

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**ITALO ROSSI ROSENO MARTINS**

**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**

**João Pessoa - PB**

**2016**

**ITALO ROSSI ROSENO MARTINS**

**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**

**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 um dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA**

**Orientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva**

**João Pessoa - PB**

**2016**

M386a 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 / Italo Rossi Roseno Martins.- João Pessoa, 2016.

219f. : il.

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. Asma. 3. N-sulfonilidrazônicos.  
4. Atividade relaxante. 5. cAMP. 6. Inibidores de PDE4.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

**ITALO ROSSI ROSENO MARTINS**

**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**

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

**Prof. Dr. Claudio Roberto Bezerra dos Santos  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador externo**

---

**Prof. Dr. Joelmir Lucena Veiga da Silva  
(Universidade Nove de Julho/SP)  
Examinador externo**

---

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

# ***Dedicatória***

---

---



Aos meus pais, Benedito Martins Filho e Maria Zilá Roseno Martins, por todo empenho e amor que tiveram por mim em todos os momentos de minha vida, por acreditarem no caminho que escolhi para minha vida e sempre o apoiarem.

Aos meus irmãos, Priscilla Karla Roseno Martins e Lucas Vinícius Roseno Martins, pelo suporte, momentos de desabafo e, de todas as maneiras possíveis, quererem o meu bem e minha felicidade. Por sempre estarem na torcida e acreditando na minha vitória.

À Joedna Pereira, namorada, amiga e parceira que sempre se fez presente e está ao meu lado de maneira incondicional e irrestrita. Uma companheira que sei que posso contar em todas as situações e que me completa a cada dia mais. E sei que a recíproca é verdadeira.

# ***Agradecimientos***



À Deus não só pelas conquistas, mas, principalmente pelos desafios colocados em minha vida, por ter me concedido a coragem, paciência e disposição para assim encontrar a melhor saída possível, que nem sempre é a vitória, mas que sempre nos deixa um aprendizado para a vida. Por mostrar que com tempo e perseverança toda e qualquer barreira pode ser transposta, que posso ser o dono do meu destino e capitão de minha alma.

À minha orientadora, Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva pelo exemplo de moral e conduta que possui, sempre nos estimulando a superar nossos limites e nos conhecermos cada vez mais, nos instigando a desenvolver capacidades que até então achávamos não possuir. Um molde de profissional e mestre que todos deveriam seguir, orientando não somente para a vida acadêmica, mas também para o mundo que encontramos fora dos muros da universidade.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante por todo empenho e solicitude a mim desprendidos. Por sempre estar disposta a ajudar e contribuir no desenvolvimento não só deste trabalho, mas também para a resolução de qualquer problemática inerente ao dia a dia do laboratório.

Aos Professores Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro e Dra. Lídia Moreira Lima, bem como a sua aluna Dra. Isabelle Karine da Costa Nunes, pela gentileza em ceder os compostos utilizados neste trabalho.

Aos Professores Dra. Barbara Viviana de Oliveira Santos, Dr. Claudio Roberto Bezerra dos Santos, Dr. Joelmir Lucena Veiga da Silva e Dr. Robson Cavalcante Veras por aceitarem participar da banca examinadora da defesa e aos Professores Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima e Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire por aceitarem participar dessa banca como suplente. Agradeço por todas as suas contribuições nessa etapa tão importante na minha formação acadêmica.

À todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, entre eles, Alana Cristina Costa, Aline de Freitas Brito, Ana Carolina de Carvalho Correia, Ana Caroline de Lima Silva, Anne Kaliery de Abreu Alves, Antônio Raphael Cavalcanti, Barbara Cavalcanti, Cibério Landim Macêdo, Cybelle Navarro Silva, Daniele Janebro, Elba Ferreira, Fabio Monteiro, Fabrício Garcia, Fernando Ramos Queiroga, Filipe Rodolfo de Oliveira, Giuliana

Amanda, Giulyane Targino Moreno, Hannah Olga, Kimã Barbosa, Iara Leão de Souza, José Lucas Galvão, Joelmir Lucena Veiga da Silva, José Rabelo, Juliana da Nóbrega Carreiro, Layanne Cabral da Cunha Araújo, Marcela Silva, Maria Alice Miranda Bezerra Medeiros, Maria da Conceição Correia Silva, Massilon da Silva Moreira dos Santos Júnior, Núbia Melo de Sousa, Polyana Cristina B. Silva, Rafael de Almeida Travassos, Sarah Rebeca Ferreira, Tamyris Freires Ferreira e Thiago Melo pela ajuda, amizade e boa convivência.

À Millena de Melo Medeiros, em especial, por ter contribuído mais que diretamente para a realização deste trabalho, pelos inúmeros momentos e horas que me auxiliou e desprendeu na realização de boa parte dos experimentos aqui constantes. Você foi essencial para que este trabalho tenha se concretizado.

Ao Luiz Henrique César Vasconcelos por ter me auxiliado na obtenção de fração significativa dos dados presentes aqui, pelas discussões acerca de metodologias e pontos de vistas úteis no desenvolvimento e maturação desta tese.

À Joedna Pereira, Paula Benvindo e Renata Sampaio pelos bons papos e momentos de descontração essenciais para o alívio das tensões inerentes ao desenvolvimento da pesquisa científica. Também por terem me auxiliado na etapa de confecção do material escrito desta tese. Sem vocês a caminhada teria sido bem mais árdua.

Ao Luiz Henrique Agra pela boa vontade e disponibilidade, por ter vindo em pleno final de semana no período de férias, e me auxiliado na parte experimental de dosagem de cAMP presente neste trabalho.

À amiga/irmã Gislaine Alves de Oliveira por sempre estar na torcida por meu sucesso e, independente da distância, sei que nossa amizade se perpetuará por através dos tempos.

À Milena Ramos Reis, colega de turma no mestrado e amiga para mais de uma vida. Nossos laços se estreitaram por motivos diversos, mas desde então a amizade é verdadeira e recíproca. Obrigado por sempre estar em contato e pelos momentos de trocas de pensamentos e visões de mundo.

À Rosimeire Ferreira dos Santos, uma das primeiras pessoas a me introduzir ao mundo científico e que até hoje está presente em minha vida, sempre na torcida e no apoio. Esta vitória também é sua.

A todos os colegas e amigos da turma do Doutorado 2012 do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) pelos bons momentos e experiências compartilhadas.

Aos professores deste Programa de Pós-graduação que contribuíram tanto com a minha formação acadêmica.

À Coordenação do PPgPNSB em nome do Professor Dr. Josean Fachine Tavares pela competência com que coordenam este Programa.

Às funcionárias da coordenação da pós-graduação Caroline Manguiera e Dayana Brandão, por toda dedicação e eficiência.

Ao José Crispim Duarte pela competência e auxílio técnico nos mais variados problemas no Laboratório e no Biotério.

Ao Luís Cordeiro e Adriano Cordeiro pela colaboração no Biotério e no laboratório, por sua prestatividade e dedicação aos trabalhos do PgPNSB.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida e pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos, respectivamente.

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

À todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção desta tese de doutorado.

Muitíssimo obrigado!

**Italo Rossi Roseno Martins**

# ***Resumo***

---

A asma é uma doença caracterizada por inflamação crônica e hiper-responsividade reversível das vias aéreas, apresentando uma farmacoterapia bem estabelecida. No entanto, devido a heterogeneidade dessa enfermidade, alguns pacientes não respondem apropriadamente ao tratamento. Assim, visando ajudar no processo de desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antiasmáticos, decidiu-se avaliar a possível ação relaxante de uma série de derivados *N*-sulfonilidrazônicos inibidores de PDE4 (LASSBio-448, -1624, -1832, -1846, -1847, -1848, -1849, -1850 e -1851) em um modelo funcional de traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos, bem como elucidar o mecanismo de ação do derivado mais promissor. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEUA/UFPB (certidão 0610/11). Inicialmente, realizou-se a implantação e padronização de um modelo de asma em cobaias utilizando ovalbumina (OVA) como agente sensibilizador, onde se observou histologicamente, alterações morfológicas inerentes ao quadro asmático, como hipertrofia da camada muscular lisa, presença de infiltrado de células inflamatórias e anormalidades vasculares. Além disso, os anéis de traqueia de cobaias sensibilizados mostraram-se responsivos à OVA, diferente dos não sensibilizados. Funcionalmente, o agonista contrátil CCh apresentou potências e eficácias relativas similares entre os animais não asmáticos e asmáticos, diferentemente do que se observou para o agonista contrátil histamina, que demonstrou ser equipotente entre os dois grupos de animais, mas com uma maior eficácia nos animais asmáticos. Por sua vez, os agonistas relaxantes aminofilina e isoprenalina apresentaram potências e eficácias relativas similares entre os animais não asmáticos e asmáticos. De modo geral, na etapa de triagem farmacológica dos derivados *N*-sulfonilidrazônicos, estes apresentaram um efeito relaxante equipotente e independente dos fatores relaxantes derivados do epitélio tanto nos animais não asmáticos quanto nos asmáticos, com exceção do LASSBio-1850 que mostrou apenas uma eficácia moderada (< 50%) e o LASSBio-1847 que apresentou um incremento de potência de cerca de 4 vezes nos animais asmáticos. Dentre os derivados avaliados, o LASSBio-1632, -1846 e -1847 foram os de maior potência farmacológica nos animais asmáticos, sendo esse último o mais promissor e selecionado para a etapa de caracterização do mecanismo de ação nos cobaias não asmáticos e asmáticos. Como o LASSBio-1847 foi sintetizado como um inibidor das PDE4, uma enzima que hidrolisa o cAMP, e os receptores adrenérgicos- $\beta_2$  são um dos principais responsáveis pela sinalização que leva a produção desse segundo mensageiro no músculo liso das vias aéreas, utilizou-se o propranolol, um bloqueador adrenérgico- $\beta$  não seletivo, para avaliar a participação desses receptores. Observou-se que houve desvio da curva de relaxamento do LASSBio-1847 para a direita evidenciando a participação dos receptores adrenérgico- $\beta$  em ambos os grupos de animais. Como esses receptores levam a ativação da adenilil ciclase (AC), decidiu-se investigar o envolvimento da mesma no efeito relaxante do LASSBio-1847. Para tanto, utilizou-se a forskolina, um ativador de AC, e evidenciou-se que a curva de relaxamento da forskolina na presença do derivado foi deslocada para a esquerda em cerca de 54 e 4 vezes nos animais não asmáticos e asmáticos, respectivamente, mostrando que o LASSBio-1847 poderia agir sinergicamente ou favorecer a ativação da AC. A ativação do receptor adrenérgico- $\beta_2$ /AC leva a produção de cAMP que é contrabalaneada por sua hidrólise via PDEs. Para avaliar o envolvimento dessas enzimas, utilizou-se a aminofilina, um inibidor não seletivo de PDEs. A curva-concentração resposta à aminofilina foi desviada para a esquerda na presença do LASSBio-1847 com potencialização do efeito em torno de 147 e 4 vezes, nos animais não asmáticos e asmáticos, respectivamente, sugerindo que o efeito do derivado ocorre por uma possível inibição de PDEs. O efetor da via receptor adrenérgico- $\beta_2$ /AC/cAMP é a PKA, assim para confirmar a modulação positiva dessa via utilizou-se o H-89, um inibidor da PKA, e observou-se que houve uma atenuação na resposta relaxante do derivado, confirmando a modulação dessa via. Até o momento, todos os achados nos indicaram um possível aumento na  $[cAMP]_c$  e para confirmar essa hipótese foi realizado a medida dos níveis teciduais de cAMP por ELISA, que demonstrou que o LASSBio-1847 realmente eleva a  $[cAMP]_c$ , numa magnitude similar ao rolipram, em ambos os grupos de animais. Assim, ficou estabelecido a implantação do modelo de asma em cobaias, além de se evidenciar que os derivados *N*-sulfonilidrazônicos avaliados possuem atividade relaxante em traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos de forma independente de epitélio, sendo o LASSBio-1847 um dos mais promissores em relaxar esse órgão por ativar a via de transdução do receptor  $\beta_2$ /AC/cAMP/PKA e inibir as PDEs, que culmina com a elevação da  $[cAMP]_c$ .

**Palavras-chave:** Asma; *N*-sulfonilidrazônicos; atividade relaxante; cAMP; inibidores de PDE4.

# ***Abstract***

---

---

Asthma is a condition characterized by reversible chronic inflammation and hyperresponsiveness of airways, with a pharmacotherapy well established. However, due to asthma heterogeneity, some patients did not respond to treatment. So, trying to contribute in the development of new candidates to antiasthmatic drugs, we decided to assess a possible relaxant action of PDE4 inhibitors *N*-sulfonilhidrazonic derivatives (LASSBio-448, -1624, -1832, -1846, -1847, -1848, -1849, -1850 and -1851) in functional model of trachea from non-asthmatic and asthmatic guinea pigs, as well as to characterize the action mechanism of the most promising derivative. All experimental protocols were approved by CEUA/UFPB (certificate 0610/11). Initially, we realize the implementation and standardization of a guinea pig asthma model using ovalbumin (OVA) as sensitizer agent, and it was histologically observed morphological changes associated to asthma, as hypertrophy of the smooth muscle layer, inflammatory cells infiltration and vascular abnormalities. Moreover, rings from sensitized guinea pig trachea showed to be responsive to OVA, differently to the non-sensitized animals. Functionally, the contractile agonist CCh presented efficacy and potency similar between non asthmatic and asthmatic animals, differently histamine demonstrated to be equipotent between the animals, but with a higher efficacy in the asthmatic guinea pigs. In turn, the relaxant agonist aminophylline and isoprenaline presented similar potency and efficacy in both non asthmatic and asthmatic animals. Generally, in the step of pharmacological screening of *N*-sulfonilhidrazonic derivatives, they presented a equipotent relaxant action and independent of relaxing factors derived from epithelium in both animals groups, with exception of LASSBio-1850 that presented a low efficacy (< 50%) and LASSBio-1847 with a 4 fold higher potency on asthmatic guinea pigs. Among the derivatives evaluated, LASSBio-1632, -1846 and -1847 were the one with higher pharmacological potency on asthmatic animals, and LASSBio-1847 was the most promising and selected to the step of characterization of action mechanism on non-asthmatic and asthmatic guinea pig. Such as LASSBio-1847 was synthetized as a PDE4 inhibitor, an enzyme that hydrolyze cAMP, and the  $\beta_2$ -adrenergic receptors are responsible to initiate the signaling involved to cAMP production on airway smooth muscle, we used propranolol, a  $\beta_2$ -adrenergic non-selective blocker, to assess the participation of these receptors. So, we observed that the LASSBio-1847 relaxant curve was shifted showing the involvement of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in both animal groups. Since these receptors lead to adenylyl cyclase (AC) activation, we decided to investigate its participation in the LASSBio-1847 relaxant effect. Therefore, we used forskolin, an AC activator, and evidenced that the relaxant curve was 54- and 4-fold shifted to the left in non-asthmatic and asthmatic animals, respectively, indicating that LASSBio-1847 could be acting in a synergic or facilitate the AC activation.  $\beta_2$ -adrenergic receptors/AC activation lead to cAMP production that is regulated be its hydrolyzes by PDEs. To evaluate the contribution of these enzymes, we used aminophylline, a non-selective inhibitor of PDEs, and concentration-response curve to aminophylline was shifted to the left in the presence of LASSBio-1847 with gain in the potency around 147- and 4-fold in non-asthmatic and asthmatic animals, respectively, suggesting that the derivative acts by a possible PDE inhibition. The effector the  $\beta_2$ -adrenergic receptors/AC/cAMP pathway is PKA, so to confirm its positive modulation by LASSbio-1847, we used H-89, a PKA inhibitor, observed a reduction in the relaxant potency of the derivative, confirming the modulation of this pathway. Until now, all finding have indicated a possible increase in  $[cAMP]_c$  and to confirm this hypothesis it was carried out the measurement of tissue levels of cAMP by ELISA, that demonstrated that LASSBio-1847 indeed increase the  $[cAMP]_c$  in a similar magnitude to rolipram, a selective PDE4 inhibitor, in both animals. Thus, it was established the implantation of the guinea pig asthma model, as well as the evaluated *N*-sulfonilhidrazonic derivatives presented relaxant activity on guinea pig trachea in both non asthmatic and asthmatic animals in an epithelium independent manner, and LASSBio-1847 showed to be one of the most promising compounds in relax this organ by activation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors/AC/cAMP pathway and inhibit the PDEs, culminating to elevation of  $[cAMP]_c$ .

