ufba.br/files/E-book%20-%20fasc%C3%ADculo%201%20%28Introdu%C3%A7%C3%A3o%20geral%29.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

BRUNE, K.; FRANK, J.; SCHWINGSHACKL, A.; FINIGAN, J.; SIDHAYE, V. K. Pulmonary epithelial barrier function: some new players and mechanisms. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 8, p. L731-L745, 2015.

BUECHLER, W. A.; NAKANE, M.; MURAD F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 174, n. 1, p. 351-357, 1991.

BUTT, E.; PÖHLER, D.; GENIESER, H-G.; HUGGINS, J. P.; BUCHER, B. Inhibition of cyclic GMP-dependent protein kinase-mediated effects by (Rp)-8-bromo-PET-cyclic GMPS. **British Journal of Pharmacology**, v. 116, p. 3110-3116, 1995.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78 (Supl. 1), p. 98-106, 2008.

CANNING, B. Modeling asthma and COPD in animals: a pointless exercise? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 244-250, 2003.

CARDOSO, T. DE A.; RONCADA, C.; SILVA, E. R. DA; PINTO, L. A.; JONES, M. H.; STEIN, R. T.; PITREZ, P. M. The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a brazilian national database system. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 3, p. 163-168, 2017.

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

CARRADORI, S.; MOLLIKA, A.; DE MONTE, C.; GRANESE, A.; SUPURAN, C. Nitric oxide donors and selective carbonic anhydrase inhibitors: a dual pharmacological approach for the treatment of glaucoma, cancer and osteoporosis. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5667-5679, 2015.

CARTA, F.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Sulfonamides: a patent review (2008 – 2012). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, n. 7, p. 747-758, 2012.

CARVAJAL, J. A.; GERMAIN, A. M.; HUIDOBRO-TORO, J. P.; WEINER, C. P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 184, n. 3, p. 409-420, 2000.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 8, p. a003947-a003947, 2011.

CHEN, J.-L.; KO, W.-C. Relaxation of isolated guinea-pig trachea by apigenin, a constituent of celery, via inhibition of phosphodiesterase. **European Journal of Pharmacology**, v. 811, p. 129-133, 2017.

CHEN, T. C.; WADSTEN, P.; SU, S.; RAWLINSON, N.; HOFMAN, F. M.; HILL, C. K.; SCHONTHAL, A. H. The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram induces expression inhibitors p21Cip1 and p27Kip1, resulting in growth inhibition, increased differentiation, and subsequent apoptosis of malignant A-172 glioma cells. **Cancer Biology & Therapy**, v. 1, n. 3, p. 268-276, 2002.

CHENG, F.; LI, W.; LIU, G.; TANG, Y. *In silico* ADMET prediction: recent advances, current challenges and future trends. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 1273-1289, 2013.

CHOU, D.-S.; CHEN, T.-F.; LIN-SHIAU, S.-Y. Mechanism of cooling-induced relaxation in the isolated guinea-pig trachea. **Respiration Physiology**, v. 106, n. 2, p. 179-186, 1996.

CLAAR, D.; HARTERT, T. V.; PEEBLES, R. S. The role of prostaglandins in allergic lung inflammation and asthma. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 9, n. 1, p. 55-72, 2015.

COLLIER, J.; VALLANCE, P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, n. 11, p. 427-31, 1989.

CREESE, B. R.; DENBOROUGH, M. A. Sources of calcium for contraction of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 8, n. 2, p. 175-182, 1981.

CUTHBERT, N. J.; GARDINER, P. J.; NASH, K.; POLL, C. T. Roles of Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 266, n. 6, p. L620-L627, 1994.

CUZZOCREA, S.; SALVEMINI, D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. **Kidney International**, v. 71, n. 4, p. 290-297, 2007.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

DAHLIN, J. L.; INGLESE, J.; WALTERS, M. A. Mitigating risk in academic preclinical drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 4, p. 279-294, 2015.

DAL PIAZ, V.; GIOVANNONI, M. P. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 463-480, 2000.

DALE, H. H. The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea pig. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 4, p. 167-223, 1913.

DI ROSA, M.; IALENTI, A.; IANARO, A.; SAUTEBIN, L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 54, n. 4, p. 229-238, 1996.

DOS SANTOS, Jean Leandro; MAN, Chin Chung; LIMA, Lídia Moreira; COSTA, Fernando Ferreira; LANARO, Carolina. **Use of phthalimide and/or sulphonamide derivatives in the treatment of diseases which require reducing the TNF-alpha levels and an exogenous source of nitric oxide, phthalimide derivatives, sulphonamide derivatives, and a method for obtaining a sulphonamide derivative**. Depositante: Universidade Federal do Rio de Janeiro; Universidade Estadual de Campinas; Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". US 2012/0157690 A1, Depósito: 07 set. 2010, Concessão: 21 jun. 2012. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/52/52/92/c5af85eb4efb92/US20120157690A1.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2019.

EGLIN, R. M.; HEGDE, S. S.; WATSON, N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. **Pharmacological Reviews**, v. 48, n. 4, p. 531–565, 1996.

ELLIS, J. L.; Role of soluble guanylyl cyclase in the relaxations to a nitric oxide donor and to nonadrenergic nerve stimulation in guinea pig trachea and human bronchus. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 3, p. 1215-1218, 1997.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 25, n. 3, p. 533-535, 2000.

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

EVANGELISTA, G. L.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LOPES, E. A. B.; SANTOS, M. V. DOS; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 515-522, 2007.

FALLON, J. L.; BAKER, M. R.; XIONG, L.; LOY, R. E.; YANG, G.; DIRKSEN, R. T.; HAMILTON, S. L.; QUIOCHO, F. A. Crystal structure of dimeric cardiac L-type calcium channel regulatory domains bridged by Ca^{2+} {middle dot} calmodulins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 13, p. 5135-5140, 2009.

FAN CHUNG, K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1-3, p. 110-117, 2006.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G.; BERNARDI, M. M. Anestésicos inalatórios *In*: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 119.

FEDAN, J. S.; VAN SCOTT, M. R.; JOHNSTON, R. A. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of airways. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 45, n. 2, p. 159-174, 2001.

FOLKERTS, G.; TEN BROEKE, R.; FISCHER, A.; GEPPETTI, P.; NIJKAMP, F.P. Nitric oxide control of airway smooth muscle. **European Respiratory Review**, v. 10, n. 73, p. 249-252, 2000.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-1714, 2006.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FRANCIS, S. H.; BLOUNT, M. A.; CORBIN, J. D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 651-690, 2011.

FUKUTO, J. M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 165-194, 1995.

GANESAN, S.; COMSTOCK, A. T.; SAJJAN, U. S. Barrier function of airway tract epithelium. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 4, p. e24997, 2013.

GEIGER, W. B.; ALPERS, H. S.; TEXAS, S. A. The mechanism of the Schultz-Dale reaction. **Journal of Allergy**, v. 30, n. 4, p. 316-328, 1959.

GIEMBYCZ, M. A. 4D or not 4D – the emetogenic basis of PDE4 inhibitors uncovered? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 12, p. 548, 2002.

GIEMBYCZ, M. A.; FIELD, S. K. Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 4, p. 147-158, 2010.

GINA. Global Initiative for Asthma. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention**, 2018. Disponível em: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2018/04/wms-GINA-2018-report-V1.3-002.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2019.

GLAZA, I.; SZADUJKIS-SZADURSKI, L.; SZADUJKIS-SZADURSKI, R.; GAJDUS, M.; RZEPKA, A.; GURTOWSKA, N. Activity of guanylyl cyclase activators on the reaction of tracheal smooth muscle contraction. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 65, p. 496-500, 2011.

GLYNOS, C.; DUPONT, L. L.; VASSILAKOPOULOS, T.; PAPAPETROPOULOS, A.; BROUCKAERT, P.; GIANNIS, A.; JOOS, G. F.; BRACKE, K. R.; BRUSSELLE, G. G. The role of soluble guanylyl cyclase in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 188, n. 7, p. 789-799, 2013.

GOSENS, R.; SCHAAFSMA, D.; NELEMANS, S.; HALAYKO, A. Rho-kinase as a drug target for the treatment of airway hyperresponsiveness in asthma. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 339-348, 2006.

HALL, I. P. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. **European Respiratory Journal**, v. 15, n. 6, p. 1120-1127, 2000.

HALPIN, D. ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in COPD. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 3, n. 4, p. 543-561, 2008.

HAMAD, A. M.; CLAYTON, A.; ISLAM, B.; KNOX, A. J. Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 285, n. 5, p. L973-L983, 2003.

HARTENECK, C.; KOESLING, D.; SÖLING, A.; SCHULTZ, G.; BÖHME, E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. **FEBS Letters**, v. 272, n. 1-2, p. 221-223, 1990.

HILL-EUBANKS, D. C.; WERNER, M. E.; HEPPNER, T. J.; NELSON, M. T. Calcium signaling in smooth muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 9, p. a004549-a004549, 2011.

HIRAMATSU, T.; KUME, H.; KOTLIKOFF, M. I.; TAKAGI, K. Role of calcium-activated potassium channels in the relaxation of tracheal smooth muscles by forskolin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 21, n. 5, p. 367-375, 1994.

HOBBS, A. J. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 12, p. 484-91, 1997.

HOFMANN, F.; BERNHARD, D.; LUKOWSKI, R.; WEINMEISTER, P. cGMP regulated protein kinases (cGK). In: **cGMP: generators, effectors and therapeutic implications**. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, p. 1-583, 2009.

HOLGATE, S. T.; WENZEL, S.; POSTMA, D. S.; WEISS, S. T.; RENZ, H.; SLY, P. D. Asthma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1-22, 2015.

HORI, M.; KARAKI, H. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. **Life Sciences**, v. 62, n. 17-18, p. 1629-1633, 1998.

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.

HWANG, T.-L.; WU, C.-C.; TENG, C.-M. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 6, p. 1158-1163, 1998.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide – A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. **Hypertension**, v. 16, n. 5, p. 477-483, 1990.

IMASAKI, T.; KOBAYASHI, H.; HATAISHI, R.; HAYASHI, I.; TOMITA, T.; MAJIMA, M. Nitric oxide is generated in smooth muscle layer by neurokinin A and counteracts constriction in guinea pig airway. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 5, p. 465-474, 2001.

ISHII, T.; SHIMO, Y. Cooling-induced subsensitivity to carbachol in the tracheal smooth muscle of the guinea-pig. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 332, n. 3, p. 219-223, 1986.

JACKSON, S. A.; SAHNI, S.; LEE, L.; LUO, Y.; NIEDUZAK, T. R.; LIANG, G.; CHIANG, Y.; COLLAR, N.; FINK, D.; HE, W.; LAOUI, A.; MERRILL, J.; BOFFEY, R.; CRACKETT, P.; REES, B.; WONG, M.; GUILLOTEAU, J. P.; MATHIEU, M.; REBELLO, S. S. Design, synthesis and characterization of a novel class of coumarin-based inhibitors of inducible nitric oxide synthase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2723-2739, 2005.

JONES, T. R.; CHARETTE, L.; DENIS, D. Antigen-induced contraction of guinea-pig isolated trachea: studies with novel inhibitors and antagonists of arachidonic acid metabolites. **British Journal of Pharmacology**, v. 95, n. 1, p. 309-321, 1988.

JUDE, J. A.; WYLAM, M. E.; WALSETH, T. F.; KANNAN, M. S. Calcium signaling in airway smooth muscle. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 5, n. 1, p. 15-22, 2008.

KANNAN, M. S.; JOHNSON, D. E. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. **Life Sciences**, v. 56, n. 25, p. 2229-2238, 1995.

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

KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165-2180, 2008.

KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M.; YAMAMORI, B.; FENG, J.; NAKANO, T.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; KAIBUCHI, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, n. 5272, p. 245-248, 1996.

KIRKPATRICK, C. T.; JENKINSON, H. A.; CAMERON, A. R. Interaction between drugs and potassium-rich solutions in producing contraction in bovine tracheal smooth muscle: studies in normal and calcium-depleted tissues. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 2, n. 6, p. 559-570, 1975.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.

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

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, n. 18, p. 5471-5489, 2008.

KOESLING, D.; BÖHME, E.; SCHULTZ, G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal transducing enzymes. **FASEB Journal**, v. 5, n. 13, p. 2785-2791, 1991.

KOŁACZEK, A.; FUSIARZ, I.; ŁAWECKA, J.; BRANOWSKA, D. Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: a brief review. **CHEMIK**, v. 68, n. 7, p. 620-628, 2014.

KUME, H. Ca^{2+} Dynamics and Ca^{2+} sensitization in the regulation of airway smooth muscle tone. In: SAKUMA, K. (Ed.). **Muscle Cell and Tissue**. Londres: InTech, p. 289-330, 2015.

KUME, H.; HALL, I. P.; WASHABAU, R. J.; TAKAGI, K.; KOTLIKOFF, M. I. Beta-adrenergic agonists regulate K_{Ca} channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 1, p. 371-379, 1994.

KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, n. 2, p. 269-288, 1982.

LAITINEN, L. A.; HEINO, M.; LAITINEN, A.; KAVA, T.; HAAHTELA, T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v. 131, n. 4, p. 599-606, 1985.

LI, H.; SHIMIZU, H.; FLINSPACH, M.; JAMAL, J.; YANG, W.; XIAN, M.; CAI, T.; WEN, E. Z.; JIA, Q.; WANG, P. G.; POULOS, T. L. The novel binding mode of *N*-alkyl-*N'*-hydroxyguanidine to neuronal nitric oxide synthase provides mechanistic insights into NO biosynthesis. **Biochemistry**, v. 41, n. 47, p. 13868-13875, 2002.

LI, Y.; MARTIN, L. D.; SPIZZ, G.; ADLER, K. B. MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells *in vitro*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 40982-40990, 2001.

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

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LIU, C.; ZUO, J.; JANSSEN, L. J. Regulation of airway smooth muscle RhoA/ROCK activities by cholinergic and bronchodilator stimuli. **European Respiratory Journal**, v. 28, n. 4, p. 703-711, 2006.

LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K. P.; WALDMAN, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 375-413, 2000.

LUCIDO, M. J.; ORLANDO, B. J.; VECCHIO, A. J.; MALKOWSKI, M. G. Crystal structure of aspirin-acetylated human cyclooxygenase-2: insight into the formation of products with reversed stereochemistry. **Biochemistry**, v. 55, n. 8, p. 1226-1238, 2016.

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.

MAARSINGH, H.; BOSSENGA, B. E.; BOS, I. S. T.; VOLDERS, H. H.; ZAAGSMA, J.; MEURS, H. L-Arginine deficiency causes airway hyperresponsiveness after the late asthmatic reaction. **European Respiratory Journal**, v. 34, n. 1, p. 191-199, 2009.

MACÊDO, C. L.; VASCONCELOS, L. H. C.; CORREIA, A. C. C.; MARTINS, I. R. R.; LIRA, D. P.; SANTOS, B. V. O.; SILVA, B. A. Mechanisms underlying the relaxant effect of galeatin 3,6-dimethyl ether, from *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke, on guinea-pig trachea. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 69, n. 11-12, p. 434-442, 2015.