**Keywords:** asthma; *N*-sulfonilhidrazone; relaxant activity; cAMP; PDE4 inhibitors.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Prevalência global da asma .....	34
<b>Figura 2</b> – Processo de sensibilização e ativação por alérgenos nas vias aéreas ...	40
<b>Figura 3</b> – Mecanismo fármaco-mecânico da contração muscular lisa pela ativação da via $G_{q/11}$ -PLC $\beta_1$ .....	51
<b>Figura 4</b> – Mecanismo do relaxamento no músculo liso das vias aéreas induzido pelo cAMP e pelo cGMP .....	54
<b>Figura 5</b> – Domínio catalítico da PDE4 com o cAMP. Subdomínios destacados em verde, para o subdomínio S, em amarelo, para o subdomínio M, e em vermelho para o subdomínio Q .....	58
<b>Figura 6</b> – Planejamento estrutural das séries I e II análogas ao LASSBio-448.....	62
<b>Figura 7</b> – Rotas sintéticas para obtenção dos compostos <i>N</i> -sulfonamídicos da série I (17a-f; 18a-f) <b>(A)</b> e <i>N</i> -sulfonilidrazônicos da série II (19a-e; 20a-e) <b>(B)</b> .....	62
<b>Figura 8</b> – Estruturas químicas do rolipram, LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851 .....	65
<b>Figura 9</b> – Foto do sistema de banhos para órgãos isolados composto por cubas de vidro <b>(A)</b> , transdutores isométricos <b>(B)</b> e bomba termostática <b>(C)</b> .....	72
<b>Figura 10</b> – Fotos do amplificador <b>(A)</b> , microcomputador <b>(B)</b> , pHmetro digital <b>(C)</b> e da balança analítica <b>(D)</b> .....	73
<b>Figura 11</b> – Procedimento de indução de asma .....	74
<b>Figura 12</b> – Sistema utilizado para nebulização dos cobaias composto por nebulizador <b>(A)</b> e compartimento de inalação <b>(B)</b> .....	75
<b>Figura 13</b> – Fotos do Processador de tecidos <b>(A)</b> , pulmão emblocado em parafina <b>(B)</b> , micrótomo rotativo <b>(C)</b> e microscópio óptico com câmera acoplada <b>(D)</b> .....	77

<b>Figura 14</b> – Imagens histológicas obtidas a partir de pulmões de cobaias não asmáticas (A) e asmáticas (B e C), destacando-se infiltrado de células inflamatórias (setas verdes), alterações nas vias aéreas (setas azuis) e vaso sanguíneo (setas vermelhas) (H.E., 40x) .....	87
<b>Figura 15</b> – Registros representativos do efeito de $10^{-6}$ M de CCh e de 10 µg/mL de OVA em anéis de traqueia de cobaia não asmáticos (A) e asmáticos (B).....	89
<b>Figura 16</b> – Registros representativos da adição cumulativa de CCh sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (A e B) e asmáticos (C e D) na presença e ausência de epitélio funcional, respectivamente .....	92
<b>Figura 17</b> – Registros representativos da adição cumulativa de histamina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (A e B) e asmáticos (C e D) na presença e ausência de epitélio funcional .....	97
<b>Figura 18</b> – Registros representativos do efeito relaxante de isoprenalina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (A e B) e asmáticos (C e D) pré-contraída com $10^{-6}$ M de CCh na presença e ausência de epitélio funcional, respectivamente .....	102
<b>Figura 19</b> – Registros representativos do efeito relaxante de aminofilina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (A e B) e asmáticos (C e D) pré-contraída com $10^{-6}$ M de CCh na presença e ausência de epitélio funcional, respectivamente .....	106
<b>Figura 20</b> – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na ausência (A) e na presença de $3 \times 10^{-7}$ (B), de $10^{-6}$ (C) e de $3 \times 10^{-6}$ M (D) de propranolol .....	122
<b>Figura 21</b> – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaias asmáticos pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na ausência (A) e na presença de $3 \times 10^{-7}$ (B), de $10^{-6}$ (C) e de $3 \times 10^{-6}$ M (D) de propranolol .....	123
<b>Figura 22</b> – Registros representativos do efeito relaxante da isoprenalina em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos (A e C) e asmáticos (B e D) pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na ausência e na presença do LASSBio-1847.....	127

<b>Figura 23</b> – Registros representativos do efeito relaxante da forskolina em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de $3 \times 10^{-6}$ M do LASSBio-1847.....	130
<b>Figura 24</b> – Registros representativos do efeito relaxante da forskolina em anéis de traqueia de cobaias asmáticos pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de $10^{-6}$ M do LASSBio-1847 .....	131
<b>Figura 25</b> – Registros representativos do efeito relaxante da aminofilina em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de $3 \times 10^{-6}$ M do LASSBio-1847.....	134
<b>Figura 26</b> – Registros representativos do efeito relaxante da aminofilina em anéis de traqueia de cobaias asmáticos pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de $10^{-6}$ M do LASSBio-1847 .....	135
<b>Figura 27</b> – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na ausência (A) e na presença de $10^{-7}$ (B), de $3 \times 10^{-7}$ (C) e de $10^{-6}$ M (D) de H-89 ...	138
<b>Figura 28</b> – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaias asmáticos pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na ausência (A) e na presença de $10^{-7}$ (B), de $3 \times 10^{-7}$ (C) e de $10^{-6}$ M (D) de H-89 ...	140
<b>Figura 29</b> - Mapa conceitual do mecanismo de ação proposto para o LASSBio-1847 nas vias aéreas de cobaias não asmáticos e asmáticos.....	167

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito de  $10^{-6}$  M de CCh e de 10 µg/mL de OVA sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (A) e asmáticos (B) .....90
- Gráfico 2** – Efeito contrátil da adição cumulativa de CCh sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (A) (◆, ◇) e asmáticos (B) (◆, ◇) na presença e na ausência de epitélio funcional .....94
- Gráfico 3** – Efeito contrátil máximo induzido pela adição de CCh sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos na presença e na ausência de epitélio funcional (n = 5).....95
- Gráfico 4** – Efeito contrátil da adição cumulativa de histamina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (A) (■, □) e asmáticos (B) (■, □) na presença e na ausência de epitélio funcional .....99
- Gráfico 5** – Efeito contrátil máximo induzido pela adição de histamina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos na presença e na ausência de epitélio funcional (n = 5) ..... 100
- Gráfico 6** – Efeito relaxante da isoprenalina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (A) (▲, △) e asmáticos (B) (▲, △) pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional..... 104
- Gráfico 7** – Efeito relaxante da aminofilina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (A) (●, ○) e asmáticos (B) (●, ○) pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh na presença e na ausência de epitélio funcional..... 108
- Gráfico 8** – Efeito relaxante do LASSBio-1850 em anéis de traqueia de cobaia não asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (◆) e na ausência (◇) de epitélio funcional..... 110
- Gráfico 9** – Efeito relaxante do LASSBio-448 em anéis de traqueia de cobaia não asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (●) e na ausência (○) de epitélio funcional..... 110

<b>Gráfico 10</b> – Efeito relaxante do LASSBio-1624 em anéis de traqueia de cobaia não asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional.....	111
<b>Gráfico 11</b> – Efeito relaxante do LASSBio-1632 em anéis de traqueia de cobaia não asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (▲) e na ausência (△) de epitélio funcional.....	111
<b>Gráfico 12</b> – Efeito relaxante do LASSBio-1850 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (◀) e na ausência (◁) de epitélio funcional.....	115
<b>Gráfico 13</b> – Efeito relaxante do LASSBio-448 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (●) e na ausência (○) de epitélio funcional.....	115
<b>Gráfico 14</b> – Efeito relaxante do LASSBio-1624 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional.....	116
<b>Gráfico 15</b> – Efeito relaxante do LASSBio-1848 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (★) e na ausência (☆) de epitélio funcional.....	116
<b>Gráfico 16</b> – Efeito relaxante do LASSBio-1849 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (▶) e na ausência (▷) de epitélio funcional.....	117
<b>Gráfico 17</b> – Efeito relaxante do LASSBio-1851 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (⦿) e na ausência (⊙) de epitélio funcional.....	117
<b>Gráfico 18</b> – Efeito relaxante do LASSBio-1632 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (▲) e na ausência (△) de epitélio funcional.....	118

<b>Gráfico 19</b> – Efeito relaxante do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (▼) e na ausência (▽) de epitélio funcional.....	118
<b>Gráfico 20</b> – Efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com $10^{-6}$ M de CCh na presença (◆) e na ausência (◇) de epitélio funcional.....	119
<b>Gráfico 21</b> – Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de CCh na ausência (■) e na presença de $3 \times 10^{-7}$ (□), $10^{-6}$ (■) e $3 \times 10^{-6}$ (△) M de propranolol em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos (A) e asmáticos (B) .....	125
<b>Gráfico 22</b> – Efeito da isoprenalina sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de CCh na ausência (◀) e na presença (◀) do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaia não asmático (A) e asmático (B). .....	128
<b>Gráfico 23</b> – Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de CCh na ausência (★) e na presença (★) do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaia não asmático (A) e asmático (B) .....	132
<b>Gráfico 24</b> – Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de CCh na ausência (▲) e na presença (▲) do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos (A) e asmáticos (B).....	136
<b>Gráfico 25</b> – Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de CCh na ausência (●) e na presença de $10^{-7}$ (▷), $3 \times 10^{-7}$ (▶) e $10^{-6}$ (▽) M de H-89 em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos (A) e asmáticos (B).....	142
<b>Gráfico 26</b> – Quantificação dos níveis teciduais de cAMP na traqueia de cobaias não asmáticos (A) e asmáticos (B) pré-contraída com $10^{-6}$ M de CCh na ausência e presença de $10^{-4}$ M de rolipram ou de $10^{-5}$ , $3 \times 10^{-5}$ e $10^{-4}$ M do LASSBio-1847. ..	144

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1 – Visão geral da farmacoterapia antiasmática.....</b>	<b>46</b>
---	-----------

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores de $pD_2$ e de $E_{max}$ dos LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851 na presença (E+) e na ausência (E-) de epitélio funcional em traqueia de cobaia não asmático .....	64
<b>Tabela 2</b> – Composição da solução de Krebs normal.....	71
<b>Tabela 3</b> – Valores de $pD_2$ do LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, e LASSBio-1850 na presença e na ausência de epitélio funcional em traqueia de cobaia não asmático .....	112
<b>Tabela 4</b> – Valores de $pD_2$ do LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851 na presença e na ausência de epitélio funcional em traqueia de cobaia asmático .....	120

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>[cAMP]<sub>c</sub></b>	concentração de cAMP citosólica
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub></b>	concentração de cálcio citosólica
<b>4Ca<sup>2+</sup>-CaM</b>	complexo cálcio-calmodulina
<b>AA</b>	ácido araquidônico
<b>AC</b>	ciclase de adenilil
<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>AKAP</b>	proteína de ancoragem da cinase A
<b>AMF</b>	aminofilina
<b>AMP</b>	monofosfato de adenosina
<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>APC</b>	célula apresentadora de antígeno
<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>BK<sub>Ca</sub></b>	canais de potássio de grande condutância ativados por Ca <sup>2+</sup>
<b>CaM</b>	calmodulina
<b>cAMP</b>	monofosfato cíclico de adenosina
<b>Ca<sub>v</sub></b>	canais de cálcio sensíveis a voltagem
<b>CCh</b>	carbacol
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>cGMP</b>	monofosfato cíclico de guanosina
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>DPOC</b>	doença pulmonar obstrutiva crônica
<b>e.p.m.</b>	erro padrão da média
<b>ECP</b>	proteína catiônica do eosinófilo
<b>EDN</b>	neurotoxina derivada do eosinófilo

<b>EGFR</b>	receptores do fator de crescimento epidérmico
<b>E<sub>max</sub></b>	efeito máximo
<b>EPO</b>	peroxidase do eosinófilo
<b>ERK</b>	cinase regulada por sinal extracelular
<b>GDI</b>	inibidor de dissociação do GDP
<b>GDP</b>	difosfato de guanosina
<b>GEF</b>	fator de troca de nucleotídeo de guanina
<b>GPCRs</b>	receptores acoplados a proteína G
<b>G<sub>q/11</sub></b>	proteína G <sub>q</sub> ou proteína G <sub>11</sub>
<b>GTP</b>	trifosfato de guanosina
<b>IgE</b>	imunoglobulina do tipo E
<b>IK<sub>Ca</sub></b>	canais de potássio de condutância intermediária ativados por Ca <sup>2+</sup>
<b>IL</b>	interleucina
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-trifosfato de inositol
<b>IP<sub>3</sub> R</b>	receptor de IP <sub>3</sub>
<b>IPeFarM</b>	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
<b>K<sub>ATP</sub></b>	canais de potássio sensíveis ao ATP
<b>K<sub>Ca</sub></b>	canais de potássio ativados por cálcio
<b>K<sub>ir</sub></b>	canais de potássio retificadores de entrada
<b>K<sub>v</sub></b>	canais de potássio dependentes de voltagem
<b>LASSBio<sup>®</sup></b>	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
<b>LFF</b>	Laboratório de Farmacologia Funcional
<b>LT</b>	leucotrienos
<b>MLC</b>	cadeia leve da miosina
<b>MLCK</b>	cinase da cadeia leve da miosina

<b>MLCP</b>	fosfatase da cadeia leve da miosina
<b>MBP</b>	proteína básica principal
<b>NDEL1</b>	proteína similar ao elemento nuclear 1
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OVA</b>	ovalbumina
<b>PAF</b>	fator de ativação plaquetário
<b>PD<sub>2</sub></b>	logaritmo negativo, na base 10, da concentração molar de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
<b>PDE</b>	fosfodiesterase
<b>PI3K</b>	cinase de fosfatidilinositol 3
<b>PIP<sub>2</sub></b>	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
<b>PKA</b>	proteína cinase A
<b>PKC</b>	proteína cinase C
<b>PKG</b>	proteína cinase G
<b>PLC- <math>\beta_1</math></b>	fosfolipase C- $\beta_1$
<b>PMCA</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPase da membrana plasmática
<b>QSAR</b>	estudo quantitativo da relação estrutura química/atividade
<b>RACK-1</b>	receptor para a cinase C ativada 1
<b>ROK</b>	proteína cinase associada a Rho
<b>RS</b>	retículo sarcoplasmático
<b>RTKs</b>	receptores com atividade tirosina cinase
<b>RyR</b>	receptor de rianodina
<b>SAR</b>	relação estrutura-atividade
<b>SERCA</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
<b>SK<sub>Ca</sub></b>	canais de potássio de pequena condutância ativados por Ca <sup>2+</sup>

<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b>SUR</b>	receptor para sulfonilureia
<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>TEA<sup>+</sup></b>	tetraetilamônio
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	fator de transformação do crescimento beta
<b>Th2</b>	linfócito T auxiliar tipo 2
<b>UCR</b>	<i>upstream conserved region</i>
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba
<b>UFRJ</b>	Universidade Federal do Rio de Janeiro
<b>V<sub>m</sub></b>	potencial de membrana
<b>VRGF</b>	fator de crescimento endotelial vascular

**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

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>32</b>
2.1 A asma e suas complicações .....	33
2.2 A regulação da reatividade do músculo liso das vias aéreas .....	47
2.3 A química medicinal e o caminho para novas possibilidades terapêuticas .....	58
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>66</b>
3.1 Geral.....	67
3.2 Específicos .....	67
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1 Material.....</b>	<b>69</b>
4.1.1 Produtos teste .....	69
4.1.2 Animais.....	69
4.1.3 Drogas e reagentes .....	69
4.1.4 Preparação das soluções estoque dos produtos teste .....	70
4.1.5 Solução nutritiva .....	70
4.1.6 Equipamentos .....	71
<b>4.2 Métodos.....</b>	<b>74</b>
4.2.1 Implantação e padronização do modelo de asma em cobaia.....	74
4.2.1.1 Sensibilização dos animais .....	74
4.2.1.2 Avaliação histológica dos pulmões de cobaias não asmáticos e asmáticos .	75
4.2.1.3 Preparação dos anéis de traqueia isolada de cobaia .....	78
4.2.1.4 Efeito da OVA (reação de Schultz-Dale) sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos .....	78
4.2.1.5 Efeito dos agonistas contráteis CCh e histamina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos.....	79

4.2.1.6 Efeito dos agonistas relaxantes aminofilina e isoprenalina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos.....	79
4.2.2 Triagem farmacológica dos derivados sulfonidrazônicos .....	79
4.2.2.1 Efeito dos derivados sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaias não asmáticos .....	79
4.2.2.2 Efeito dos derivados sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaias asmáticos .....	80
4.2.3 Investigação do mecanismo de ação funcional do LASSBio-1847 em cobaias não asmáticos e asmáticos .....	80
4.2.3.1 Participação dos receptores adrenérgicos- $\beta$ .....	81
4.2.3.1.1 Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de propanolol.....	81
4.2.3.1.2 Efeito da isoprenalina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e presença do LASSBio-1847 .....	81
4.2.3.2 Investigação da participação da via AC/cAMP/PKA.....	81
4.2.3.2.1 Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1847 .....	81
4.2.3.2.2 Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1847 .....	82
4.2.3.2.3 Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do H-89.....	82
4.2.3.2.4 Quantificação dos níveis teciduais de cAMP .....	83
<b>4.3 Análise estatística .....</b>	<b>84</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
5.1 Implantação e padronização do modelo de asma em cobaia.....	86
5.1.1 Avaliação histológica dos pulmões dos cobaias não asmáticos e asmáticos... 86	
5.1.2 Efeito da OVA (reação de Schultz-Dale) sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos .....	88

5.1.3 Efeito do agonista contrátil CCh sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos .....	91
5.1.4 Efeito do agonista contrátil histamina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos .....	96
5.1.5 Efeito do agonista relaxante isoprenalina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos .....	101
5.1.6 Efeito do agonista relaxante aminofilina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos .....	105
5.2 Triagem farmacológica .....	109
5.2.1 Efeito dos derivados <i>N</i> -sulfonilidrazônicos sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaias não asmáticos .....	109
5.2.2 Efeito dos derivados <i>N</i> -sulfonilidrazônicos sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaias asmáticos .....	121
5.3 Investigação do mecanismo de ação, em nível funcional, do LASSBio-1847 em traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos .....	121
5.3.1 Participação dos receptores adrenérgicos- $\beta$ .....	121
5.3.1.1 Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de propranolol .....	121
5.3.1.2 Efeito da isoprenalina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e presença do LASSBio-1847 .....	126
5.3.2 Investigação da participação da via AC/cAMP/PKA .....	129
5.3.2.1 Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de CCh na ausência e na presença do LASSBio-1847 .....	129
5.3.2.2 Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de CCh na ausência e na presença do LASSBio-1847 .....	133
5.3.2.3 Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do H-89 .....	137
5.3.2.4 Quantificação dos níveis teciduais de cAMP .....	143
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>145</b>

<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	167
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	169
<b>APÊNDICES</b> .....	209
<b>ANEXO</b> .....	218

# ***1 Introdução***

---

---

A asma é uma desordem inflamatória crônica e caracterizada pela hiperreatividade reversível das vias aéreas e obstrução reversível do fluxo aéreo. Por muito tempo, acreditou-se que essa doença apresentaria um único quadro clínico, no entanto é cada vez mais aceito que a asma possua múltiplos subfenótipos ou endótipos que diferem quanto à gravidade clínica, características patológicas, resposta a farmacoterapia e tempo de recuperação (SHIFREN et al., 2012).

Essa doença atinge mais de 300 milhões de pessoas ao redor do mundo, com aproximadamente 250 mil mortes anuais relacionadas direta ou indiretamente à ela (BOUSQUET; KHALTAEV, 2007). Nas últimas décadas, as doenças de caráter alérgico, a exemplo da asma, têm destacadamente aumentado seus casos, especialmente nas crianças, sendo associado à intensa urbanização (ALFVÉN et al., 2006) e ainda se espera que o número de paciente cresça em mais 100 milhões até 2025 (MASOLI et al., 2004).

Uma modificação amplamente relatada à asma é o remodelamento das vias aéreas que é observado em todos os níveis de gravidade desta doença e por toda extensão das vias respiratórias (JAMES et al., 2002). Esse remodelamento refere-se a alterações estruturais nas vias aéreas dos indivíduos asmáticos e que incluem perda da integridade do epitélio (NAYLOR, 1962), espessamento da membrana basal (ROCHE et al., 1989), fibrose subepitelial, (ELIAS et al., 1999) hipertrofia das glândulas da submucosa e das células caliciformes (AIKAWA et al., 1992; CARROLL et al., 1993), hiperplasia e hipertrofia da camada muscular lisa (CARROLL et al., 1993), redução da integridade da cartilagem (HARAGUCHI; SHIMURA; SHIRATO, 1999) e aumento da vascularização das vias aéreas (LI; WILSON, 1997; TANAKA et al., 2003). Acredita-se que estas alterações ocorram, em grande parte, a partir do processo inflamatório crônico que envolve a ativação dos linfócitos T, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos (MOSMANN et al., 1986; LE GROS et al., 1990; KROEGEL et al., 1994).

Atualmente, a terapia antiasmática baseia-se no uso de broncodilatadores adrenérgicos e drogas anti-inflamatórias que apresentam especificidade, eficácia, duração de ação e segurança comprovadas, além de anticolinérgicos, antileucotrienos e inibidores de fosfodiesterases que propiciam um relaxamento das vias aéreas (HOLGATE, 2011). No entanto, apesar de serem usados há décadas com razoável sucesso, apresentam diversos efeitos colaterais e, principalmente, alguns pacientes com perfis mais graves continuam a sofrer com crises episódicas

(JANSSEN; KILLIAN, 2006), o que compromete e reduz significativamente sua qualidade de vida.

Nos últimos anos, um grupo de substâncias que têm recebido destaque nas pesquisas é o dos inibidores de fosfodiesterases (PDEs) e, em especial, os que inibem a família das PDE4. Essa família é subdividida em quatro isoformas: PDE4 A-D, sendo as isoformas A, B e D as mais importantes no processo asmático, visto que sua distribuição se dá em células inflamatórias, tais como, células T e B, eosinófilos, neutrófilos, células endoteliais, células epiteliais e músculo liso das vias aéreas, enquanto que a isoforma C é encontrada no sistema nervoso central (SNC), músculo esquelético, testículos e pulmões de fetos humanos (HOUSLAY et al., 1998; DAL PIAZ; GIOVANNONI, 2000; SPINA, 2000; ESSAYAN, 2001; BARBER et al., 2004; CHUNG, 2006; LUGNIER, 2006; KODIMUTHALI et al., 2008). O interesse em se investigar os inibidores de PDE4, ocorre uma vez que ela é capaz de hidrolisar e inativar seletivamente o monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (HOUSLAY; SCHAFFER; ZHANG, 2005), principal segundo mensageiro responsável pela relaxamento do músculo liso das vias aéreas (BILLINGTON; HALL, 2012).

Diante da atual demanda, há a necessidade de uma investigação incessante objetivando a descoberta de novos candidatos a fármacos antiasmáticos, para assim preencher a lacuna terapêutica existente. Nesse intuito, foi planejado e sintetizado uma nova série de derivados *N*-sulfonilidrazônicos inibidores de PDE4, obtidos a partir do LASSBio-448. Essa série foi avaliada quanto a sua capacidade de inibir a enzima PDE4, onde se observou que quase todos os derivados testados, com exceção de três compostos, inibiram a PDE4 bovina, na mesma ordem de magnitude que o composto de referência, o rolipram (NUNES, 2013). Em um estudo recente, desenvolvido por Medeiros (2015), cinco desses derivados apresentaram efeito relaxante em traqueia de cobaia, merecendo destaque o LASSBio-1846, por ser de maior potência.

Dessa forma, visando expandir e melhor caracterizar o estudo farmacológico dessa série de inibidores de PDE4, este trabalho teve como objetivo avaliar um possível efeito relaxante desses derivados em um modelo de asma alérgica em cobaias para assim fornecer dados mais fidedignos a cerca do potencial dos mesmos como candidatos a fármacos antiasmáticos. Além disso, também caracterizar o mecanismo de ação relaxante do composto que apresentar os melhores parâmetros de eficácia e de potências relativas.

# ***2 Fundamentação teórica***

---



## 2.1 A asma e suas complicações

De um modo geral, a saúde no mundo apresentou melhorias significantes nos últimos séculos, onde menos indivíduos passaram a morrer de doenças infecciosas e, em muitos casos, as pessoas vivem o suficiente para desenvolverem doenças crônicas. Essas doenças, a exemplo de problemas cardíacos, acidente cerebrovascular, câncer, diabetes, desordens genéticas e doenças respiratórias crônicas, até o ano de 2030, serão responsáveis direta ou indiretamente por 7 em cada 10 mortes no mundo (ARENA, 2014).

Dentre essas enfermidades, destacam-se as doenças respiratórias ou doenças crônicas das vias respiratórias, representando uma vasta gama de enfermidades, as quais incluem as alergias respiratórias (rinite e asma), a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), as doenças pulmonares ocupacionais, a síndrome de apneia do sono, a hipertensão pulmonar e a asma que constituem um grave problema de saúde pública em todos os países do mundo, sobretudo naqueles com baixos e médios rendimentos e no caso das populações desfavorecidas (BOUSQUET; KHALTAEV, 2007).

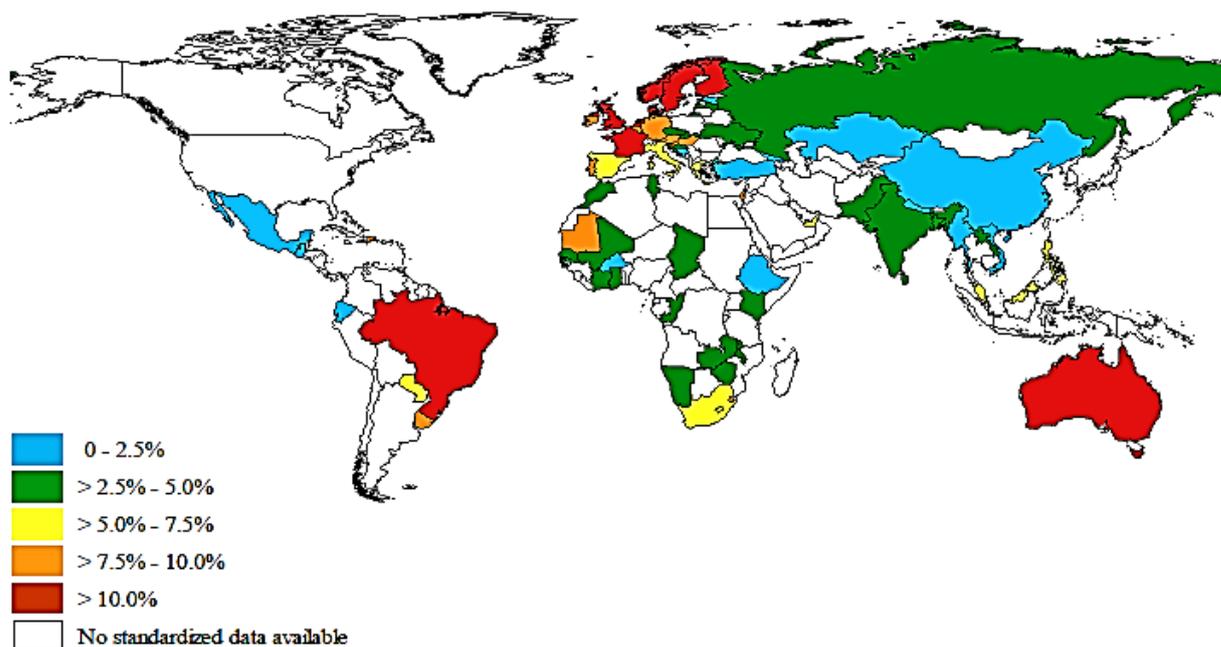
Ano após ano as doenças respiratórias crônicas vêm aumentando em prevalência, particularmente entre as crianças e os idosos. Afetam a qualidade de vida e podem provocar incapacidade nos indivíduos acometidos, causando grande impacto econômico e social. As limitações físicas, emocionais e intelectuais que surgem com a doença, com consequências na vida do paciente e de sua família, geram sofrimento humano (BRASIL, 2010). Mesmo diante desse cenário, as doenças respiratórias crônicas e os seus fatores de risco não são alvo de atenção suficiente por parte dos profissionais de saúde, dos governos e dos doentes e suas famílias. As doenças respiratórias crônicas são, frequentemente, subvalorizadas e insuficientemente diagnosticadas, tratadas e evitadas (BOUSQUET; KHALTAEV, 2007).

Nesse contexto, destaca-se a asma alérgica, uma doença heterogênea usualmente caracterizada por inflamação crônica e hiper-responsividade das vias aéreas a uma série de irritantes ou alérgenos. Ela pode ser definida pela história dos sintomas respiratórios, falta de ar, dificuldade respiratória e tosse, que variam em intensidade e ao longo do tempo, juntamente com limitação do fluxo aéreo expiratório (GINA, 2015). Essa doença é muito comum em países desenvolvidos,

onde cerca de 1 em cada 10 crianças e 1 em cada 12 adultos são afetados, resultando numa substancial morbidade e gastos com cuidados em saúde (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

Mundialmente a asma possui uma prevalência de cerca de 300 milhões de casos, com estimativas sugerindo que, globalmente, essa doença terá um crescimento na sua prevalência de cerca de 50% por cada década (WHO, 2015), merecendo ainda destaque países como França, Reino Unido, Austrália e Brasil por possuírem uma prevalência superior a 10% de suas populações (Figura 1) (TO et al., 2012). Com isso, a perda da produtividade dos acometidos gera um custo total em média superar a 18 bilhões de dólares anualmente nos Estados Unidos (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

**Figura 1** – Prevalência global da asma.



Fonte: To et al., 2012.

Nos últimos 50 anos, a prevalência de asma aumentou em todos os países, em paralelo com a de alergias. A asma continua aumentando em nível mundial, à medida que as comunidades se urbanizam e adotam estilos de vida modernos (ROSADO-PINTO, MORAIS-ALMEIDA, 2004; LAW et al., 2005). Com o aumento previsto da proporção de população a viver em zonas urbanas, na próxima década haverá provavelmente um incremento substancial no número de pessoas com asma

em todo o mundo. Calcula-se que, em 2025, poderá haver 100 milhões a mais de pessoas com asma (MASOLI et al., 2004). É ainda relatado que a asma seja responsável por cerca de 250.000 mortes anualmente, sendo a mortalidade mais elevada em países onde o acesso a fármacos essenciais é reduzido (BOUSQUET; KHALTAEV, 2007).

O Brasil ocupa a oitava posição mundial em prevalência de asma, com estimativas para crianças e adolescentes escolares variando de menos que 10 a mais do que 20% em diversas cidades estudadas, dependendo da região e da faixa etária considerada. A asma é responsável por um número representativo de internações hospitalares, somente em 2014, no período de janeiro a novembro, foram 105,5 mil internações por essa doença originando um custo de R\$ 57,2 milhões para a rede pública de saúde – segundo dados do Sistema de Informações Hospitalares (BRASIL, 2015).

Os custos diretos com o tratamento da asma correspondem à soma dos gastos com medicamentos, aparelhos, consultas médicas e hospitalizações. Somado a estes ainda têm-se as despesas indiretas, que envolvem o absenteísmo à escola e ao trabalho, tanto do paciente quanto de seu acompanhante, além de perda de produtividade, aposentadoria precoce e morte (OLIVEIRA et al., 2002). Ainda em 2007, houve 2.500 óbitos, de acordo com o departamento de informática do sistema único de saúde (DataSUS), dos quais aproximadamente um terço ocorreu em unidades de saúde, domicílios ou vias públicas (BRASIL, 2010). Dessa forma, a asma configura-se como um importante problema de saúde pública, uma vez que tem alta prevalência, expõe o paciente a recorrentes hospitalizações e representa uma elevada carga econômica para o indivíduo, a sociedade e o governo (LEE et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, pode ser atribuído à asma alérgica três características patológicas, a obstrução do fluxo de ar, a inflamação e a hiperreatividade das vias aéreas, sendo ainda uma condição complexa com diferenças na gravidade, na história natural, na comorbidade e nas respostas ao tratamento (LOTVALL et al., 2011). No entanto, quando pacientes asmáticos são estudados em grandes grupos, nem todas as características que definem a asma são encontradas ou uma ou outra predomina. Além disso, em alguns pacientes, o componente inflamatório típico da asma pode ser ausente ou limitado, mesmo que outros sintomas da doença estejam claramente presentes (OBER; HOFFJAN, 2006).

Assim, a expressão da asma pode variar de acordo com o tipo da inflamação das vias aéreas, a idade e o gênero, ter relação com fatores provocadores, ser atópica ou ainda apresentar diferentes níveis de gravidade na doença. Frente a essa complexidade, alguns endótipos, ou subtipos clínicos, da asma têm sido descritos na literatura (BEL, 2004), merecendo destaque a asma grave.

A asma grave é definida como uma asma não controlada que pode resultar em frequentes exacerbações, reações adversas a medicamentos, morbidez crônica (incluindo impedimento da função pulmonar ou redução do crescimento pulmonar em crianças) e até morte, incluindo ainda seis sintomas característicos, que são: crises asmáticas diurnas, limitação das atividades diárias, crises asmáticas noturnas, necessidade de tratamento de emergência, comprometimento da função pulmonar e episódios frequentes (BUSH; ZAR, 2011). Ela representa de 5 a 10% de todos os pacientes asmáticos, mas é responsável por uma grande parte dos custos de cuidados em saúde e morbidade associada à asma (MOORE et al., 2007).

A asma grave apresenta ainda três subgrupos que merecem tratamento distinto: 1) o grupo com pacientes portadores da doença, porém não tratados adequadamente, devido à falha no diagnóstico ou indisponibilidade de medicamentos; 2) pacientes difíceis de tratar devido a não adesão ao tratamento, uso inapropriado ou incorreto dos medicamentos, dificuldades ambientais ou comorbidade; 3) o grupo com asma grave tolerante ao tratamento, que incluem pacientes cujo controle da asma não é alcançado mesmo utilizando-se altas doses da terapia padrão ou onde o controle só é obtido pelo uso dessas elevadas doses (BUSH; ZAR, 2011).

Independente da gravidade do quadro asmático ou sensibilidade a um ou outro antígeno, uma característica inerente à asma alérgica é a inflamação crônica das vias aéreas. A inflamação, que é benéfica ao hospedeiro em condições normais, é uma resposta do sistema imunológico à injúria. No entanto, uma resposta imune exacerbada a um estímulo não patogênico, como ocorre na asma, leva a um quadro inflamatório crônico relevante e diretamente relacionado à patogênese dessa doença (HOLGATE, 2008). Acredita-se que essa enfermidade surja a partir de uma complexa inter-relação entre susceptibilidade genética e influências ambientais, como tempo e dose de exposição ao alérgeno e exposição à certas infecções (NELSON, 2001). Esses eventos culminam numa resposta inflamatória inadequada

coordenada pelo linfócito T auxiliar tipo 2 (Th2) à alérgenos normalmente inofensivos (HOLGATE et al., 2007).

Embora nenhum gene específico ou fator ambiental individualmente contribua para a asma, a predisposição genética na obtenção de uma resposta local à imunoglobulina do tipo E (IgE), conhecida como atopia, é um dos fatores de risco de maior relevância para o desenvolvimento dessa doença (NELSON, 2001; KARJALAINEN et al., 2003). A maioria dos casos de asma é associada com a atopia (PEARCE; PEKKANEN; BEASLEY, 1999), no entanto também existem formas clinicamente distintas dessa desordem que são independentes da atopia, isto é, sem a formação de IgE em resposta a alérgenos ambientais (MACFARLANE et al., 2000).

A maioria dos casos de asma começa na infância, e está relacionada à sensibilização a alérgenos inalados, tais como poeira doméstica, ácaros, baratas, pelos de animais, fungos e pólen. A inalação desses alérgenos estimula a proliferação das células Th2, com subsequente produção e liberação de citocinas e interleucinas (IL) 4, 5 e 13. Assim, sempre que o alérgeno entrar em contato com uma célula apresentadora de antígeno (APC), a exemplo das células dendríticas, o mesmo será processado e exposto às Th2, dando início ao processo inflamatório que é um evento essencial para o desenvolvimento da fisiopatologia da asma (KUDO; ISHIGATSUBO; AOKI, 2013). A ativação das células Th2 pelas APCs leva a produção de citocinas, como a IL-4 e a IL-13, que irá promover a reação coestimulatória entre as células T e B, iniciando a produção de IgE pelas células B. O nível de IgE estando elevado irá promover o recrutamento, ativação e liberação de mediadores pelas células inflamatórias, tais como eosinófilos, basófilos, mastócitos, macrófagos, neutrófilos, entre outros (GEHA; JABARA; BRODEUR, 2003).

Atualmente tem-se conhecimento do papel crucial desempenhado pelas células dendríticas na determinação da atividade do sistema imune na resposta seguida à exposição aos alérgenos e início da asma atópica (LAMBRECHT; HAMMAD, 2009). Além disso, também já é bem descrito na literatura que as células dendríticas são essenciais para a manutenção da resposta Th2 desencadeada pelos aeroalérgenos (LAMBRECHT et al., 1998).

Em virtude de sua capacidade de liberar uma grande variedade de mediadores pro-inflamatórios, afinidade pela IgE e localizar-se estrategicamente próximo a vasos sanguíneos, superfície das mucosas e músculo liso, os mastócitos

são considerados há muito tempo uma célula efetora chave na patogênese da asma. Uma vez sintetizada, a IgE circula pelo sangue e liga-se a seus receptores de alta afinidade, conhecidos como FcεRI, que estão presentes em várias células inflamatórias, especialmente nos mastócitos, basófilos e eosinófilos (GOULD et al., 2003).