MACLENNAN, D. H. Ca^{2+} signalling and muscle disease: Ca^{2+} and muscle disease. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5291-5297, 2000.

MAHER, S. A.; BIRRELL, M. A.; ADCOCK, J. J.; WORTLEY, M. A.; DUBUIS, E. D.; BONVINI, S. J.; GRACE, M. S.; BELVISI, M. G. Prostaglandin D_2 and the role of the DP_1 , DP_2 and TP receptors in the control of airway reflex events. **European Respiratory Journal**, v. 45, n. 4, p. 1108-1118, 2015.

MARTINS, Italo Rossi Roseno. **A ação relaxante de novos derivados N-sulfonilidrazônicos do LASSBio-448, inibidores de PDE4, em um modelo de asma alérgica em cobaias: caracterização funcional do mecanismo relaxante do LASSBio-1847**. 2016. Tese (doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

MARTINS, I. R. R.; SANTOS, R. F.; CORREIA, A. C. C.; OLIVEIRA, G. A.; MACÊDO, C. L.; MONTEIRO, F. S.; SANTOS, P. F.; CAVALCANTE, F. A.; TAVARES, J. F.; SILVA, B. A. Relaxant effect of ent-7 α -hydroxytrachyloban 18-oic acid, a trachylobane diterpene from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul., on tracheal smooth muscle. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 49, p. 15-25, 2013.

MAURICE, D. H.; KE, H.; AHMAD, F.; WANG, Y.; CHUNG, J.; MANGANIELLO, V. C. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 4, p. 290-314, 2014.

MCCRACKEN, J. L.; VEERANKI, S. P.; AMEREDES, B. T.; CALHOUN, W. J. Diagnosis and management of asthma in adults: a review. **JAMA**, v. 318, n. 3, p. 279, 2017.

MEDEIROS, Millena de Melo. **Efeito relaxante de derivados N-sulfonilidrazônicos do rolipram em traqueia de cobaia: investigação do mecanismo de ação do LASSBio-1846**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

MEDRADO, V. C. Anestésicos inalatórios. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 389-402.

MELO, T. A. R.; SILVA, B. A. Investigação do possível efeito espasmolítico dos derivados LASSBio-1632, 1846 e 1850. In: XXIV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPB, 24., 2016, João Pessoa. **Anais do [...]**. João Pessoa: Editora da UFPB, 2017. p. 326-326. Disponível em: http://www.propesq.ufpb.br/propesq/contents/downloads/enic/anais_xxiv_enic_catalogado_final.pdf. Acesso em: 18 dez. 2018.

MEURS, H.; GOSENS, R.; ZAAGSMA, J. Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from in vitro model systems and animal models. **European Respiratory Journal**, v. 32, n. 2, p. 487–502, 2008.

MEURS, H.; SANTING, R. E.; REMIE, R.; MARK, T. W. VAN DER; WESTERHOF, F. J.; ZUIDHOF, A. B.; BOS, I. S. T.; ZAAGSMA, J. A guinea pig model of acute and chronic asthma using permanently instrumented and unrestrained animals. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 840-847, 2006.

MOGHADAM-KIA, S.; WERTH, V. P. Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 3, p. 239–248, 2010.

MOKRY, J.; URBANOVA, A.; KERTYS, M.; MOKRA, D. Inhibitors of phosphodiesterases in the treatment of cough. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 257, p. 107-114, 2018.

MONCADA, S. R.; PALMER, M. G.; HIGGS, E. A. Nitric oxide, physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

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, n. 19, p. 2635-2640, 1998.

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 I: 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**, v. 352, n. 3, p. 559-567, 2015.

MORRISON, K. J.; VANHOUTTE, P. M. Characterization of muscarinic receptors that mediate contraction of guinea-pig isolated trachea to choline esters: effect of removing epithelium. **British Journal of Pharmacology**, v. 106, n. 3, p. 672-676, 1992.

MUCCITELLI, R. M.; TUCKER, S. S.; HAY, D. W.; TORPHY, T. J.; WASSERMAN, M. A. Is the guinea pig trachea a good *in vitro* model of human large and central airways? Comparison on leukotriene-, methacholine-, histamine- and antigen-induced contractions. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, n. 2, p. 467-473, 1987.

MULLERSHAUSEN, F.; LANGE, A.; MERGIA, E.; FRIEBE, A.; KOESLING, D. Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 1969-1974, 2006.

MURAD, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cGMP signal transduction system. **Advances in Pharmacology**, v. 26, p. 19-33, 1994.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.

MURTHY, K. S.; ZHOU, H.; GRIDER, J. R.; MAKHLOUF, G. M. Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. **American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 284, n. 6, p. G1006-G1016, 2003.

NEEDLEMAN, P.; MANNING, P. T. Interactions between the inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) pathways: implications for therapeutic intervention in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 7, n. 4, p. 367-370, 1999.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.

NIERI, P.; MARTINELLI, C.; BLANDIZZI, C.; BERNARDINI, N.; GRECO, R.; IPPOLITO, C.; DEL TACCA, M.; BRESCHI, M. C. Role of cyclooxygenase isoforms and nitric-oxide synthase in the modulation of tracheal motor responsiveness in normal and antigen-sensitized guinea pigs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 2, p. 648-656, 2006.

NUNES, Isabelle Karine da Costa. **Novos inibidores de fosfodiesterases 4 análogos de LASSBio-488 – desenho, síntese e análise comparativa de suas propriedades físico-químicas e cinéticas**. 2013. Tese (doutorado em Farmacologia e Química Medicinal) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

NUNES, I. K. DA C.; SOUZA, E. T. DE; CARDOZO, S. V. S.; CARVALHO, V. DE F.; ROMEIRO, N. C.; SILVA, P. M. R. E; MARTINS, M. A.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Synthesis, pharmacological profile and docking studies of new sulfonamides designed as phosphodiesterase-4 inhibitors. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0162895, 2016.

OLIVEIRA, G. A.; SILVA, B. A. Investigação do possível efeito espasmolítico dos derivados LASSBio-1624, 1847, 1849 e 1851. In: XXIV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPB, 24., 2016, João Pessoa. **Anais do [...]**. João Pessoa: Editora da UFPB, 2017. p. 325-325. Disponível em: http://www.propesq.ufpb.br/propesq/contents/downloads/enic/anais_xxiv_enic_catalogado_final.pdf. Acesso em: 18 dez. 2018.

ORDOÑEZ, C.; FERRANDO, R.; HYDE, D. M.; WONG, H. H.; FAHY, J. V. Epithelial desquamation in asthma: artifact or pathology? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, n. 6, p. 2324-2329, 2000.

PAGE, C. P.; SPINA, D. Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 3, 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.

PARLAK, A.; YILDIRIM, S.; BAGCIVAN, I.; DURMUS, N. Role of new agents affecting NO/cGMP pathway on ovalbumin-sensitized guinea pig trachea. **Experimental Lung Research**, v. 38, n. 8, p. 420-426, 2012.

PATEL, M.; SHAW, D. A review of standard pharmacological therapy for adult asthma – Steps 1 to 5. **Chronic Respiratory Disease**, v. 12, n. 2, p. 165-176, 2015.

PAUL, T.; SALAZAR-DEGRACIA, A.; PEINADO, V. I.; TURA-CEIDE, O.; BLANCO, I.; BARREIRO, E.; BARBERÀ, J. A. Soluble guanylate cyclase stimulation reduces oxidative stress in experimental chronic obstructive pulmonary disease. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0190628, 2018.

PAVORD, I. D.; GREEN, R. H.; HALDAR, P. Diagnosis and management of asthma in adults. In: SPIRO, S. G.; SILVESTRI, G. A.; AGUSTÍ, A. (Eds.) **Clinical Respiratory Medicine**. Filadélfia: Elsevier Saunders, p. 501-520, 2012.

PDB. **Protein Data Bank**. Disponível em: <https://www.rcsb.org/>. Acesso em: 17 fev. 2019.

PELAIA, G.; GALLELLI, L.; VATRELLA, A.; GREMBIALE, R. D.; MASELLI, R.; DE SARRO, G. B.; MARSICO, S. A. Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Life Sciences**, v. 70, n. 9, p. 977-990, 2002.

PELAIA, G.; RENDA, T.; GALLELLI, L.; VATRELLA, A.; BUSCETI, M. T.; AGATI, S.; CAPUTI, M.; CAZZOLA, M.; MASELLI, R.; MARSICO, S. A. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. **Respiratory Medicine**, v. 102, n. 8, p. 1173-1181, 2008.

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.

PEREZ-ZOGHBI, J. F.; KARNER, C.; ITO, S.; SHEPHERD, M.; ALRASHDAN, Y.; SANDERSON, M. J. Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 388-397, 2009.

PETERS-GOLDEN, M. Open mind, open airways: broadening the paradigm of prostaglandins and allergic airway inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 8, p. 1035-1036, 2002.

PIGATI, P. A.; RIGHETTI, R. F.; POSSA, S. S.; ROMANHOLO, B. S.; RODRIGUES, A. P. D.; DOS SANTOS, A. S. A.; XISTO, D. G.; ANTUNES, M. A.; PRADO, C. M.; LEICK, E. A.; MARTINS, M. de A.; ROCCO, P. R. M.; TIBÉRIO, I. F. L. C. Y-27632 is associated with corticosteroid-potentiated control of pulmonary remodeling and inflammation in guinea pigs with chronic allergic inflammation. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 15, n. 1, p. 85-100, 2015.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology**, v. 24, n. 6, p. 342-356, 2009.

QIN, L.; SANKARAN, B.; CASTEEL, D.; KIM, C. Crystal structure of cGMP-dependent protein kinase I α (PKG I α) catalytic domain. **Protein Data Bank**, DOI: 10.2210/pdb6BDL/pdb. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/6bdl>. Acesso em: 17 fev. 2019.

RAEBURN, David; GIEMBYCZ, Mark. A. **Airways smooth muscle: peptide receptors, ion channels, and signal transduction**. Boston: Birkhäuser Verlag, 1995.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BÁRÁNY; M. **Biochemistry of Smooth Contraction**. San Diego: Academic Press, 1. ed. 1996. p. 227-239.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.

RESSMEYER, A. R.; LARSSON, A. K.; VOLLMER, E.; DAHLEN, S. E.; UHLIG, S.; MARTIN, C. Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues. **European Respiratory Journal**, v. 28, n. 3, p. 603-611, 2006.

REYES-GARCÍA, J.; FLORES-SOTO, E.; SOLÍS-CHAGOYÁN, H.; SOMMER, B.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, V.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, L. M.; MONTAÑO, L. M. Tumor necrosis factor alpha inhibits L-type Ca^{2+} channels in sensitized guinea pig airway smooth muscle through ERK 1/2 pathway. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1-13, 2016.

RIBEIRO, Luciano Augusto de Araújo. **Estudo do efeito relaxante do ácido 8(17),12e,14-labdatrieno-18-oico (labdano-302): um novo diterpeno ativador da via da ciclase de adenilil?** 2007. Tese (doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

RICCIARDOLO, F. L. M. Multiple roles of nitric oxide in the airways. **Thorax**, v. 58, n. 2, p. 175-182, 2003.

RICCIARDOLO, F. L. M.; STERK, P. J.; GASTON, B.; FOLKERTS, G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 731-765, 2004.

RODRÍGUEZ-RAMOS, F.; GONZÁLEZ-ANDRADE, M.; NAVARRETE, A. Gnaphaliin A and B relax smooth muscle of guinea-pig trachea and rat aorta via phosphodiesterase inhibition. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 7, p. 926-935, 2011.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S29-S34, 2009.

RUBIN, A. S.; PEREIRA, C. A. C.; NEDER, J. A.; FITERMAN, J.; PIZZICHINI, M. M. M. Hiperresponsividade brônquica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 28 Supl. 3, p. S101-S121, 2002.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: an overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1-16, 2018.

SALVEMINI, D.; MISKO, T. P.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M. G.; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 15, p. 7240-7244, 1993.

SAUTEBIN, L.; ROSA, M. D. Nitric oxide modulates prostacyclin biosynthesis in the lung of endotoxin-treated rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 262, n. 1-2, p. 193-196, 1994.

SCHLEMPER, V.; CALIXTO, J. B. Nitric oxide pathway-mediated relaxant effect of bradykinin in the guinea-pig isolated trachea. **British Journal of Pharmacology**, v. 111, n. 1, p. 83-88, 1994.

SCHULTZ, W. H. Physiological studies in anaphylaxis 1. The reaction of smooth muscle of the guinea pig sensitized with horse serum. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 221-229, 1910.

SCHULZ, S.; YUEN, P. S. T.; GARBERS, D. L. The expanding family of guanylyl cyclases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 3, p. 116-120, 1991.

SEMMLER, J.; WACHTELL, 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.

SHERWIN, C. M.; CHRISTIANSEN, S. B.; DUNCAN, I. J.; ERHARD, H. W.; LAY, D. C.; MENCH, J. A.; O'CONNOR, C. E.; PETHERICK, J. C. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 81, n. 3, p. 291-305, 2003.

SHIKADA, K.; TANAKA, S. K^+ channel openers produce epithelium-dependent relaxation of the guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 282, n. 1-3, p. 193-197, 1995.

SMYTH, E. M.; GROSSER, T.; WANG, M.; YU, Y.; FITZGERALD, G. A. Prostanoids in health and disease. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S423-S428, 2009.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} 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.

SOUSA, C. T.; BRITO, T. S.; LIMA, F. J. B.; SIQUEIRA, R. J. B.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, A. A. M.; SANTOS, A. A.; HAVT, A. Sildenafil decreases rat tracheal hyperresponsiveness to carbachol and changes canonical transient receptor potential gene expression after antigen challenge. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 6, p. 562-572, 2011.

SOUSA, Johnatan Alisson de Oliveira. **Efeito gastroprotetor do LASSBio-596 em modelo experimental de gastrite aguda induzida por etanol**. 2018. Dissertação (mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

SOUZA, Éverton Tenório de. **Estudo para identificação de novos compostos sulfonamídicos e sulfonilidrazônicos eficazes no controle da inflamação pulmonar causada por LPS e sílica em camundongos**. 2015. Tese (doutorado em Farmacologia e Química Medicinal) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

SPINA, D. The potential of PDE4 inhibitors in respiratory disease. **Current Drug Target -Inflammation & Allergy**, v. 3, n. 3, p. 231-236, 2004.

STONE, J. R.; MARLETTA, M. A. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. **Biochemistry**, v. 33, n. 18, p. 5636-5640, 1994.

TAYLOR, C.; LAUDE, A. IP₃ receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. **Cell Calcium**, v. 32, n. 5-6, p. 321-334, 2002.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, n. 3, p. 215-242, 2005.