No processo asmático, grande parte das IgEs irão se ligar aos receptores presentes nos mastócitos, desencadeando uma degranulação e descarga maciça de mediadores pré-formados e armazenados em vesículas, como proteases e histamina (propriedades vasoativas), além da síntese de derivados lipídicos, como os eicosanoides, leucotrienos e prostaglandinas, e por fim transcrição de citocinas (BRADDING; WALLS; HOLGATE, 2006). Esses mediadores são responsáveis pela fase inicial da reação asmática que está relacionada à hiper-reatividade das vias aéreas, pela produção de muco e pela vasodilatação que ocorre antes do recrutamento de células inflamatórias (WILLIAMS; GALLI, 2000). Essa fase dura de 30 a 60 minutos e é sucedida pela fase tardia com um perfil de inflamação e eosinofilia excessivas (MURDOCH; LLOYD, 2010). Interessantemente, o músculo liso das vias aéreas é infiltrado com mastócitos em pacientes asmáticos, sendo um local que fornece fatores relacionados ao recrutamento e a sobrevivência dessas células (BRIGHTLING et al., 2002), havendo assim, uma relação direta entre os mastócitos e a hiper-responsividade das vias aéreas, uma vez que esse músculo é o responsável pela regulação do tônus dessas vias.

Os eosinófilos são, tipicamente, as células predominantes no infiltrado inflamatório na asma alérgica (KAY, 2005), e o grau de eosinofilia tem sido um parâmetro diretamente relacionável com a gravidade da doença em alguns pacientes asmáticos (BOUSQUET, 2000). Elas são células inflamatórias potentes que secretam uma variedade de mediadores lipídicos e proteínas relevantes no processo fisiopatológico da asma, incluindo leucotrienos (LT) C4, D4 e E4, fator de ativação plaquetário (PAF), neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN), proteína básica principal (MBP), proteína catiônica do eosinófilo (ECP), peroxidase do eosinófilo (EPO), histamina, entre outras (HUMBERT; KAY, 2003).

Os LT desempenham um papel importante na asma devido sua habilidade de induzir broncoconstrição e recrutar mais células inflamatórias (MOTOJIMA et al., 1989). Os mediadores inflamatórios IL-4 e IL-13 liberados pelas Th2 e eicosanoides lipídicos (leucotrienos, prostaglandinas e lipoxinas) liberados pelos eosinófilos agem

em conjunto para formação do quadro sintomático clínico da asma, principalmente, por suas ações nos tecidos vasculares e na reatividade do músculo liso das vias aéreas (FRIGAS; GLEICH, 1986). Tomadas em conjunto, as ações desses produtos resultam as características fisiopatológicas da asma.

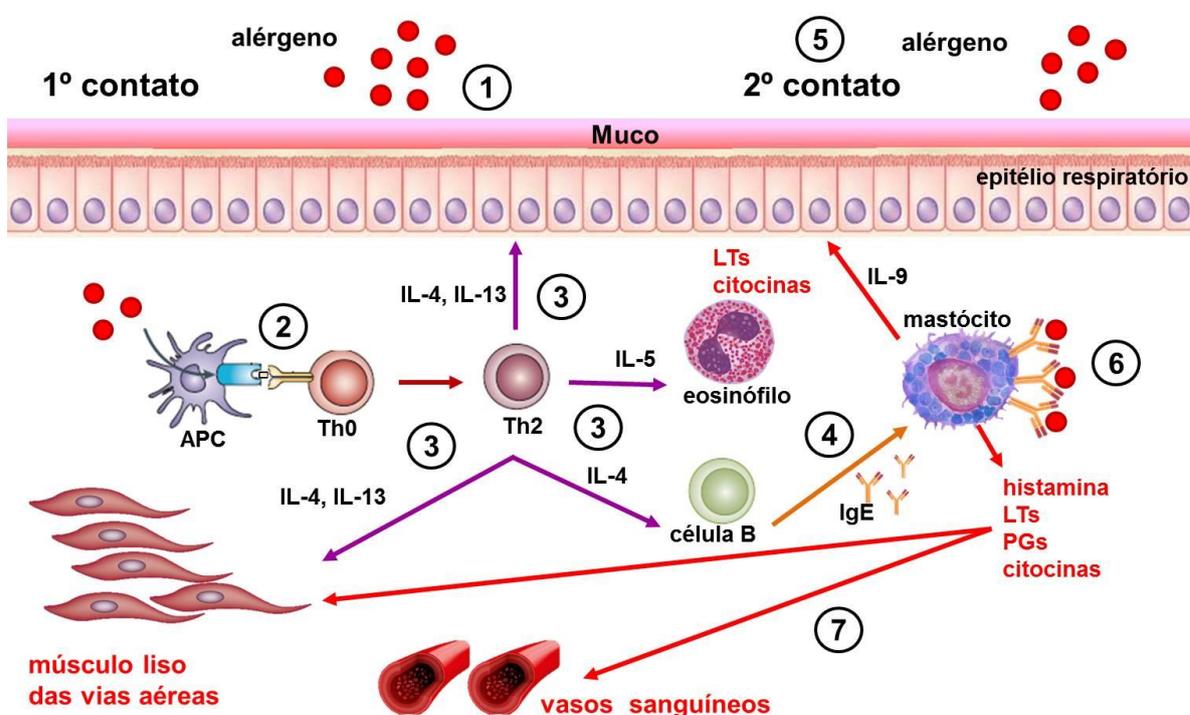
Os basófilos são os granulócitos menos abundantes nas vias aéreas de pacientes com asma alérgica e compartilham muitos dos mecanismos de recrutamento com os eosinófilos, assim eles são frequentemente encontrados nos processos alérgicos onde os eosinófilos estão presentes (GANGUR et al., 2003). Apesar de sua menor presença nas respostas alérgicas, os basófilos por possuírem receptores para IgE, os FcεRI, contribuem em respostas inflamatórias locais e na hiper-responsividade das vias aéreas através da degranulação e da liberação de eicosanoides e de histamina (FALCONE; HAAS; GIBBS, 2000) e, potencialmente, através da liberação de citocinas como IL-4 (YOSHIMOTO et al., 1999) e função de APC (SOKOL et al., 2009).

Como já mencionado acima, a asma pode se apresentar como uma doença heterogênea com vários endótipos distintos, sendo um destes a asma neutrofílica, onde se observa um elevado número de neutrófilos e produtos derivados de neutrófilos, sem uma significativa eosinofilia nas vias aéreas de pacientes asmáticos (DREWS et al., 2009), sendo relacionada com a gravidade da asma (JATAKANON; LIM; BARNES, 2000) e exacerbações (FAHY et al., 1995). Os neutrófilos são as células mais abundantes em amostras de secreções tanto de indivíduos saudáveis quanto de asmáticos, não estando aumentados em pacientes com asma suave ou moderada, mas sim nos casos de asma grave (WENZEL et al., 2003). Por fim, pode-se atribuir a essas células uma participação nos processos de estreitamento das vias aéreas e exacerbações agudas de asma grave, sendo possível ainda cogitar uma contribuição nos processos de iniciação e resolução nos episódios de ataque asmático (FAHLY, 2009).

Assim, no modelo clássico de ativação alérgica, a exemplo do que ocorre nas asma, o alérgeno entra no corpo e é capturado por IgEs pré-existentes ligando-se com alta afinidade por seu receptor FcεRI, presente na membrana dos mastócitos das vias aéreas, sendo esse o gatilho para a ativação dessas células e liberação das citocinas relacionadas ao quadro inflamatório asmático (Figura 2) (BAX; KEEBLE; GOULD, 2012). Esse evento leva a um estado crônico de inflamação, danos teciduais e subsequente reparo inadequado do tecido levando a alterações

estruturais nas paredes das vias aéreas de indivíduos asmáticos, que coletivamente são denominadas de remodelamento das vias aéreas (Figura 2) (SHIFREN et al., 2012). Esse remodelamento é fortemente relacionado com alguns endótipos de asma onde há irreversível ou parcial obstrução do fluxo de ar e acelerada perda da função pulmonar (HOMER; ELIAS, 2005). Essas alterações ligadas ao remodelamento ocorrem em toda árvore brônquica (SAETTA et al., 1991), mas são mais marcantes nas membranas maiores e nas cartilagens menores das vias aéreas (ELIAS et al., 1999).

**Figura 2** – Processo de sensibilização e ativação por alérgenos nas vias aéreas.



Fonte: adaptado de Wenzel, 2012.

(1) No momento do 1º contato do alérgeno junto às células apresentadoras de antígenos (APC) há o processamento e exposição desse agente aos linfócitos T *naive* (Th0) (2) que irão se diferenciar, no caso da asma, em linfócitos Th2; (3) Por sua vez essas células passam a liberar citocinas específicas como as interleucinas 4, 5 e 13 (IL-4, IL-5 e IL-13), as quais passam a induzir alterações epiteliais, sobre a musculatura lisa das vias aéreas, além de propiciar a ativação e diferenciação de eosinófilos e células B. (4) As células B ativas passam a secretar a imunoglobulina E (IgE) que ligam-se aos mastócitos. (5) Quando de um 2º contato com o alérgeno, estes ligam-se à IgE ativando o mastócito (6), de maneira a fazê-lo secretar vários componentes como IL-9, histamina, leucotrienos (LTs), prostaglandinas e

outras citocinas que, por fim, (7) realizam o processo de remodelamento das vias aéreas induzindo modificações nos vasos sanguíneos e musculatura lisa das vias aéreas.

No remodelamento das vias aéreas, o músculo liso sofre tanto um processo de hiperplasia como de hipertrofia. Os fatores mitogênicos atuam através de diferentes mecanismos operados por receptor, onde fatores de crescimento induzem mitogênese via ativação de receptores com atividade tirosina cinase (RTKs), enquanto agonistas contráteis liberados por células inflamatórias medeiam seus efeitos pela ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e, interessantemente, parece ocorrer um sinergismo entre esses dois tipos de receptores para promover a mitogênese do músculo liso das vias aéreas (KRYMSKAYA et al., 2000).

A ativação da cinase de fosfatidilinositol 3 (PI3K) e da cinase regulada por sinal extracelular (ERK) parece ser a via de transdução de sinal dominante para os RTKs, GPCRs ou citocinas estimuladas por fatores de crescimento levarem ao crescimento das células musculares lisas. A PI3K fosforila inositídeos de membrana, com função de segundo mensageiro, ativando moléculas efetoras *downstream* para regular a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular (KRYMSKAYA et al., 1999). Outros trabalhos mostraram que a inibição da ERK atenua a síntese de DNA induzida por mitogênicos em células musculares lisas, sugerindo que a ativação da ERK é necessária para a proliferação do músculo liso (KARPOVA et al., 1997; ORSINI et al., 1999).

Alguns estudos também apontam para o papel do aumento do volume dos miócitos ou hipertrofia como um mecanismo de aumento da massa de células de músculo liso na asma, onde mediadores como a IL-1b, IL-6, TGF- $\beta$  e angiotensina-II induziram hipertrofia celular *in vitro*, embora os mecanismos envolvidos ainda permaneçam incertos (De et al., 1995; MCKAY et al., 1998;). Estudos morfológicos confirmaram a presença de hipertrofia dos miócitos musculares lisos em alguns, mas não em todos, os pacientes asmáticos estudados (EBINA et al., 1993), dessa forma estudos adicionais são requeridos para melhor compreender o papel da hipertrofia na asma.

No processo de remodelagem, não só os miócitos das vias aéreas são afetados, mas também os vasos sanguíneos, onde as alterações vasculares incluem tanto um tamanho aumentado dos vasos das paredes das vias aéreas, como

também a angiogênese (LI; WILSON, 1997). As modificações na microvasculatura das vias aéreas podem contribuir para a formação do edema e resultam, principalmente, da angiogênese. Esse aumento na vascularidade está relacionado com a maior expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VRGF) (LI; WILSON, 1997; TANAKA et al., 2003), que por sua vez, tem sua produção estimulada por prostaglandina E<sub>2</sub>, bradicinina e algumas citocinas, como TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  (KNOX et al., 2001; WEN et al., 2003; KAZI et al., 2004). Consequências clínicas para a angiogênese na asma incluem a redução do calibre das vias aéreas devido à formação de edema e liberação aumentada de mediadores inflamatórios e remodelatórios nas vias aéreas (BERGERON; AL-RAMLI; HAMID, 2009), tendo subsequente influência na fisiopatologia da asma.

Alterações epiteliais também são relatadas e relacionadas ao processo de remodelamento das vias aéreas, extravasamento epitelial, perda das células ciliadas, hiperplasia das células caliciformes (produtoras de muco), *up-regulation* da liberação de fatores de crescimento e aumento na expressão de receptores, como os receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (CARROLL et al., 1993; MONTEFORT et al., 1992; ORDONEZ et al., 2000). Alguns estudos sugerem que o processo de extravasamento epitelial seja resultado de um enfraquecimento da membrana basal que facilitaria o deslocamento do mesmo ou sugere-se que as células epiteliais de asmáticos possuem uma maior capacidade de renovação quando comparada com células epiteliais de indivíduos saudáveis. O epitélio intacto das vias aéreas normalmente fornece uma barreira de proteção física contra partículas inaladas, como os alérgenos, e uma vez que essa barreira seja perdida, resulta-se na exposição da membrana basal que pode diminuir essa proteção e aumentar a propensão para os alérgenos lesionarem as vias aéreas exacerbando o processo inflamatório ligados à asma (BERGERON; AL-RAMLI; HAMID, 2009). Clinicamente, a extensão do dano epitelial é correlacionada com a hiper-responsividade das vias aéreas (BOULET et al., 1997; JEFFERY et al., 1989), claramente sugerindo que o grau de perda e/ou de renovação é ligado à gravidade e evolução do quadro asmático.

O epitélio das vias aéreas é a primeira barreira de defesa contra o ambiente externo e desempenha um papel vital na proteção e na manutenção da homeostasia pulmonar. No entanto, na asma, alterações crônicas nos mecanismos homeostáticos levam a modificações na estrutura das vias aéreas que afetam o funcionamento

epitelial, estando relacionadas ao desenvolvimento do remodelamento das vias respiratórias na asma (DAVIES, 2009). Podendo ser observado uma separação das células ciliadas colunares, a presença de agregados de células epiteliais na expectoração, o aumento da permeabilidade aos alérgenos e redução da expressão da molécula de adesão célula-célula epitelial (HEIJINK; NAWIJN; HACKETT, 2014).

Dessa forma, o epitélio defeituoso das vias aéreas dos pacientes asmáticos podem ter consequências importantes, levando ao aumento de acessibilidade dos alérgenos às células imunes e estruturais da submucosa. Sendo ainda bem estabelecida uma correlação entre esse dano epitelial e o aumento na gravidade da hiper-responsividade das vias aéreas (LAITINEN et al., 1985).

Na asma, as alterações epiteliais observadas podem resultar na maior secreção e atividade de citocinas pro-inflamatórias e fatores de crescimento (NAWIJN et al., 2011). As células epiteliais das vias aéreas passam a produzir quimiocinas ligantes CC-2 (CCL2), CCL20, linfopoiétina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33 em resposta ao alérgeno, que atraem monócitos e células dendríticas imaturas para os pulmões (HAMMAD et al., 2009; NATHAN et al., 2009), além de causar efeitos pleiotropicos. Eles podem ainda ativar células dendríticas que irão direcionar as repostas Th2 pela inibição da produção da IL-12, uma citocina do perfil Th1, e atração de células Th2 ou aumento na expressão de moléculas de superfície como o OX40L, um receptor capaz de viabilizar o amadurecimento dessas células.

O epitélio também pode atuar sobre a imunidade inata através da liberação de citocinas que irão ativar linfócitos como os basófilos, mastócitos, eosinófilos (LAMBRECHT; HAMMAD, 2012). Uma vez iniciadas, as respostas epiteliais aos alérgenos são mediadas através da ação das citocinas efectoras do perfil Th2, proporcionando um importante *feedback* que está ligado a perpetuação da asma. As células epiteliais das vias aéreas respondem às citocinas IL-4 e IL-13 produzindo fatores quimiotáticos, como IL-8, CCL11 e CCL17, responsáveis pela migração de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos Th2 (MATSUKURA et al., 2001).

Tomadas em conjunto, as alterações inerentes ao processo de remodelamento das vias aéreas culminam na principal complicação do quadro asmático: a obstrução do fluxo aéreo. Esse evento pode ser desencadeado pela exposição do paciente a um alérgeno que o mesmo tenha sido previamente

sensibilizado e este, por sua vez, ao ligar-se aos mastócitos presentes ao longo da extensão das vias respiratórias induzem duas fases de resposta: uma imediata e outra tardia. A primeira ocorre devido à liberação de mediadores inflamatórios como a histamina, as prostaglandinas, os leucotrienos e as interleucinas os quais causam broncoconstrição, aumento na permeabilidade das vias aéreas e dos vasos sanguíneos, além do aumento da secreção de muco. Também é relatada uma ativação exacerbada do sistema nervoso parassimpático que culmina com uma atividade aumentada do nervo vago sobre o músculo liso bronquial e sobre as células secretoras de muco (VAN DER VELDEN; HULSMANN, 1999; ZDANOWICZ, 2007). A fase tardia pode perdurar por horas ou dias e é caracterizada pelo recrutamento das células imunológicas, como eosinófilos, neutrófilos, Th2, com posterior formação de edema, redução da atividade ciliar e impedimento do fluxo aéreo (BEASLEY; PAGE; LICHTENSTEIN, 2002).

Dessa maneira, a farmacoterapia da asma centra-se em duas estratégias: o relaxamento ou prevenção de contração do músculo liso das vias aéreas e reversão ou prevenção de inflamação das vias respiratórias, buscando, em primeira instância, recuperar o paciente após uma crise asmática, além de evitar que esses episódios se tornem mais frequentes ou repetitivos. No quadro 1 tem-se uma visão geral das classes terapêuticas utilizadas no tratamento da asma.