TIBÉRIO, I. F. L. C.; TURCO, G. M. G.; LEICK-MALDONADO, E. A.; SAKAE, R. S.; PAIVA, P. S. O.; WARTH, M. P. T. N.; LAPA E SILVA, J. R.; SALDIVA, P. H. N.; MARTINS, M. A. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 155, n. 5, p. 1739-1747, 1997.

TILLEY, S. L.; HARTNEY, J. M.; ERIKSON, C. J.; JANIA, C.; NGUYEN, M.; STOCK, J.; MCNEISCH, J.; VALANCIUS, C.; PANETTIERI, R. A.; PENN, R. B.; KOLLER, B. H. Receptors and pathways mediating the effects of prostaglandin E₂ on airway tone. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 284, n. 4, p. L599-L606, 2003.

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 11, n. 1, p. 310-316, 1987.

VASCONCELOS, L. H. C.; SILVA, M. C. C.; COSTA, A. C.; OLIVEIRA, G. A.; SOUZA, I. L. L.; QUEIROGA, F. R.; ARAUJO, L. C. C.; CARDOSO, G. A.; RIGHETTI, R. F.; SILVA, A. S.; DA SILVA, P. M.; CARVALHO, C. R. O.; VIEIRA, G. C.; TIBÉRIO, I. F. L. C.; CAVALCANTE, F. A.; SILVA, B. A. A guinea pig model of airway smooth muscle hyperreactivity induced by chronic allergic lung inflammation: contribution of epithelium and oxidative stress. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1-15, 2019.

VASSALLE, C.; DOMENICI, C.; LUBRANO, V.; L'ABBATE, A. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways in endothelial cells. **Journal of Vascular Research**, v. 40, n. 5, p. 491-499, 2003.

WACHTEL, H. Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 3, p. 267-272, 1983.

WADE, G. R.; SIMS, S. M. Muscarinic stimulation of tracheal smooth muscle cells activates large-conductance $\text{Ca}(2+)\text{-dependent K}^+$ channel. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 265, n. 3, p. C658-C665, 1993.

WAGENAAR, G. T. M.; HIEMSTRA, P. S.; GOSENS, R. Therapeutic potential of soluble guanylate cyclase modulators in neonatal chronic lung disease. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 309, n. 10, p. L1037-L1040, 2015.

WALSH, G. Novel therapies for asthma - advances and problems. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 23, p. 3027-3038, 2005.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13371-13373, 2002.

WATERMAN, S. Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 181-210, 2000.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 4, p. 201-206, 2003.

WEINBERG, J. B.; CHEN, Y.; JIANG, N.; BEASLEY, B. E.; SALERNO, J. C.; GHOSH, D. K. Inhibition of nitric oxide synthase by cobalamins and cobinamides. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, n. 12, p. 1626-1632, 2009.

WHITAKER, C. M.; BEAUMONT, E.; WELLS, M. J.; MAGNUSON, D. S. K.; HETMAN, M.; ONIFER, S. M. Rolipram attenuates acute oligodendrocyte death in the adult rat ventrolateral funiculus following contusive cervical spinal cord injury. **Neuroscience Letters**, v. 438, n. 2, p. 200-204, 2008.

WINTJENS, R.; BELRHALLI, H.; CLANTIN, B.; AZARKAN, M.; BOMPARD, C.; BAEYENS-VOLANT, D.; LOOZE, Y.; VILLERET, V. Crystal structure of papaya glutaminyl cyclase, an archetype for plant and bacterial glutaminyl cyclases. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, n. 2, p. 457-470, 2006.

WOLFERTSTETTER, S.; HUETTNER, J.; SCHLOSSMANN, J. cGMP-dependent protein kinase inhibitors in health and disease. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 2, p. 269-286, 2013.

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.

WOOLDRIDGE, A. A.; MACDONALD, J. A.; ERDODI, F.; MA, C.; BORMAN, M. A.; HARTSHORNE, D. J.; HAYSTEAD, T. A. J. Smooth muscle phosphatase is regulated *in vivo* by exclusion of phosphorylation of Threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34496-34504, 2004.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 397-407, 2005.

XIA, Y.; ZWEIER, J. L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 13, p. 6954-6958, 1997.

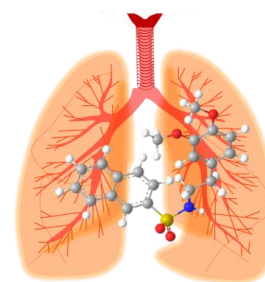
YAMAKAGE, M.; CHEN, X.; TSUJIGUCHI, N.; KAMADA, Y.; NAMIKI, A. Different inhibitory effects of volatile anesthetics on T- and L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels in porcine tracheal and bronchial smooth muscles: **Anesthesiology**, v. 94, n. 4, p. 683-693, 2001.

YAMAKAGE, M.; HIRSHMAN, C. A.; CROXTON, T. L. Sodium nitroprusside stimulates Ca^{2+} -activated K^{+} channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 270, n. 3, p. L338-L345, 1996.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZHANG, K. Y. J.; CARD, G. L.; SUZUKI, Y.; ARTIS, D. R.; FONG, D.; GILLETTE, S.; HSIEH, D.; NEIMAN, J.; WEST, B. L.; ZHANG, C.; MILBURN, M. V.; KIM, S. -H.; SCHLESSINGER, J.; BOLLAG, G. A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. **Molecular Cell**, v. 15, n. 2, p. 279-286, 2004.

ZASLONA, Z.; PETERS-GOLDEN, M. Prostanoids in asthma and COPD. **Chest**, v. 148, n. 5, p. 1300-1306, 2015.



Apêndices

APÊNDICE A – Valores de $E_{\max}$ e de pCE_{50} dos LASSBios-448, -1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629, -1625, -1613 e -1611 em traqueia isolada de cobaia do grupo controle pré-contraída com 10^{-6} M de CCh, na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBios	GC			
	E+		E–	
	$E_{\max}$ (%)	pCE_{50}	$E_{\max}$ (%)	pCE_{50}
-448 [@]	100	4,53 ± 0,12	100	4,36 ± 0,08
-1631	98,2 ± 11,7	4,30 ± 0,10	100,7 ± 10,2	4,63 ± 0,09
-1630	111,7 ± 6,2	4,82 ± 0,24	130,5 ± 9,3	4,60 ± 0,14
-1612	110,9 ± 7,1	5,28 ± 0,07	94,3 ± 4,6	4,44 ± 0,18
-1610	124,3 ± 7,0	4,97 ± 0,07	105,1 ± 10,0	5,33 ± 0,10 ^{\$}
-1628	104,9 ± 1,3	5,60 ± 0,16 [#]	135,6 ± 7,4 ^{&}	5,85 ± 0,18 ^{\$}
-1623	103,4 ± 4,8	5,76 ± 0,25 [#]	113,7 ± 3,6	6,10 ± 0,25 ^{\$}
-1622	147,2 ± 16,1 [*]	3,90 ± 0,005	130,6 ± 7,8	4,04 ± 0,14
-1722	125,7 ± 6,7	4,26 ± 0,05	116,4 ± 6,2	4,45 ± 0,04
-1629	111,7 ± 10,7	4,32 ± 0,13	116,0 ± 8,0	4,39 ± 0,20
-1625	120,0 ± 9,1	5,40 ± 0,16 [#]	107,4 ± 1,5	5,92 ± 0,16 ^{\$}
-1613	102,2 ± 8,2	6,49 ± 0,20 [#]	99,2 ± 6,9	6,32 ± 0,18 ^{\$}
-1611	108,6 ± 5,6	6,78 ± 0,22 ^{#§}	115,7 ± 3,6	7,50 ± 0,18 ^{\$f}

ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey, [E+ * p < 0,05 (LASSBio-1622 vs. LASSBio-448); [#] p < 0,05 (LASSBios-1628, -1623, -1625, -1613, e -1611 vs. LASSBio-448); [§] p < 0,05 (LASSBio-1611 vs. LASSBios-1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629 e -1625)] e [E– & p < 0,05 (LASSBio-1628 vs. LASSBio-448); ^{\$} p < 0,05 (LASSBios-1610, -1628, -1623, -1625, -1613, e -1611 vs. LASSBio-448); ^f p < 0,05 (LASSBio-1611 vs. LASSBios-1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629, -1625 e -1613)], n = 3-5. GC = grupo controle; E+ = presença de epitélio funcional; E-) = ausência de epitélio funcional. [@]Os resultados do LASSBio-448 foram obtidos por Martins (2016) em seu trabalho de tese.

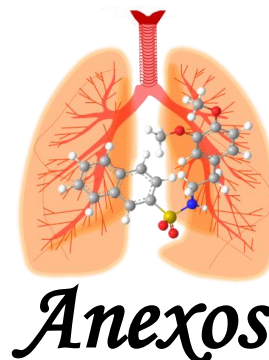
Fonte: Silva, 2019.

APÊNDICE B – Valores de $E_{\max}$ e de pCE_{50} dos LASSBios-448, -1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629, -1625, -1613 e -1611 em traqueia isolada de cobaia do grupo IPAC pré-contráda com 10^{-6} M de CCh, na presença e na ausência de epitélio funcional.

LASSBios	GIPAC			
	E+		E–	
	$E_{\max}$ (%)	pCE_{50}	$E_{\max}$ (%)	pCE_{50}
-448	119,0 ± 8,1	4,98 ± 0,17*	119,9 ± 9,3	4,94 ± 0,14 ^{&}
-1631	102,7 ± 17,5	4,16 ± 0,11	115,9 ± 11,4	3,99 ± 0,06
-1630	113,7 ± 12,6	4,79 ± 0,06	127,0 ± 11,9	4,37 ± 0,14
-1612	123,8 ± 8,3	4,79 ± 0,19	108,3 ± 3,2	4,96 ± 0,08
-1610	108,7 ± 11,8	5,08 ± 0,21	98,3 ± 4,1	5,12 ± 0,18
-1628	117,0 ± 7,4	5,22 ± 0,21	108,3 ± 5,7	6,02 ± 0,21 ^{\$}
-1623	128,3 ± 4,8	5,15 ± 0,16	112,9 ± 6,6	6,78 ± 0,07 ^{\$}
-1622	104,0 ± 7,0	4,15 ± 0,09	114,5 ± 12,9	4,07 ± 0,09
-1722	125,3 ± 9,7	4,72 ± 0,08	143,6 ± 15,6	4,69 ± 0,07
-1629	99,2 ± 10,0	4,25 ± 0,16	121,2 ± 4,2	5,29 ± 0,16
-1625	107,4 ± 5,2	6,63 ± 0,24 ^{#∞}	116,3 ± 7,0	5,32 ± 0,13
-1613	107,3 ± 7,7	5,99 ± 0,13 [#]	118,9 ± 6,1	6,23 ± 0,29 ^{\$}
-1611	112,6 ± 11,4	6,61 ± 0,17 ^{#∞}	118,3 ± 8,2	7,70 ± 0,13 ^{\$∞}

ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey, [E+ * $p < 0,05$ (LASSBio-448 vs. LASSBios-1631); [#] $p < 0,05$ (LASSBios-1625, -1613 e -1611 vs. LASSBio-448); [∞] $p < 0,05$ (LASSBios-1625 e -1611 vs. LASSBios-1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722 e -1629)] e [E– [&] $p < 0,05$ (LASSBio-448 vs. LASSBios-1631 e -1622); ^{\$} $p < 0,05$ (LASSBios-1628, -1623, -1613 e -1611 vs. LASSBios-448); ³ $p < 0,05$ (LASSBio-1611 vs. LASSBios-1631, -1630, -1612, -1610, -1628, -1623, -1622, -1722, -1629, -1625 e -1613)], $n = 3-5$. GIPAC = grupo com inflamação pulmonar alérgica crônica; E+ = presença de epitélio funcional; E– = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Silva, 2019.



ANEXO A – Cópia da certidão de aprovação do Projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animal.



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



CERTIDÃO

João Pessoa, 11 de Junho de 2015.
CEUA nº 018/2015.

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

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **30/04/2015** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **ESTABELECIMENTO DE UMA POSSÍVEL RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE RELAXANTE DE DERIVADOS DO LASSBIO-448, UM ANÁLOGO DO ROLIPRAM, EM TRAQUEIA ISOLADA DE COBAIA NÃO ASMÁTICO E ASMÁTICO.**

Com previsão de empregar **180 cobaias (*Cavia porcellus*)**.

Animais do **Biotério do Prof. Thomas George**.

Para serem utilizados no período de **11/06/2015 a 31/12/2019**.

Atenciosamente,

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

ANEXO B – Artigo publicado na revista *Frontiers in Pharmacology*, FI: 3,831, em 2019.

A Guinea Pig Model of Airway Smooth Muscle Hyperreactivity Induced by Chronic Allergic Lung Inflammation: Contribution of Epithelium and Oxidative Stress

Luiz Henrique César Vasconcelos^{1†}, **Maria da Conceição Correia Silva^{1†}**, Alana Cristina Costa², Giuliana Amanda de Oliveira², Iara Leão Luna de Souza¹, Fernando Ramos Queiroga¹, Layanne da Cunha Araujo³, Glêbia Alexa Cardoso⁴, Renato Fraga Righetti^{5,6}, Alexandre Sérgio Silva^{4,7}, Patrícia Mirella da Silva^{1,8}, Carla Roberta de Oliveira Carvalho^{3,9}, Giciane Carvalho Vieira¹⁰, Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério⁵, Fabiana de Andrade Cavalcante^{1,11} and Bagnólia Araújo da Silva^{1,12*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Helke Wulff,

University of California, Davis,
United States

Reviewed by:
Paolo Montuschi,
Catholic University of Sacred Heart,
Italy
Thomas Taylor-Clark,
University of South Florida,
United States

***Correspondence:**
Bagnólia Araújo da Silva
bagnolia@tf.ufpb.br

[†] These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to
Respiratory Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 16 January 2018
Accepted: 18 December 2018
Published: 24 January 2019

Citation:
Vasconcelos LHC, Silva MCC,
Costa AC, Oliveira GA, Souza ILL,
Queiroga FR, Araujo LC, Cardoso GA,
Righetti RF, Silva AS, da Silva PM,
Carvalho GRO, Vieira GC, Tibério
IFLC, Cavalcante FA and Silva BA
(2019) A Guinea Pig Model of Airway
Smooth Muscle Hyperreactivity
Induced by Chronic Allergic Lung
Inflammation: Contribution
of Epithelium and Oxidative Stress.
Front. Pharmacol. 9:1547.
doi: 10.3389/fphar.2018.01547

¹ Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ² Graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ³ Programa de Pós-graduação em Ciências (Fisiologia Humana), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁴ Programa Associado de Pós-graduação em Educação Física, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ⁵ Programa Associado de Pós-graduação em Educação Física, Universidade do Pernambuco, Recife, Brazil, ⁶ Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁷ Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil, ⁸ Departamento de Educação Física, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ⁹ Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ¹⁰ Departamento de Biofísica e Fisiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ¹¹ Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ¹² Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