Quadro 1 – Visão geral da farmacoterapia antiasmática

Classe terapêutica	Indicação terapêutica	Efeito	Efeito indesejável
Agonistas $\beta_2$ -adrenérgicos (albuterol, salmeterol)	Inalação de drogas de curta ou longa duração para asma moderada ou grave	Relaxamento do músculo liso bronquial	Tremor no músculo esquelético; taquicardia
Corticosteroide (beclometasona e budesonida)	Inalação para asma persistente leve e moderada	Ampla ação anti-inflamatória a nível transcricional	Tosse; supressão no crescimento (crianças); supressão adrenal; osteoporose
Xantinas (teofilina e aminofilina)	Asma persistente leve ou moderado	Relaxamento do músculo liso bronquial; ↓ ativação dos eosinófilos e células T; ↑ atividade mucociliar	Estimulação cardíaca dose-dependente; estimulação do SNC (náusea e vômito); problemas estomacais
Cromolina e Nedocromil	Asma persistente leve	Estabilizador de mastócitos: evitar a liberação de histamina e outros mediadores inflamatórios	Tosse; sabor desagradável; mucosas secas; Dermatite; miosite; complicações no TGI; cefaleia; náusea
Anti-leucotrienos (montelucaste e zafirlucaste)	Asma persistente leve e moderada	Antagoniza a ação dos LTs nas vias aéreas	Cefaleia; náusea; desconforto no TGI
Antagonista muscarínico (ipratrópio)	Em associação com agonistas $\beta_2$ -adrenérgicos	Antagoniza os efeitos da ativação muscarínica nas vias aéreas	Alterações no TGI (constipação, diarreia, vômito); cefaleia; prurido; taquicardia;
Anticorpos monoclonais (omalizumab)	Pacientes com asma grave refratária e sensibilidade à IgE	Impede a ligação da IgE aos mastócitos	reações no local de injeção (dor, inchaço, eritema e prurido) podendo haver correlação com malignidade; cefaleia

Fonte: adaptado de ZDANOWICZ, 2007

Como descrito até o momento, a asma é uma doença caracterizada, em parte, por dois importantes componentes: um ligado ao processo inflamatório crônico e outro ligado à hiper-responsividade das vias aéreas, os quais contribuem para a obstrução do fluxo aéreo. Tal obstrução é consequência, em parte, do remodelamento estrutural que ocorre nas vias aéreas devido a frequente estimulação do músculo liso pela ação de agonistas contráteis, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento (LAZAAR; PANETTIERI, 2005). Além disso, esse músculo é o principal alvo, direta ou indiretamente, das classes terapêuticas utilizadas na terapia antiasmática, o que confere ao músculo liso aéreo um papel chave como regulador da função respiratória nos pacientes asmáticos.

## **2.2 A regulação da reatividade do músculo liso das vias aéreas**

O músculo liso das vias aéreas está localizado na parede da arborescência traqueobronquial, a partir da traqueia até os bronquíolos terminais. Na traqueia e nos brônquios extralobares, os segmentos de músculo liso conectam as duas extremidades do anel de cartilagem em forma de ferradura de cavalo. Já nos brônquios intralobares, a organização da cartilagem e do músculo liso apresenta-se diferente, onde o músculo forma uma camada contínua na parede bronquial enquanto que a cartilagem não constitui uma estrutura contínua e sendo ausente nos brônquios mais periféricos (OUEDRAOGO; ROUX, 2014). Assim, de acordo com esse arranjo anatômico, a contração do músculo liso reduz o diâmetro das vias aéreas e, conseqüentemente, aumenta a resistência ao fluxo aéreo.

A contração do músculo liso das vias aéreas está sob o controle de muitos mensageiros extracelulares, os quais atuam em receptores de membrana específicos, destacando-se os neurotransmissores do sistema nervoso autônomo, mediadores epiteliais e substâncias liberadas por células inflamatórias. A ligação desses agentes contráteis a seus receptores de membrana leva a um aumento da concentração de cálcio citosólica ( $[Ca^{2+}]_c$ ), que no repouso era de cerca de  $10^{-7}$  M passando para aproximadamente  $10^{-5}$  M (ROUX, 2013), configurando-se assim como o gatilho para a ativação do aparato contrátil e início da contração.

O cálcio é um segundo mensageiro importante que desempenha um papel essencial a uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a regulação enzimática, a expressão gênica, o tráfego de proteína, a proliferação celular, a

apoptose e a coordenação do acoplamento excitação-contração do músculo (CARAFOLI; BRINI, 2007). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula: uma extracelular que permite o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citoplasma, através dos canais na membrana plasmática e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente o retículo sarcoplasmático (RS) que liberam  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol (MA; PAN, 2003).

A regulação funcional da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de membrana ( $V_m$ ) e o acoplamento fármaco mecânico, que acontece quando a contração promovida por um agonista é maior que a observada só com a mudança do  $V_m$  (REMBOLD, 1992). O disparo da contração do músculo liso é inicialmente o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (SOMLYO; SOMLYO, 1994), seja pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares ou pela entrada deste íon através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana plasmática, principalmente pelos  $\text{Ca}_v$ . Enquanto a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, mediada por ativação através do uso de agonistas como a histamina, a acetilcolina (ACh) entre outros, contribui para o início do desenvolvimento da força de contração (THORNELOE; NELSON, 2005). Estudos realizados com sondas fluorescentes sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  demonstraram que agonistas contráteis induzem no músculo liso das vias aéreas, com relação ao cálcio intracelular, um resposta bifásica (MURRAY; KOTLIKOFF, 1991).

Inicialmente, a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  que gira em torno de 100 a 200 nM no repouso, eleva-se para aproximadamente 800 a 1000 nM. Essa elevação rápida e brusca é responsável pelo desenvolvimento da tensão, enquanto que em seguida observa-se um platô sustentado caracterizado por níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  acima dos valores do repouso, que é associado com a manutenção da tensão das vias aéreas (PELAIA et al., 2008). A regulação da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula muscular lisa ou a liberação desse íon dos estoques intracelulares está diretamente relacionada com a broncoconstrição e com a manutenção do tônus basal das vias aéreas e, fisiologicamente, é coordenada pelo sistema nervoso parassimpático (BARNES, 1992), via fibras colinérgicas que derivam do nervo vago para gânglios parassimpáticos presentes na superfície das vias aéreas. A ACh é o principal neurotransmissor do sistema nervoso parassimpático, atuando pós-juncionalmente nos receptores acoplados a proteína G (GPCR) do tipo muscarínicos  $M_3$ , presentes

nas vias aéreas, favorecendo a contração do músculo liso (OUEDRAOGO; ROUX, 2014). Em processos patológicos, a exemplo da asma, tem-se a participação de outros mediadores como a histamina, neurocinina, cisteinil leucotrienos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>), prostaglandina F<sub>2α</sub>, prostaglandina D<sub>2</sub> e tromboxano que ao ativar seus receptores GPCR do tipo H<sub>1</sub>, NK<sub>1</sub>/NK<sub>2</sub>, CysLT<sub>1</sub>/CysLT<sub>2</sub>, FP, DP<sub>2</sub> e TP, respectivamente (PELAIA et al., 2008), levam a broncoconstrição.

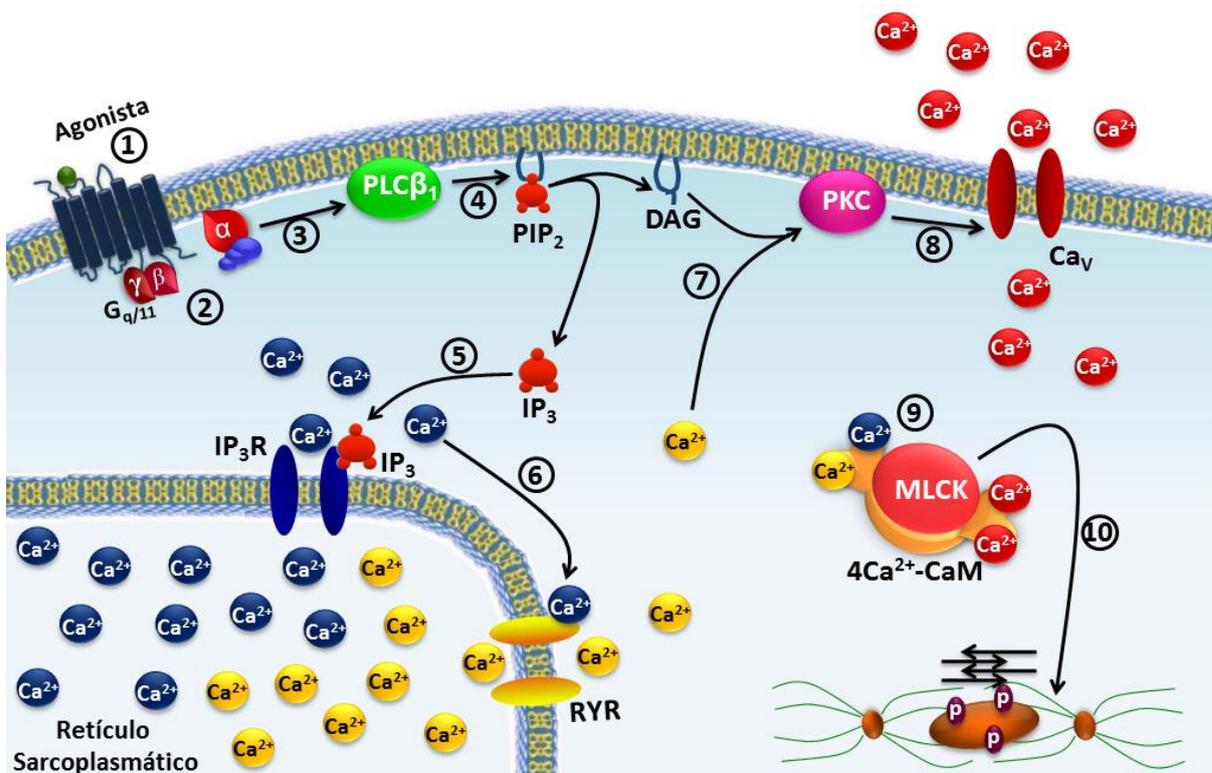
Todos esses receptores são acoplados ao mesmo subtipo de proteínas G, G<sub>q/11</sub>, que ao serem ativadas estimulam a via da fosfolipase C-β<sub>1</sub> (PLC-β<sub>1</sub>), no fenômeno denominado de mecanismo fármaco-mecânico da contração (Figura 3). Nesse processo a ligação do agonista a seu receptor induz uma mudança conformacional, que irá ativar a proteína G<sub>q/11</sub>, cuja subunidade α ligada ao trifosfato de guanosina (GTP) ativa a PLC-β<sub>1</sub>. Essa, por sua vez, hidrolisa o 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>) produzindo dois segundos mensageiros, o 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG) (HALL, 2000). O IP<sub>3</sub>, por ser hidrossolúvel, difunde-se pelo citosol e liga-se ao seus receptores específicos, os receptores de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R), localizados no RS, desse modo mobilizando os estoques de Ca<sup>2+</sup> sensíveis a IP<sub>3</sub>, enquanto que o DAG ativa a proteína cinase C (PKC), que afeta a sensibilidade do aparato contrátil ao cálcio (PELAIA et al., 2008).

O mecanismo fármaco-mecânico da contração inclui, além do aumento de IP<sub>3</sub> e ativação dos IP<sub>3</sub>R permitindo a liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares, também induz a liberação do Ca<sup>2+</sup> induzida por Ca<sup>2+</sup> através de receptores de rianodina (RyR) presentes na membrana do RS, os quais são ativados pelo Ca<sup>2+</sup> previamente liberado via IP<sub>3</sub>R, além de também levar ao influxo de Ca<sup>2+</sup> através da abertura dos Ca<sub>v</sub> por um mecanismo que não envolve mudança no potencial de membrana, mas sim via ativação deste canal pela PKC (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

A rápida e transiente elevação da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> é responsável pela ocupação sequencial dos quatro sítios de ligação para o Ca<sup>2+</sup> presentes na calmodulina (CaM). Esta é a mais conhecida das proteínas ligantes de Ca<sup>2+</sup>, com alta afinidade por este íon. As proteínas da família S100 (S100A1, S100A4, S100A6 e S100A10) que são pequenas proteínas ácidas com peso molecular de 11 kDa (HEIZMANN, 1991) também tem afinidade pelo Ca<sup>2+</sup> no músculo liso e estão envolvidas na regulação de diferentes mecanismos de sinalização intracelular dependentes de cálcio (DONATO, 1999, 2001).

O complexo  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM ativa e expõe o domínio enzimático da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que fosforila um resíduo específico de aminoácido (serina 19) presente na porção regulatória da cadeia leve da miosina de 20 kDa (MLC<sub>20</sub>) (PELAIA et al., 2008). A MLCK possui sua expressão aumentada em células musculares lisas das vias aéreas de pacientes asmáticos (MA et al., 2002). Uma vez fosforilada pela MLCK, a MLC<sub>20</sub> fica apta a interagir com a miosina, iniciando-se o ciclo das pontes cruzadas, ou seja, o movimento da cabeça da miosina sobre os filamentos da actina, que resulta no fenômeno biológico da contração muscular lisa.

**Figura 3** – Mecanismo fármaco-mecânico da contração muscular lisa pela ativação da via  $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$ .



Fonte: Correia, 2013.

(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas  $G_{q/11}$  troca GDP por GTP na sua subunidade  $\alpha$  (não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) A subunidade  $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima  $PLC\beta_1$ ; (4) A  $PLC\beta_1$  cliva o lipídio de membrana  $PIP_2$  em  $IP_3$  e DAG; (5) O  $IP_3$  migra pelo citoplasma e ativa o  $IP_3R$  presente na membrana do RS, liberando o  $Ca^{2+}$  dos estoques; (6) O  $Ca^{2+}$  liberado ativa o  $RyR$ , fazendo com que mais  $Ca^{2+}$  seja liberado para o citoplasma; (7) O  $Ca^{2+}$  que foi liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; (8) A PKC ativada fosforila os  $Ca_v1$  promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos mesmos; (9) O aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  aumenta a afinidade pela CaM formando o complexo  $4Ca^{2+} - CaM$  e ativando a MLCK; (10) A MLCK ativada fosforila a MLC e esta se torna ativa e 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.

Uma vez que o músculo liso das vias aéreas foi exposto a um agente contrátil, observa-se um pico inicial e transiente na  $[Ca^{2+}]_c$ , seguido por um declínio e estabelecimento de um estado estacionário prolongado que apresenta um aumento sutil na  $[Ca^{2+}]_c$ , em relação aos níveis basais. Diferentemente da primeira fase, que ocorre majoritariamente pela liberação do  $Ca^{2+}$  dos estoques, o estado estacionário de platô depende do  $Ca^{2+}$  extracelular (MURRAY; FLEISCHMANN; KOTLIKOFF, 1993). Assim como outros músculos lisos, a contração muscular das vias aéreas persiste durante o estado estacionário em resposta a agentes excitatórios, sendo

relatado como um comportamento funcional que implica no aumento de sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  pelo aparato contrátil (SOMLYO; SOMLYO, 1994) e que permite ao músculo liso das vias aéreas permanecer contraído mesmo quando os níveis citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  são sutilmente maiores que a concentração basal de repouso. Esse evento é descrito como via de sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  e acredita-se que o mesmo seja envolva uma via de sinalização que inclui a RhoA/Rho cinase (ROK) e o sistema efetor PKC/peptídeo inibidor da fosfatase da miosina potencializado pela PKC com 17 kDa (MARSICO et al., 1990).

Dessa forma, assim como o aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  é o sinal que leva à contração do músculo liso, conseqüentemente, o seu relaxamento se dá pelo reestabelecimento dos níveis basais deste íon no citosol (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Esta diminuição na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  pode ocorrer por um mecanismo eletromecânico, caracterizado pela repolarização (ou hiperpolarização) da membrana, ou pelo mecanismo fármaco-mecânico, que se dá pela ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM; BROPHY, 2001).

No músculo liso das vias aéreas, o mecanismo de relaxamento fármaco-mecânico está diretamente relacionado aos nucleotídeos monosfato cíclico de adenosina (cAMP) e monosfato cíclico de guanosina (cGMP) são considerados importantes agentes fisiológicos relacionados ao relaxamento (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009) (Figura 5). A elevação do conteúdo citosólico de cAMP é um evento relacionado à inibição do aparato contrátil do músculo liso das vias aéreas e, indiscutivelmente, é o evento mais relevante relacionado ao cAMP nessas vias (BILLINGTON et al., 2013).

A produção desse nucleotídeo cíclico inicia-se com a ativação de um GPCR, a exemplo do receptor adrenérgico  $\beta_2$  ou do receptor IP, acoplado à proteína  $G_s$ , que agora passa a estimular a conversão do ATP à cAMP via ativação da ciclase de adenilil (AC) (HALL, 2000). Por sua vez, os níveis citosólicos de cGMP podem ser aumentados através da liberação do óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais (RICCIARDOLO et al., 2004).