Asthma is a heterogeneous disease of the airways characterized by chronic inflammation associated with bronchial and smooth muscle hyperresponsiveness. Currently, different murine models for the study of asthma show poor bronchial hyperresponsiveness due to a scarcity of smooth muscle and large airways, resulting in a failure to reproduce smooth muscle hyperreactivity. Thus, we aimed to standardize a guinea pig model of chronic allergic lung inflammation mimicking airway smooth muscle hyperreactivity observed in asthmatics (Asth). Animals were randomly divided into a control group (Ctrl), which received saline (0.9% NaCl), and the Asth group, subjected to *in vivo* sensitization with ovalbumin (OVA) nebulization. Morphological analysis was performed by hematoxylin-eosin staining. Bronchial hyperresponsiveness was evaluated by nebulization time in the fifth, sixth, and seventh inhalations (NT5-7) and tracheal isometric contractions were assessed by force transducer. Total antioxidant capacity was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and protein expression by Western blot. Histologically, the Asth group developed peribronchial cellular infiltrate, epithelial hyperplasia and smooth muscle thickening. After the fourth nebulization, the Asth group developed bronchial hyperreactivity. The trachea from the Asth group contracted after *in vitro* stimulation with OVA, differing from the Ctrl group, which showed no response. Additionally, airway smooth muscle

ANEXO C – Artigo publicado na revista *Frontiers in Physiology*, FI: 3,394, em 2018.

ORIGINAL RESEARCH
published: 31 October 2018
doi: 10.3389/fphys.2018.01522



Aortic Response to Strength Training and *Spirulina platensis* Dependent on Nitric Oxide and Antioxidants

Aline de Freitas Brito^{1,2*}, Alexandre S. Silva^{2,3}, Alesandra A. de Souza⁴, Paula B. Ferreira⁵, Iara L. L. de Souza⁵, Layanne C. da Cunha Araujo⁶, Gustavo da Silva Félix², Renata de Souza Sampaio⁵, **Maria da Conceição C. Silva⁵**, Renata L. Tavares⁷, Reabias de Andrade Pereira², Manoel Miranda Neto⁷ and Bagnólia A. da Silva^{5,8}

OPEN ACCESS

Edited by:

Lacolley Patrick,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM),
France

Reviewed by:

Mario Kassmann,
Charité Universitätsmedizin Berlin,
Germany
Graziemaria Corbi,
University of Molise, Italy
Valérie Nivet-Antoine,
Université Paris Descartes, France

*Correspondence:

Aline de Freitas Brito
alineebrito@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Vascular Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 09 June 2018

Accepted: 11 October 2018

Published: 31 October 2018

Citation:

Brito AdF, Silva AS, de Souza AA,
Ferreira PB, de Souza ILL,
Araujo LCdC, Félix GdS,
Sampaio RdS, Silva MdCC,
Tavares RL, Pereira RdA, Miranda
Neto M and da Silva BA (2018) Aortic
Response to Strength Training and
Spirulina platensis Dependent on
Nitric Oxide and Antioxidants.
Front. Physiol. 9:1522.
doi: 10.3389/fphys.2018.01522

¹ School of Physical Education, University of Pernambuco, Recife, Brazil, ² Post-Graduation Program in Physical Education UPE/UFPB, Recife, Brazil, ³ Physical Education Department, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, ⁴ Federal University of Tocantins, Licenciatura in Physical Education, Tocantinópolis, Brazil, ⁵ Postgraduate Program in Natural and Synthetic Products Bioactive, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, ⁶ Department of Biophysics and Physiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁷ Laboratory of Studies of Physical Training Applied to the Performance and the Health, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, ⁸ Pharmaceutical Sciences Department, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Studies have shown that supplementation with *Spirulina platensis* improves vascular reactivity. However, it is unclear whether in association with strength training this effect can be enhanced. Thus, this study aimed to determine the effects of strength training and *S. platensis* on the reactivity of the aorta from Wistar rat and the possible mechanisms involved. The animals were supplemented with *S. platensis* and divided into sedentary (SG, SG50, SG150, and SG500) and trained groups (TG, TG50, TG150, and TG500). Nitrite, malondialdehyde (MDA) and antioxidant activity were determined by biochemical assays. To evaluate vascular response, cumulative concentration—response curves to phenylephrine (PHE) and acetylcholine (ACh) were constructed. L-NAME was used to assess the participation of nitric oxide (NO). It was observed that the PHE contractile potency was reduced in TG50, TG150, and TG500 groups compared to SG50, SG150, and SG500 groups, respectively. However, the presence of L-NAME increased the contractile response in all groups. Strength training potentiated the increase in relaxing activity induced by *S. platensis*, where the pCE₅₀ values of ACh increased in TG150 and TG500. These responses were accompanied by increased nitrite production, MDA reduction and increased antioxidant activity in the aorta of both TG150 and TG500 groups. Thus, the present study demonstrated that combined with strength training, *S. platensis* potentiates vascular improvement through the participation of NO and reduction of oxidative stress.

Keywords: *Spirulina platensis*, exercise, vasorelaxation, vasoconstriction, antioxidant activity

ANEXO D – Artigo publicado na revista *European Journal of Pharmacology*, FI: 3,040, em 2015.

European Journal of Pharmacology 767 (2015) 52–60



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar



Pulmonary, gastrointestinal and urogenital pharmacology

Flavonoid galetin 3,6-dimethyl ether attenuates guinea pig ileum contraction through K^+ channel activation and decrease in cytosolic calcium concentration



Luiz H.C. Vasconcelos^a, Ana C. de C. Correia^a, Iara L.L. de Souza^a, **Maria da C.C. Silva^a**,
Edgar J. Paredes-Gamero^b, Bárbara V. de O. Santos^{a,c}, Fabiana de A. Cavalcante^{a,d,*},
Bagnólia A. da Silva^{a,c}

^a Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil

^b Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, 04021-001 São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil

^d Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2015

Received in revised form

23 September 2015

Accepted 2 October 2015

Available online 8 October 2015

Keywords:

Calcium

Flavonoid

Galetin 3,6-dimethyl ether

Ileum

Potassium channels

Chemical compounds studied in this article:

Galetin-3,6-dimethyl ether (PubChem CID: 5352032)

calcium chloride (PubChem CID: 6093260)

potassium chloride (PubChem CID: 4873)

histamine (PubChem CID: 774)

carbachol (PubChem CID: 5831)

apamin (PubChem CID: 16218850)

glibenclamide (PubChem CID: 3488)

cesium chloride (PubChem CID: 24293)

S-(−)-Bay K8644 (PubChem CID: 2303)

tetraethylammonium chloride (CID: 5413)

verapamil (PubChem CID: 62969)

and 4-aminopyridine (PubChem 4-AP) (CID: 1727).