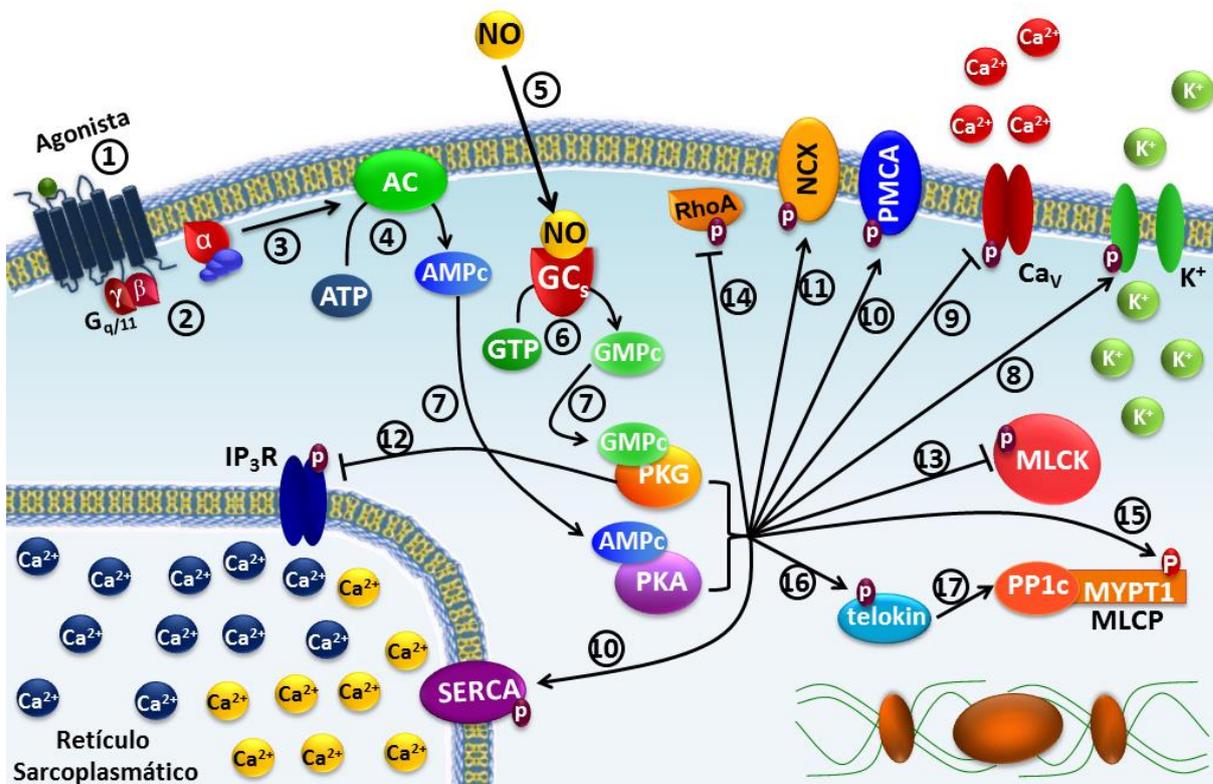
Por fim, o cAMP e o cGMP irão ativar suas respectivas proteínas efetoras, a proteína cinase A (PKA) e a proteína cinase G (PKG), as quais passam a intermediar eventos como: 1) o aumento na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase tanto do RS

(SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando assim o sequestro e extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente, diminuindo a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ; 2) a inativação dos  $\text{IP}_3\text{R}$  e reduzindo assim a sua capacidade de liberar o  $\text{Ca}^{2+}$  do RS; 3) diminuição da formação do  $\text{IP}_3$  e conseqüente diminuição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS; 4) inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo  $4\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$ , causando uma redução nos níveis de MLC fosforilada e assim do processo contrátil; 5) inibição da RhoA e proteínas envolvidas nessa via 6) inibição dos  $\text{Ca}_V$ , causando uma redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  por diminuir o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ; 7) ativação de canais de  $\text{K}^+$ , que indiretamente, por repolarização ou hiperpolarização, causam a desativação dos  $\text{Ca}_V$  (DANILA; HAMILTON, 2004; DUTTA et al., 2002; WOODRUM; BROPHY, 2001).

Os canais de  $\text{K}^+$  são os responsáveis pelo reestabelecimento do potencial de membrana após um episódio de despolarização, sendo dependente do movimento dos íons  $\text{K}^+$  para fora da célula e, de maneira inversa, o bloqueio desses canais por drogas como o tetraetilamônio ou a 4-aminopiridina resulta no aumento da excitabilidade celular ou hiper-responsividade dos miócitos (CHUNG; BARNES, 2009). Dessa forma, a abertura dos canais de  $\text{K}^+$  está associada com a manutenção do potencial de repouso e de inibição da atividade contrátil (VOGALIS, 2000), relacionando-se ainda com vários outros processos celulares como o controle do volume celular, a secreção hormonal e o controle da formação e propagação de sinais elétricos em células excitáveis (MACKINNON, 2003).

A atividade desses canais pode ser regulada por voltagem,  $\text{Ca}^{2+}$  ou por neurotransmissores e, conseqüentemente, as vias de sinalização que eles estimulam (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011). No músculo liso das vias aéreas, os canais de potássio podem ser subdivididos em quatro principais classes: os dependentes de voltagem ( $\text{K}_V$ ), os ativados por cálcio ( $\text{K}_{Ca}$ ), os sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{ATP}$ ) e os regulados ou abertos por receptor (CHUNG; BARNES, 2009).

**Figura 4** – Mecanismo do relaxamento no músculo liso das vias aéreas induzido pelo cAMP e pelo cGMP.



Fonte: Correia, 2013.

(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) A proteína  $G_s$  troca GDP por GTP na sua subunidade  $\alpha$  (não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) A subunidade  $\alpha_s$ -GTP ativa a AC; (4) A AC converte o ATP em AMPc; (5) O NO gerado tanto dos nervos como das células musculares lisas, estimula a atividade da  $GC_s$ ; (6) A  $GC_s$  converte o GTP em cGMP; (7) Os nucleotídeos cíclicos, AMPc e cGMP ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: (8) Ativam os canais de  $K^+$ ; (9) Inibem os  $Ca_v$ ; (10) Aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; (11) Ativam do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ ; (12) Fosforilação do  $IP_3R$  pela PKG, mas não pela PKA. Todos esses mecanismos diminuem a  $[Ca^{2+}]_c$ ; (13) Inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo  $[(Ca^{2+})_4-CaM]$ ; (14) Inibem a RhoA; (15) Ativam a MYPT1; (16) Ativam o telokin; (17) O telokin ativa a MLCP. Todos esses mecanismos impedem a ativação da MLC e, conseqüentemente, sua interação com os filamentos de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Para que haja a homeostasia entre os processos relacionados à responsividade do músculo liso das vias aéreas, os nucleotídeos cíclicos cAMP e cGMP têm seu conteúdo citosólico regulado pela atividade das fosfodiesterases (PDEs). Essas enzimas atuam hidrolisando e inativando o cAMP e o cGMP em 5' AMP e 5' GMP, respectivamente, e por conseguinte essa inibição realizada pelas PDEs representa um potencial mecanismo pelo qual as funções celulares, como a

reatividade e a liberação de mediadores inflamatórios podem ser moduladas (MAURICE et al., 2014).

Até o presente momento, onze famílias de PDEs foram identificadas, sendo denominadas como PDE1–11 (PAGE, 2014), sendo que os onze genes relacionados às famílias de PDEs podem ainda gerar pelo menos vinte e um isoformas com características distintas (PAGE; SPINA, 2011). Essas famílias e isoformas diferem entre si com relação às suas estruturas primárias, suas afinidades pelo cAMP e/ou cGMP, suas respostas à efetores específicos, distribuição celular e tecidual, suas sensibilidades para inibidores específicos e seus mecanismos de regulação (PAGE; SPINA, 2011; MAURICE et al., 2014; BINGHAM; SUDARSANAM; SRINIVASAN, 2006). Dos subtipos de PDEs identificados até o momento, os de interesse para as doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas, como a asma, são a da família 3, 7, e, principalmente, 4 (MAURICE et al., 2014).

As PDE4 são responsáveis pela hidrólise seletiva de cAMP, sendo classificadas como metalo-hidrolases (DE AZEVEDO; KÜMMERLE, 2014). Esta enzima possui em seu sítio catalítico íons de  $Zn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  capazes de formar complexos com o substrato nucleotídico em questão que auxiliam na reação de hidrólise (XU et al., 2000) Estas enzimas estão presentes em uma gama de diferentes tecidos como células do sistema imunológico, linfócitos T (GIEMBYCZ et al., 1996), neutrófilos (NIELSON; VESTAL; STURM, 1990), monócitos (SELDON et al., 1995), eosinófilos (DENT et al., 1994), basófilos, endotélio (PEACHELL et al., 1992), cérebro e músculo liso de vias aéreas (HOUSLAY; SCHAFFER; ZHANG, 2005).

A família PDE4 é codificada por quatro genes que originam subtipos distintos, a PDE4A, B, C e D que através de *splicing* alternativo originam mais de 25 isoformas distintas, tornando essa família a mais extensa dentre as PDEs (KERAVIS; LUGNIER, 2012). As isoformas A, B, e D são as de maior relevância em doenças que apresentam um caráter inflamatório, como a asma, devido a sua expressão em células inflamatórias humanas (células T e B, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, células endoteliais e epiteliais das vias aéreas), além do próprio músculo liso das vias aéreas (LUGNIER, 2006). Já a PDE4C é encontrada principalmente nos testículos, músculo esquelético e sistema nervoso central (KODIMUTHALI; JABARIS; PAL, 2008).

A família PDE4 possui diferentes sítio de inicialização/promotores e de *splicing* de mRNA variável, a transcrição a partir dos quatro genes PDE4 resulta na expressão de mais de 25 isoformas diferentes da enzima PDE4, onde cada isoforma tem uma região N-terminal única que a caracteriza e confere a habilidade de interagir com parceiros específicos, como proteínas acessórias ou de ancoragem, e assim ser direcionada e localizada em regiões intracelulares específicas (CEDERVALL et al., 2015). Quanto a sua estrutura molecular, cada isoforma de PDE4 possui, além de uma região N-terminal específica, duas sequências regulatórias denominadas *upstream conserved region 1* (UCR1) e UCR2, as quais são domínios catalíticos altamente conservados, e uma região C-terminal específica para cada subfamília de PDE4 (BOLGER et al. 1993). A UCR1 e UCR2 são regiões regulatórias únicas para cada isoforma de PDE4 e suas presenças, em conjunto com a susceptibilidade à inibição pelo rolipram, distingue-as das demais classes de PDEs (McCAHILL et al., 2008).

As várias isoformas de PDE4 podem ainda ser categorizadas em 4 grupos de acordo com a disposição das regiões UCR1 e UCR2, são essas: 1) formas longas, as quais possuem as regiões UCR1 e 2 intactas; 2) formas curtas que perdem a região UCR1 mas conservam a UCR2; 3) formas super-curtas, que além de perder a região UCR1, apresentam um UCR2 N-terminalmente truncado; 4) forma ausente, que possui o UCR1 e 2 truncados e cataliticamente inativos (HOUSLAY, 2001; HOUSLAY; BAILLIE; MAURICE, 2007). A UCR1 e 2 funcionam como domínios regulatórios que controlam a unidade catalítica das PDE4, uma vez que atuam como sítios de fosforilação para as enzimas PKA e ERK (HOUSLAY; ADAMS, 2003). Essas cinases possuem efeito regulatório sobre as PDE4 ao fosforilar resíduos de serina presentes nos domínios regulatórios UCR1 e 2 ou próximos da porção catalítica, respectivamente (MURTHY; ZHOU; MAKHLOUF, 2002).

Em especial, a fosforilação mediada pela PKA pode ativar todas as isoformas longas de PDE4, uma vez que foi constatado que a elevação intracelular de cAMP leva ao aumento da atividade da PDE4 (MARCHMONT; HOUSLAY, 1980), fornecendo um mecanismo de retroalimentação que reestabelece os níveis celulares basais de cAMP após uma estimulação. Por fim, os domínios UCR são interligados por uma região conhecida como *linker region 1* (LR1) e ligados a região catalítica pela região LR2. Essas pequenas regiões variam muito entre as subfamílias de

PDE4 por motivos ainda não elucidados até o presente momento (McCAHILL et al., 2008).

A unidade catalítica da PDE4 é codificada por seis exons, é altamente conservada entre os membros dessa família e se conserva na ordem de, aproximadamente, 75% da sequência de aminoácidos (BENDER; BEAVO, 2006). Estudos de cristalografia de raios-X feitos com a isoforma PDE4B demonstraram que a estrutura do sítio ativo é formada por uma reentrância profunda presente no domínio catalítico da enzima, ficando voltado diretamente para face externa e exposto ao solvente. Este sítio é dividido em três regiões com funções e características físico-químicas distintas (XU et al., 2000).

A primeira região é formada pelo centro metálico composto de íons divalentes, no qual está presente o  $Zn^{2+}$  (coordenado com resíduos de histidina e aspartato, além de duas moléculas de água) e o íon  $Mg^{2+}$  (coordenado com o mesmo resíduo de aspartato que coordena o  $Zn^{2+}$ , bem como mais cinco moléculas de água). Esta região é a responsável pela hidrólise da ligação fosfodiéster do substrato AMPc (XU et al., 2000; HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005; SPINA, 2008; KE, 2004; WANG, et al., 2007). A segunda região possui uma cavidade hidrofóbica com resíduos de aminoácidos apolares, como isoleucina e fenilalanina, capazes de interagir por interações hidrofóbicas e do tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacking*, respectivamente, com o anel planar purínico presente no AMPc. Nesta mesma região, encontra-se ainda o resíduo de glutamina 369 que é responsável por uma importante interação com os nitrogênios da adenosina através de ligação hidrogênio (XU et al., 2000; KE, 2004; CARD, et al., 2004). Por fim, a terceira região possui uma cavidade hidrofílica constituída essencialmente de resíduos de aminoácidos hidrofílicos e preenchida com uma rede de moléculas de água. Estas regiões são denominadas respectivamente, sítio M, sítio Q e sítio S (XU et al., 2000; HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005; SPINA, 2008; CARD, et al., 2004; KE, 2004; WANG, et al., 2007)

A hidrólise do AMPc ocorre através da interação desta molécula com os resíduos de aminoácidos presentes nos subdomínios Q e M da porção catalítica das PDE4. No sítio Q ocorre o reconhecimento do núcleo adenosina presente na estrutura do substrato, e no sítio M ocorre a reação de hidrólise propriamente dita. Neste, os átomos de oxigênio presentes na estrutura do substrato interagem com os íons  $Zn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , que atuam como ácidos de Lewis, tornando o átomo de fósforo

mais eletrofílico e suscetível ao ataque do grupo hidroxila, gerado pela desprotonação de uma molécula de água coordenada nesta região (XU et al., 2000; HOUSLAY; ADAMS, 2003; HUAI et al., 2003). (Figura 6).

**Figura 5** – Domínio catalítico da PDE4 com o cAMP. Subdomínios destacados em verde, para o subdomínio S, em amarelo, para o subdomínio M, e em vermelho para o subdomínio Q.



Fonte: Adaptado de Azevedo e Kümmerle (2014).

Dessa forma, drogas capazes de inibir as PDEs, em especial as PDE4, aumentando os níveis citosólicos dos nucleotídeos cíclicos e, conseqüentemente, induzindo o relaxamento das vias aéreas seriam candidatas a possíveis fármacos antiastmáticos. Nesse intuito, a química medicinal, uma ciência que objetiva a síntese de compostos através da correlação de sua estrutura química e de uma atividade farmacológica desejada (BARREIRO et al., 2002), é uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

### 2.3 A química medicinal e o caminho para novas possibilidades terapêuticas

A química medicinal engloba o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; o isolamento de princípios ativos naturais (plantas, animais e minerais); a identificação ou elucidação da estrutura; a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações entre a estrutura e as propriedades) até suas características estruturais quando das interações com os diferentes sistemas biofases/biológicos; a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos. E, finalmente, a

proposição e validação de modelos matemáticos através dos estudos de relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica e/ou toxicológica, permitindo então a proposição de novas entidades de interesse (DO AMARAL; MONTANARI, 2002).

Esta área de conhecimento, utilizando diferentes estratégias metodológicas complementares, é tradicional e reconhecidamente usada no planejamento de fármacos. O desenvolvimento e sucesso em química medicinal requerem o conhecimento e aplicação de estratégias metodológicas híbridas, no centro de um grande espaço inter, trans e multidisciplinar fundamentadas por conhecimentos, por exemplo, em biofísica, biologia molecular, bioquímica, clínica médica, estatística, físico-química, fisiologia, matemática, neurobiologia, patologia, química biológica, química inorgânica, química orgânica e química quântica (DO AMARAL; MONTANARI, 2002).

Um projeto de química medicinal compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo (WERMUTH, 2003). Entende-se por descoberta a etapa destinada à eleição do alvo terapêutico, útil para o tratamento de uma determinada fisiopatologia, a aplicação de estratégias de planejamento molecular para desenho de ligantes do alvo selecionado – utilizando as estratégias de modificação molecular clássicas da química medicinal, tais como biososterismo, homologação, simplificação e hibridação molecular (BARREIRO; MANSSOUR, 2001; BARREIRO, 2002; LIMA; BARREIRO, 2005), ou pelo emprego de técnicas computacionais como a modelagem molecular e o estudo quantitativo da relação estrutura química/atividade (QSAR). Compreende, ainda, realizar a determinação das atividades farmacológicas do ligante, que uma vez ativo *in vivo*, preferencialmente por via oral, passa a ser denominado protótipo (LIMA, 2007).

A etapa de otimização compreende o melhoramento da estrutura do protótipo, através de modificações planejadas com auxílio de técnicas definidas – que podem identificar os diferentes níveis de contribuição farmacofórica, fornecer informações sobre a conformação bioativa e antecipar o índice de reconhecimento molecular pelo alvo selecionado – visando o aumento da potência, seletividade, diminuição da toxicidade, adequação do perfil farmacocinético (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, ADMET) e estabelecimento da relação estrutura-atividade (SAR), a partir da síntese e avaliação farmacológica, *in vitro* e *in vivo*, de séries congêneres ao protótipo identificado originalmente (WERMUTH,

2003; BARREIRO; MANSSOUR, 2001). A etapa de desenvolvimento do protótipo objetiva a otimização de suas propriedades ADMET e farmacêuticas (solubilidade, odor e sabor), de modo a viabilizar seu uso clínico, através da preparação eventual de pró-fármacos, complexos de inclusão, microemulsões, formulações de liberação lenta, entérica, etc (WERMUTH, 2003).

Nesse contexto, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) vêm contribuindo com a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos, visando colaborar na obtenção de novas drogas para o tratamento das mais variadas enfermidades, e, em especial, às relacionadas ao trato respiratório, a exemplo da DPOC e da asma, buscando compostos eficientes e com efeitos colaterais mais brandos, que não venham a comprometer a adesão ao tratamento. De maneira mais específica, o LASSBio<sup>®</sup> tem voltado sua atenção sobre um importante alvo envolvido no processo fisiopatológico da asma, a PDE4.