ABSTRACT

Flavonoid galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL) has been isolated from the aerial parts of *Piptadenia stipulacea* and has shown a spasmolytic effect in guinea pig ileum. Thus, we aimed to characterize its relaxant mechanism of action. FGAL exhibited a higher relaxant effect on ileum pre-contracted by histamine ($EC_{50} = 1.9 \pm 0.4 \times 10^{-7}$ M) than by KCl ($EC_{50} = 2.6 \pm 0.5 \times 10^{-6}$ M) or carbachol ($EC_{50} = 1.8 \pm 0.4 \times 10^{-6}$ M). The flavonoid inhibited the cumulative contractions to histamine, as well as to $CaCl_2$ in depolarizing medium nominally Ca^{2+} -free. The flavonoid relaxed the ileum pre-contracted by S-(−)-Bay K8644 ($EC_{50} = 9.5 \pm 1.9 \times 10^{-6}$ M) but less potently pre-contracted by KCl or histamine. CsCl attenuated the relaxant effect of FGAL ($EC_{50} = 1.1 \pm 0.3 \times 10^{-6}$ M), but apamin or tetraethylammonium (1 mM) had no effect ($EC_{50} = 2.6 \pm 0.2 \times 10^{-7}$ and $1.6 \pm 0.3 \times 10^{-7}$ M, respectively), ruling out the involvement of small and big conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (SK_{Ca} and BK_{Ca} , respectively). Either 4-aminopyridine or glibenclamide attenuated the relaxant effect of FGAL ($EC_{50} = 1.8 \pm 0.2 \times 10^{-6}$ and $1.5 \pm 0.5 \times 10^{-6}$ M, respectively), indicating the involvement of voltage- and ATP-sensitive K^+ channels (K_V and K_{ATP} , respectively). FGAL did not alter the viability of intestinal myocytes in the MTT assay and decreased (88%) Fluo-4 fluorescence, indicating a decrease in cytosolic Ca^{2+} concentration. Therefore, the relaxant mechanism of FGAL involves pseudo-irreversible noncompetitive antagonism of histaminergic receptors, K_V and K_{ATP} activation and blockade of Ca_V1 , thus leading to a reduction in cytosolic Ca^{2+} levels.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Natural products have historically played an important role in the processes of drug discovery and development, including a key part in pharmacological research and health protection (Newman

and Cragg, 2012). Accordingly, plant derivatives are of scientific importance because they have contributed to many advances in science and industry (McChesney et al., 2007).

The species *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke (Fabaceae) is a tree of the caatinga biome in Northeast Brazil, popularly known as “jurema-branca” (Fabricante and Andrade, 2007), “jurema-malícia-da-serra”, “carcará” and “calumbi” (Florentino et al., 2007). In folk medicine, its bark and leaves are used as decoctions or tinctures to treat wounds (Albuquerque and Andrade, 2002). Additionally, this species is effective in treating inflammatory

* Correspondence to: Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, PO Box: 5009, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

E-mail address: fabianacavalcante@ufpb.br (F.d.A. Cavalcante).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.007>

0014-2999/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO E – Artigo publicado na revista *BMC Complementary and Alternative Medicine*, FI: 2,109, em 2015.

Souza et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2015) 15:327
DOI 10.1186/s12906-015-0849-3



Complementary & Alternative Medicine

RESEARCH ARTICLE

Open Access



CrossMark

Essential oil from *Xylopi*a frutescens Aubl. reduces cytosolic calcium levels on guinea pig ileum: mechanism underlying its spasmolytic potential

Iara Leão Luna de Souza¹, Ana Carolina de Carvalho Correia², Laysanne Cabral da Cunha Araujo³, Luiz Henrique César Vasconcelos¹, **Maria da Conceição Correia Silva¹**, Vicente Carlos de Oliveira Costa⁴, Josean Fachine Tavares^{1,4}, Edgar Julian Paredes-Gamero⁵, Fabiana de Andrade Cavalcante^{1,4,6*} and Bagnólia Araújo da Silva^{1,4}

Abstract

Background: *Xylopi*a frutescens Aubl. (embira, semente-de-embira or embira-vermelha), is used in folk medicine as antidiarrheal. The essential oil from its leaves (XF-EO) has been found to cause smooth muscle relaxation. Thus, the aim of this study was to investigate the spasmolytic action by which XF-EO acts on guinea pig ileum.

Methods: The components of the XF-EO were identified by gas chromatography-mass spectrometry. Segments of guinea pig ileum were suspended in organ bath containing modified Krebs solution at 37 °C, bubbled with carbogen mixture under a resting tension of 1 g. Isotonic contractions were registered using kymographs and isometric contractions using force transducer coupled to an amplifier and computer. Fluorescence measurements were obtained with a microplate reader using Fluo-4.

Results: Forty-three constituents were identified in XF-EO, mostly mono- and sesquiterpenes. XF-EO has been found to cause relaxation on guinea pig ileum. The essential oil inhibited in a concentration-dependent manner both CCh- and histamine-induced phasic contractions, being more potent on histamine-induced contractions as well as antagonized histamine-induced cumulative contractions in a non-competitive antagonism profile. XF-EO relaxed in a concentration-dependent manner the ileum pre-contracted with KCl and histamine. Since the potency was smaller in organ pre-contracted with KCl, it was hypothesized that XF-EO would be acting as a K⁺ channel positive modulator. In the presence of CsCl (non-selective K⁺ channel blocker), the relaxant potency of XF-EO was not altered, indicating a non-participation of these channels. Moreover, XF-EO inhibited CaCl₂-induced cumulative contractions in a depolarizing medium nominally without Ca²⁺ and relaxed the ileum pre-contracted with S(-)-Bay K8644 in a concentration-dependent manner, thus, was confirmed the inhibition of Ca²⁺ influx through Ca_v1 by XF-EO. In cellular experiments, the viability of longitudinal layer myocytes from guinea pig ileum was not altered in the presence of XF-EO and the Fluo-4-associated fluorescence intensity in these intestinal myocytes stimulated by histamine was reduced by the essential oil, indicating a [Ca²⁺]_i reduction.

Conclusion: Spasmolytic action mechanism of XF-EO on guinea pig ileum can involve histaminergic receptor antagonism and Ca²⁺ influx blockade, which results in [Ca²⁺]_i reduction leading to smooth muscle relaxation.

Keywords: *Xylopi*a frutescens, Essential oil, Spasmolytic action, Guinea pig ileum, Calcium

* Correspondence: fabianacavalcante@ltf.ufpb.br

¹Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos/Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Souza et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

ANEXO F – Capítulo de livro publicado no livro Saúde – Os Desafios do Mundo Contemporâneo, em 2018.

AS INTERFACES DO PROCESSO FISIOPATOLÓGICO DA ASMA

CAPÍTULO 42

AS INTERFACES DO PROCESSO FISIOPATOLÓGICO DA ASMA

Luiz Henrique César VASCONCELOS ¹

Maria da Conceição Correia SILVA ¹

Iara Leão Luna de SOUZA ¹

Fabiana de Andrade CAVALCANTE ^{2,3}

Bagnólia Araújo da SILVA ^{3,4}

¹ Doutorando do PPgPNSB/CCS/UFPB; ² Professora do DFP/CCS/UFPB;

³ Orientadora/Pesquisadora do PgPNSB/CCS/UFPB; ⁴ Professora do DCF/CCS/UFPB.

henrique.lui89@lftf.ufpb.br

bagnolia@lftf.ufpb.br

RESUMO: a asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas caracterizada pela limitação variável e reversível do fluxo expiratório. Clinicamente, evidencia-se pela presença de tosse, espirros, sibilos e opressão torácica resultantes da hiper-responsividade brônquica. Sua origem apresenta determinantes genéticos, e suas manifestações dependem da exposição a alérgenos ambientais, prática de exercícios físicos e mudanças climáticas. Seu diagnóstico baseia-se no perfil sintomático associado a testes de desafio brônquico e avaliação da função pulmonar. A asma resulta de uma ativação e diferenciação de linfócitos Th2, os quais liberam citocinas, como interleucina-4 (IL-4), IL-5 e IL-13, que promovem a produção de imunoglobulinas E e o recrutamento de eosinófilos, os quais liberam o conteúdo citotóxico de seus grânulos citoplasmáticos, como a proteína básica principal, a peroxidase e a proteína catiônica eosinofílica, que promovem dano às vias aéreas. Também ocorre metaplasia epitelial em células caliciformes produtoras de muco, fibrose subepitelial e espessamento muscular liso das vias aéreas de condução, caracterizando o remodelamento. Todavia, a doença apresenta diferentes fenótipos, dependentes dos diferentes