Devido a sua capacidade de modular os níveis celulares de cAMP, a PDE4 pode atuar regulando várias respostas biológicas, como a ação de monócitos, células T, neutrófilos, contração do músculo liso das vias aéreas, entre outras funções. Somado a isso, o fato da PDE4 ser encontrada em muitos tecidos e células, a exemplo dos leucócitos e do músculo liso das vias aéreas, sugere um grande potencial para intervenções farmacológicas em várias doenças inflamatórias das vias aéreas, como a asma (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005).

Nesse sentido, foi planejado e desenvolvido o rolipram, um potente e seletivo inibidor da PDE4, apresentando 100 vezes mais seletividade por esta isoforma com relação às outras PDEs (HATZELMANN et al., 2010; MAURICE et al., 2014), além de muitos outros representantes da mesma classe química (catecol ou dialcoxifenil) que seguiram para triagem clínica no tratamento da asma, a exemplo da zardaverina, filamilaste e mesopram. No entanto, tais estudos foram interrompidos devido à estreita janela terapêutica desses fármacos, além dos efeitos colaterais intensos de náusea, vômito e diarreia. Assim, a busca por inibidores de PDE4 “não eméticos” e com maior janela terapêutica tem incentivado os químicos medicinais a desenvolverem novos candidatos (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005).

Tomando o rolipram como molécula de partida, o LASSBio<sup>®</sup> planejou e sintetizou uma nova série de derivados objetivando o desenvolvimento de compostos ativos por via oral que não reproduzissem as características indesejáveis

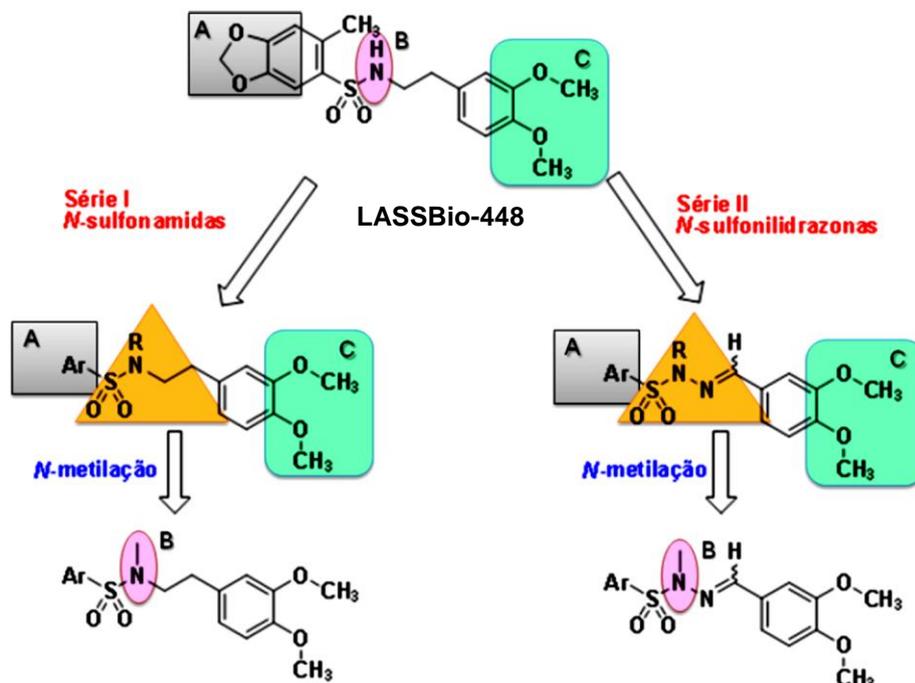
supracitadas. Este estudo demonstrou que a substituição dos grupos amida e ciclopentila pelos grupos sulfonamida e metoxila respectivamente, aumentou a atividade inibitória da PDE4 da nova série em relação ao precursor e diminuiu seus efeitos adversos (MONTANA et al., 1998).

Em seguida, foi obtida uma série com derivados sulfonamídicos funcionalizados, os quais foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir a PDE4 bruta e de inibir a degranulação de mastócitos e liberação tecidual de histamina *in vitro* na concentração de 100  $\mu$ M, com base num modelo de liberação anafilática de histamina, tendo como referência o rolipram. Considerando o fato de que todos os compostos ativos dessa série apresentaram potências similares e com base na triagem através do modelo de degranulação de mastócitos, o composto LASSBio-448 (Figura 7) apesar de não ter se mostrado o mais potente, foi selecionado como protótipo da série utilizando-se como critério sua simplicidade estrutural, uma vez que, tal característica permitiria modificações estruturais adicionais (NUNES, 2013).

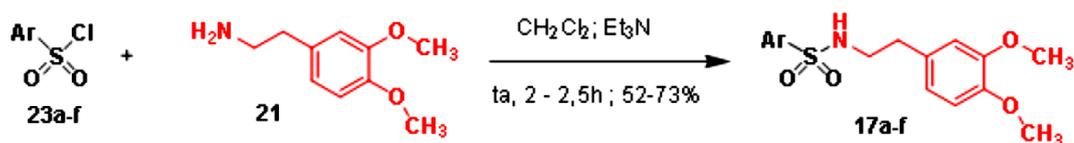
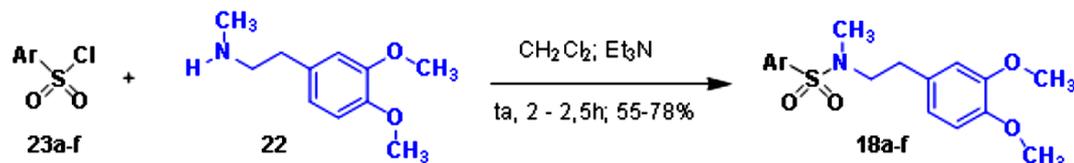
Esse composto ainda foi avaliado quanto a sua capacidade de inibir, de forma preventiva, o acúmulo de eosinófilos no pulmão de camundongos desafiados com ovalbumina (OVA), de inibir a hiper-reatividade pulmonar murina induzida pela administração aerossólica intranasal de OVA e de relaxar a traqueia de ratos pré-contraindidos com carbacol (CCh) (CARDOZO, 2010). Em conjunto, os resultados obtidos corroboraram o perfil anti-PDE4 do LASSBio-448, caracterizando-o como um novo protótipo inibidor seletivo da PDE4, ativo por via oral. Contudo, a baixa potência apresentada compromete sua eventual aplicação como candidato a fármaco, sugerindo a necessidade de otimização estrutural.

Nesse intuito foi planejado e desenvolvido por Nunes (2013), utilizando o LASSBio-448 como molécula precursora, duas novas séries de compostos químicos: a série I, com 12 compostos *N*-sulfonamídicos (17a-f e 18a-f) e a série II, com 10 compostos *N*-sulfonilidrazônicos (19a-e e 20a-e), variando-se a natureza dos radicais arilas ligados a função sulfonamida (Figura 8A e B).

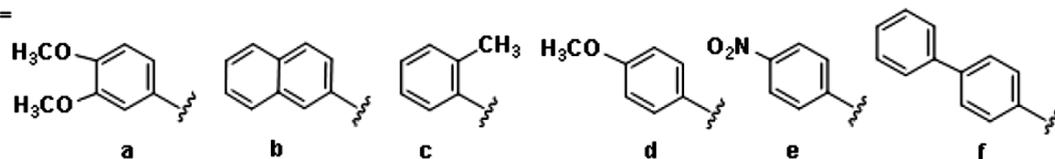
Figura 6 – Planejamento estrutural das séries I e II análogas ao LASSBio-448.



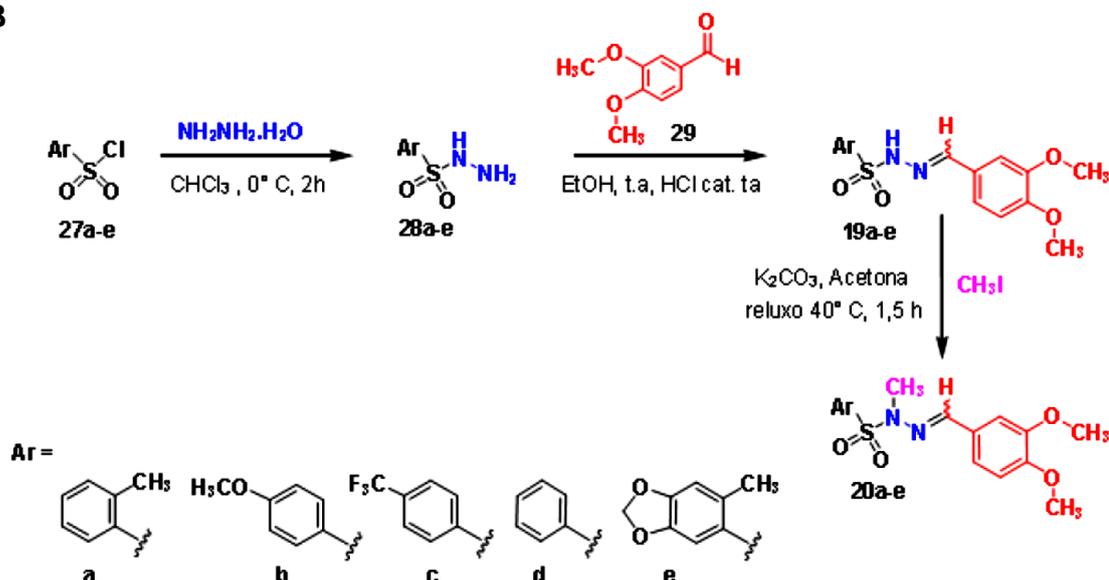
Fonte: Nunes, 2013.

Figura 7 – Rotas sintéticas para obtenção dos compostos *N*-sulfonamídicos da série I (17a-f; 18a-f) (A) e *N*-sulfonilidrazônicos da série II (19a-e; 20a-e) (B).**A Sulfonamídicos*****N*-metil-sulfonamídicos**

Ar =



B



Fonte: Nunes, 2013.

Essas duas séries foram avaliadas quanto a sua capacidade inibitória frente às isoformas de PDE4 humana (A1A, B1, C e D3), sendo avaliados nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ . Os resultados mostraram que houveram diferenças nas atividades inibitórias apresentadas pelas séries metiladas e não metiladas, sendo que, de forma geral, os compostos não metilados apresentaram atividade inibitória (> 40%) frente às isoformas de PDE4 (NUNES, 2013).

Em um estudo mais recente, realizado por nosso grupo de pesquisa, avaliou-se a resposta de alguns derivados da série II (LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851) no modelo funcional de músculo liso das vias aéreas de cobaias não asmáticos. Neste, Medeiros (2015) evidenciou que todos os compostos avaliados apresentaram efeito relaxante em traqueia de cobaia pré-contraída com carbacol (CCh), sendo o LASSBio-1846 o de melhor perfil farmacológico (Tabela 2). Além disso, nesse estudo também se caracterizou o mecanismo de ação desse derivado, ficando estabelecido a participação dos receptores adrenérgicos- $\beta$  e da via AC/cAMP/PKA, além da inibição das PDEs.

**Tabela 1** - Valores de  $pD_2$  e de  $E_{max}$  dos LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851 na presença (E+) e na ausência (E-) de epitélio funcional em traqueia de cobaia não asmático.

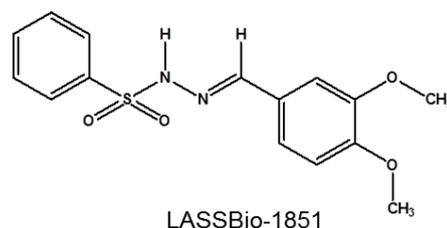
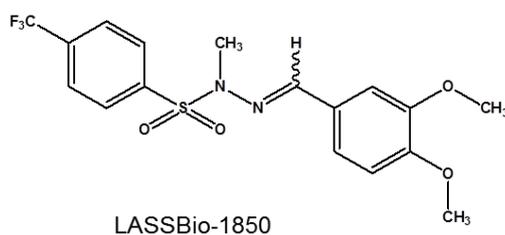
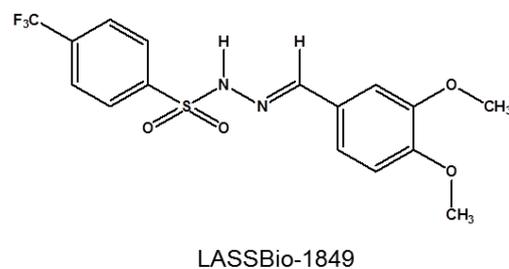
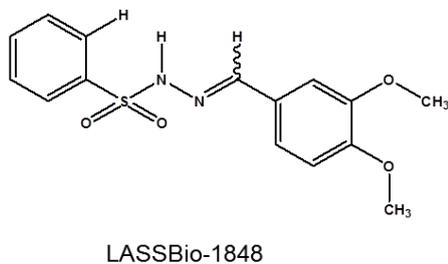
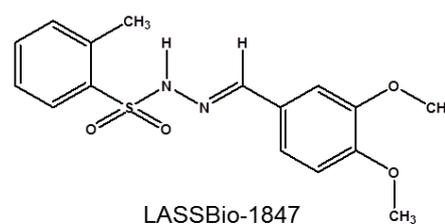
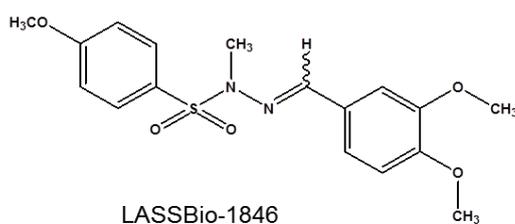
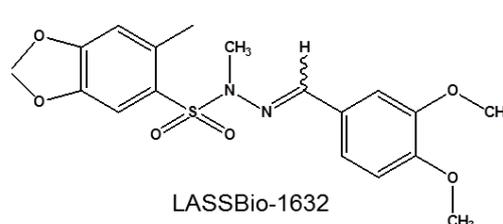
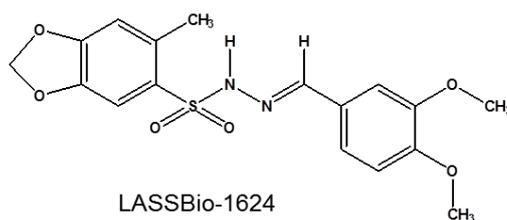
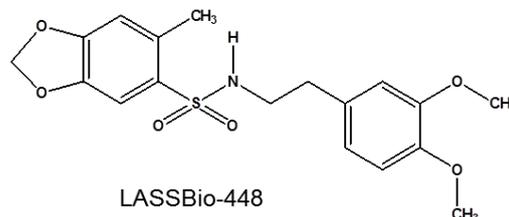
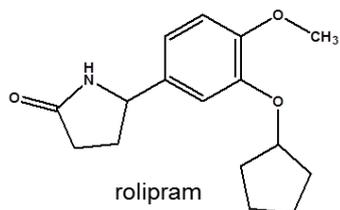
LASSBio	E+		E-	
	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$pD_2$	$E_{max}$ (%)
<b>1846</b>	5,34 ± 0,04 <sup>***</sup>	100	5,15 ± 0,08 <sup>*,**,***</sup>	100
<b>1847</b>	4,81 ± 0,02 <sup>###</sup>	100	4,78 ± 0,04 <sup>*,###</sup>	100
<b>1848</b>	4,51 ± 0,03 <sup>££</sup>	100	4,44 ± 0,03 <sup>£,££</sup>	100
<b>1849</b>	4,20 ± 0,08 <sup>¥¥</sup>	70,9 ± 3,3	4,10 ± 0,07 <sup>¥¥</sup>	97,9 ± 1,2
<b>1851</b>	4,70 ± 0,06	100	4,85 ± 0,08	100

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. E(+): <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$  [1846 vs. 1847/1848/1849/1851]; <sup>###</sup> $p < 0,001$  [1847 vs. 1848/1849]; <sup>££</sup> $p < 0,01$  [1848 vs. 1849]; <sup>¥¥</sup> $p < 0,001$  [1849 vs. 1851] e E(-): <sup>\*</sup> $p < 0,05$  [1846 vs. 1851]; <sup>\*\*</sup> $p < 0,01$  [1846 vs. 1847]; <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$  [1846 vs. 1848/1849]; <sup>#</sup> $p < 0,05$  [1847 vs. 1848]; <sup>###</sup> $p < 0,001$  [1847 vs. 1849]; <sup>£</sup> $p < 0,05$  [1848 vs. 1849]; <sup>££</sup> $p < 0,01$  [1848 vs. 1851]; <sup>¥¥¥</sup> $p < 0,001$  [1849 vs. 1851].

Fonte: Medeiros, 2015.

Diante do exposto, com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de novos candidatos a fármaco com potencial terapêutico na asma ou que possam ser utilizados como ferramenta farmacológica, decidiu-se avaliar outros membros da série II (LASSBio-1624, LASSBio-1632 e LASSBio-1850), além do precursor LASSBio-448 no modelo funcional de músculo liso das vias aéreas de cobaia. Os compostos LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851 (Figura 9), todos derivados *N*-sulfonilidrazônicos (série II), além do seu precursor, LASSBio-448, também foram avaliados em um modelo de asma alérgica em cobaias visando melhor mimetizar o perfil de hiper-responsividade da musculatura lisa das vias aéreas asmáticas, para assim fornecer dados mais fidedignos da ação desses derivados nessa enfermidade e, por fim, contribuir na seleção de novas candidatas à fármacos antiasmáticos.

**Figura 8** - Estruturas químicas do rolipram, LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851.



Fonte: Martins, 2016.

# ***3 Objetivos***

---



### 3.1 Geral

No presente estudo objetivou-se implantar e padronizar um modelo de asma alérgica em cobaias (*Cavia porcellus*) no Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas” e investigar-se uma possível ação relaxante de uma série de derivados sintéticos *N*-sulfonilidrazônicos do LASSBio-448, inibidores de PDE4, em músculo liso respiratório de cobaias asmáticos e não asmáticos, com a finalidade de contribuir para a busca de novas substâncias para o alívio ou controle dos sintomas da asma.

### 3.2 Específicos

- Validar o modelo de asma alérgica em cobaias (*Cavia porcellus*) através de uma abordagem histológica e funcional.
- Investigar um possível efeito relaxante dos derivados *N*-sulfonilidrazônicos (LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851) em traqueia de cobaias asmáticos e comparar suas potências e eficácias relativas em cobaias não asmáticos.
- Caracterizar o mecanismo de ação relaxante do derivado *N*-sulfonilidrazônico de maior potência e/ou eficácia relativas em traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos, investigando a(o):
  - papel do receptor adrenérgico- $\beta_2$ ;
  - envolvimento da via de transdução da AC;
  - participação de PDEs na via do nucleotídeo cíclico cAMP;
  - ativação da PKA;
  - nível tecidual de cAMP.

# ***4 Material e métodos***

---



## 4.1 MATERIAL

### 4.1.1 Produtos teste

Os derivados LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851 de massas moleculares 379,2; 378,4; 392,4; 364,4; 334,1; 348,1, 388,1; 402,1 e 320,1 u.m.a, respectivamente, foram gentilmente cedidos pelos professores Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro e Dra. Lídia Moreira Lima ambos do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

### 4.1.2 Animais

Eram utilizadas cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando entre 286,0-490,0 g para os animais não asmáticos e entre 211,0-423,0 g para os animais asmáticos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Antes dos experimentos, os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Presence<sup>®</sup>) com acesso a água *ad libitum*, ventilação e temperatura ( $21 \pm 1$  °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 6-18 h. Todos os procedimentos experimentais eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais, submetidos e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB sob número de certidão 0610/11 (Anexo A).

### 4.1.3 Drogas e Reagentes

O sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), o cloreto de cálcio di-hidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), a glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ), o cloreto de sódio (NaCl), o bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ), o cloreto de potássio (KCl), o hidróxido de sódio (NaOH), o fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) e o ácido clorídrico (HCl) foram obtidos da Vetec (Brasil). Estas substâncias, exceto a  $C_6H_{12}O_6$ , o  $NaHCO_3$  e o NaCl

eram dissolvidas, diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque e mantidas sob refrigeração.

O etanol absoluto foi obtido da FMaia (Brasil). O cloridrato de carbamilcolina (CCh), o ácido araquidônico (AA), o cremophor<sup>®</sup>, a aminofilina, o rolipram, o hidróxido de alumínio, a ovalbumina (OVA), a forskolina e o propranolol foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). O H-89 foi obtido da Cayman Chemical Company (EUA). Estas substâncias eram mantidas em um “freezer” à temperatura de -20 °C, dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto o AA, o rolipram e o H-89 que eram dissolvidos em etanol absoluto.

A mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) foi adquirida da White Martins (Brasil).

#### **4.1.4 Preparação das soluções estoque dos produtos teste**

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

#### **4.1.5 Solução nutritiva**

Para a realização dos experimentos, era utilizada a solução nutritiva de Krebs normal ajustada ao pH 7,4 com HCl ou NaOH 1N e gaseificada com mistura carbogênica, cuja composição está descrita abaixo:

Tabela 2 – Composição da solução de Krebs normal.

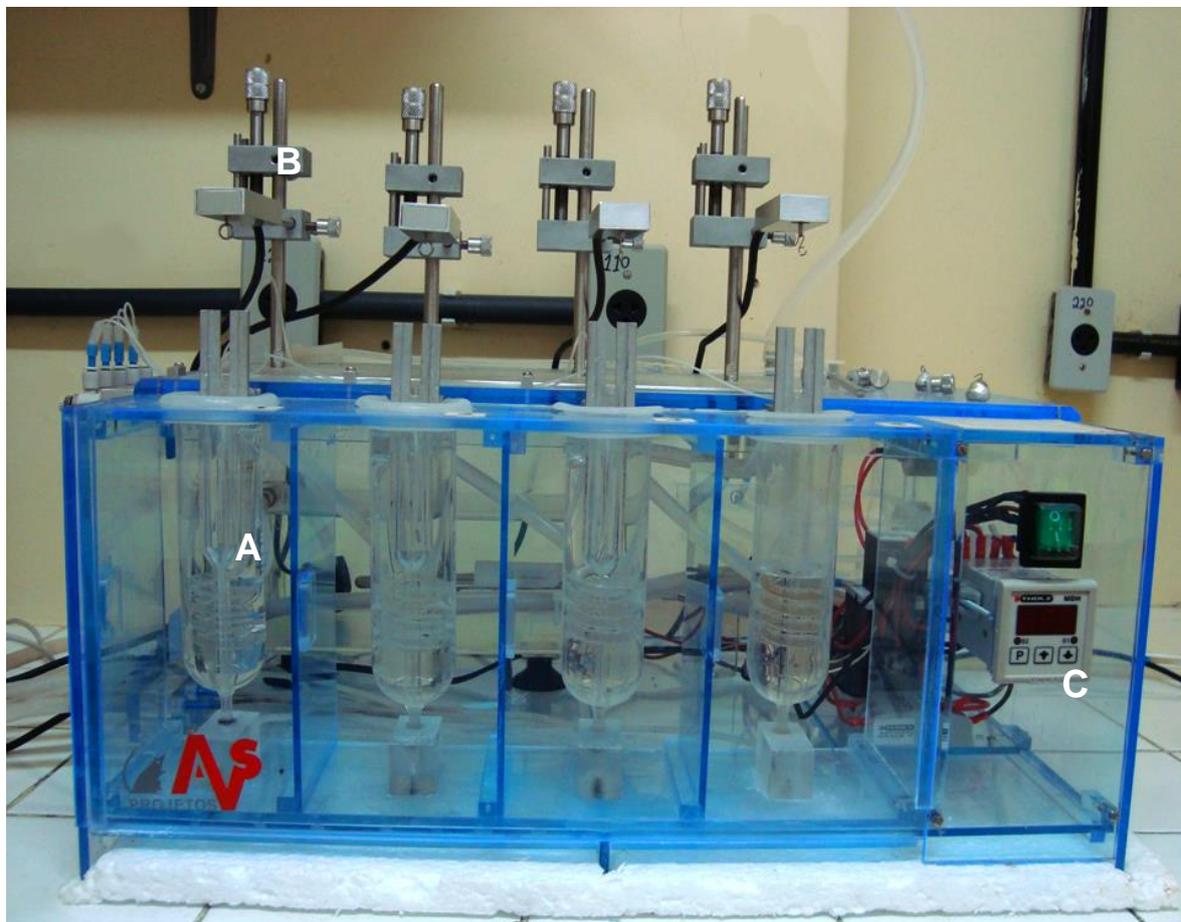
Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1
MgSO <sub>4</sub>	5,7
CaCl <sub>2</sub>	2,5
NaHCO <sub>3</sub>	25,0
Glicose	11,0

#### 4.1.6 Equipamentos

As contrações isométricas foram registradas por meio de transdutores de força isométricos (Figura 10) modelo TIM-05 AVS (São Carlos, SP, Brasil) (50 gramas), conectados a um amplificador (Figura 11) modelo AECAD04F AVS (São Carlos, SP, Brasil), os quais estavam conectados a um computador (Figura 11) utilizando o programa AQCAD para aquisição dos dados e ANCAD para análise, ambos da AVS (São Carlos, SP, Brasil). Os órgãos eram suspensos em cubas de 6 mL em um banho para órgãos isolados modelo BOI-04 AVS (São Carlos, SP, Brasil), o qual contém uma bomba termostática modelo BT-60 AVS (São Carlos, SP, Brasil) para o controle da temperatura das cubas (Figuras 10).

Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG2000 GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil) e todas as substâncias eram pesadas em balança analítica MARTE AY220 (São Paulo, SP, Brasil) (Figuras 11). Os animais eram pesados em balança semianalítica GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil).

**Figura 9** – Foto do sistema de banhos para órgãos isolados composto por cubas de vidro (A), transdutores isométricos (B) e bomba termostática (C).



Fonte: Monteiro, 2013.

**Figura 10** – Fotos do amplificador (A), microcomputador (B), pHmetro digital (C) e da balança analítica (D)



Fonte: Martins, 2016.

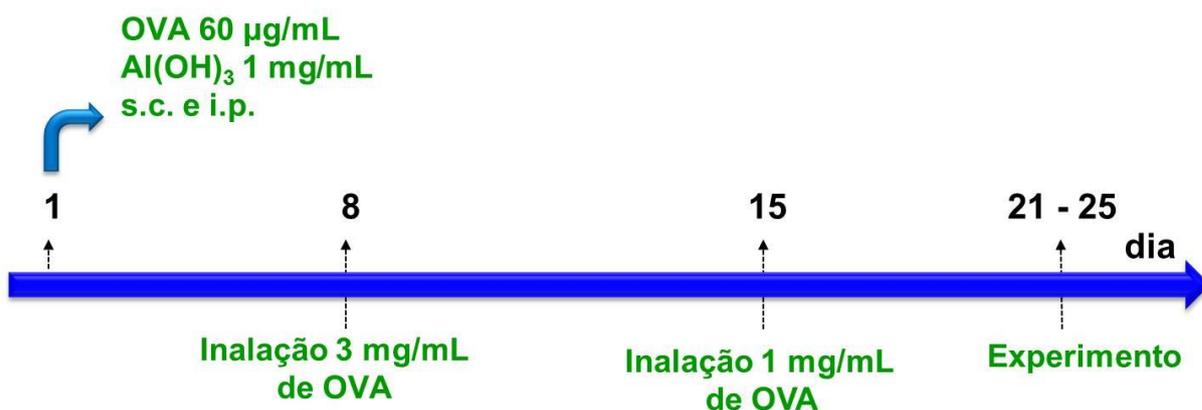
## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Implantação e padronização do modelo de asma em cobaia

#### 4.2.1.1 Sensibilização dos animais

Os cobaias eram sensibilizados no 1º dia no protocolo de sensibilização pela administração de ovalbumina (OVA) (60 µg/mL, i.p. e s.c.), como agente sensibilizante, e hidróxido de alumínio (1 mg/mL, i.p. e s.c.) como adjuvante, dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%). No 8º dia, os animais recebiam o desafio antigênico com OVA (3 mg/mL) dissolvida em solução salina por nebulização durante 5 minutos (Figuras 12 e 13). No 15º dia, os cobaias recebiam outro desafio com OVA (1 mg/mL) em solução salina por nebulização durante 1 minuto. Por fim, os animais eram eutanasiados entre o 21º e o 25º dias após o início do tratamento (ESPINOZA; MONTAÑO; PERUSQUÍA, 2013).

Figura 11 – Procedimento de indução de asma.



Fonte: Martins, 2016.

**Figura 12** – Sistema utilizado para nebulização dos cobaias composto por nebulizador (A) e compartimento de inalação (B).



Fonte: Martins, 2016.

#### **4.2.1.2 Avaliação histológica dos pulmões de cobaias não asmáticos e asmáticos**

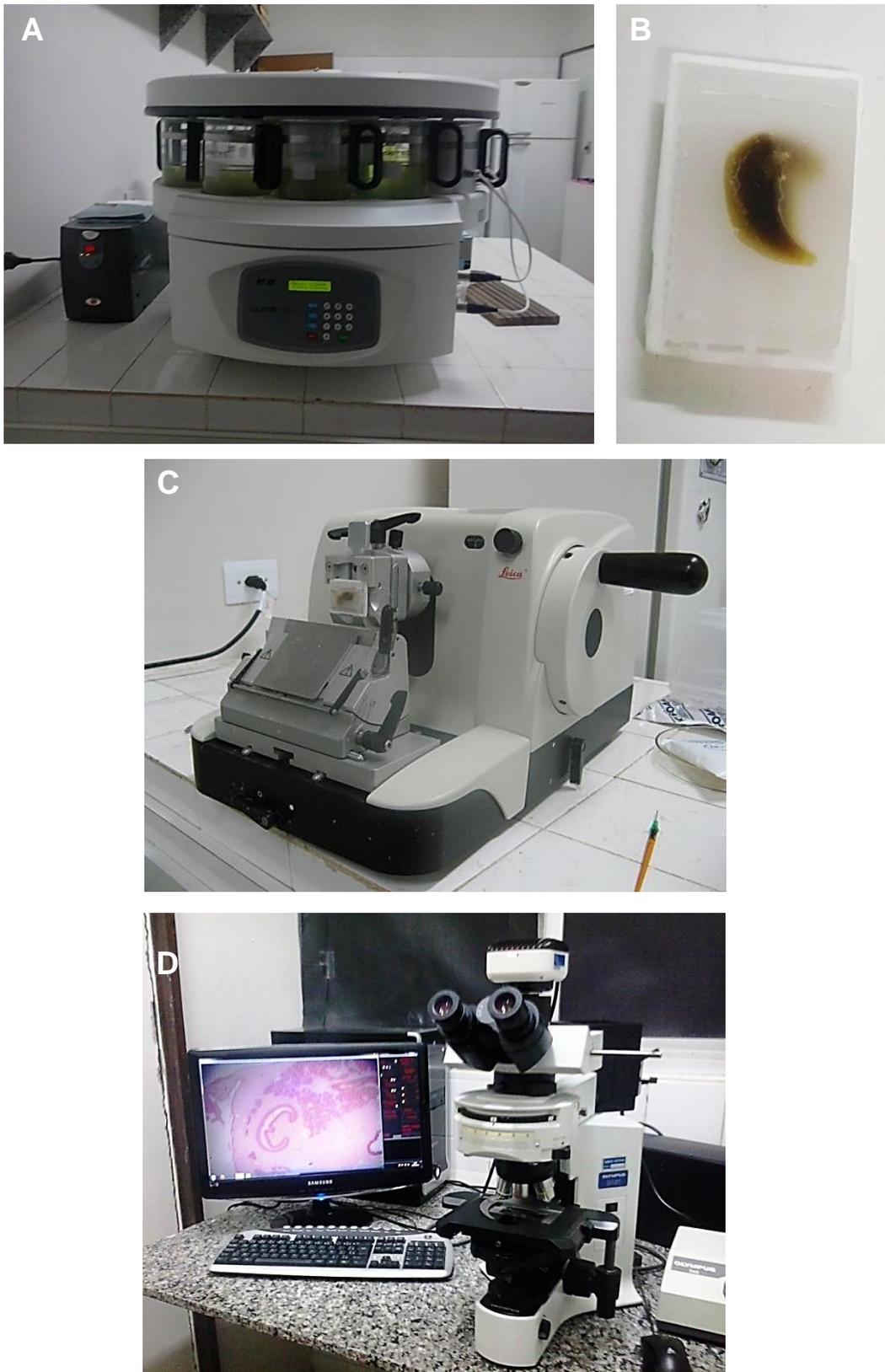
Os cobaias eram eutanasiados por deslocamento cervical seguido da secção dos vasos transversais. Em seguida, era obtida uma porção do pulmão, tanto dos animais não asmáticos (controle) e asmáticos que, após dissecação, era lavado com solução salina (5 mL) e em seguida fixado em formaldeído 10% (v/v) por tempo variável.

As amostras previamente fixadas eram submetidas a um procedimento histológico em um processador de tecidos (Figura 14A) e, em seguida, realizado a inclusão em parafina. Este procedimento incluiu as seguintes etapas: 1) desidratação do tecido em uma série alcoólica crescente (70% por 24 h; 80, 96 e 100% (3 banhos) por 1 h cada; 2) diafanização ou clareamento em que o tecido era banhado em álcool 100% e xilol (1:1) por 1 h, seguidos de dois banhos em xilol puro por 1 h cada; 3) inclusão em parafina, em que o tecido passou por dois banhos de

parafina líquida (aquecida a 50 °C) por 1 h cada. Em seguida, os tecidos eram emblocados em uma nova parafina (Figura 14B).

Os blocos obtidos eram cortados à 5 µm de espessura em secção transversal dos pulmões utilizando um micrótomo rotativo (Figura 14C). Os cortes obtidos eram corados com Hematoxilina de Mayer e Eosina (HOWARD et al. 2004; EVANS et al., 2012). As lâminas obtidas eram analisadas em microscópio óptico com câmera acoplada, onde foram fotografadas (Figura 14D).

**Figura 13** – Fotos do Processador de tecidos (A), pulmão emblocado em parafina (B), micrótomo rotativo (C) e microscópio óptico com câmera acoplada (D).



Fonte: Queiroga, 2013; Martins, 2016.

#### **4.2.1.3 Preparação dos anéis de traqueia isolada de cobaia**

Os cobaias eram eutanasiados como descrito no item anterior. A traqueia era retirada e limpa de todo o tecido conjuntivo e adiposo, em seguida dividido em segmentos, contendo 3-4 anéis de cartilagem cada. Esses segmentos eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável em cubas de vidro (6 mL) contendo solução nutritiva de Krebs normal e sob tensão de 1 g. Os anéis eram mantidos a uma temperatura de 37 °C, aerados com carbogênio, e mantidos em repouso durante no mínimo 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, uma primeira contração era induzida pela adição de  $10^{-6}$  M de CCh à cuba.

A integridade do epitélio da traqueia era verificada pela adição de AA à cuba na concentração de  $10^{-4}$  M (TSCHIRHART et al., 1987) durante a fase tônica da primeira resposta induzida por CCh, onde anéis que apresentaram 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 uma leve fricção da camada epitelial, que se encontra voltada para a luz do órgão, utilizando-se uma haste de aço inoxidável envolta em algodão e embebida com solução de Krebs. A retirada do epitélio era confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de AA à cuba ou quando este relaxamento era inferior a 10%, sendo este anel considerado sem epitélio funcional.

#### **4.2.1.4 Efeito da OVA (reação de Schultz-Dale) sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos**

A obtenção do órgão era executada de acordo com o item 4.2.1.3 Os anéis de traqueia eram mantidos em solução de Krebs por 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos. Após esse período, 10 µg/mL de OVA (CHAND; EYRE, 1978; BASTOS et al., 2009) era adicionada à cuba sobre as preparações e em seguida era observado um possível efeito contrátil induzido pela OVA sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos, sendo os valores de  $E_{max}$  (efeito máximo) obtidos para cada situação.

#### **4.2.1.5 Efeito dos agonistas contráteis CCh e histamina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos**

A obtenção do órgão e a integridade do epitélio eram realizadas de acordo com o item 4.2.1.2. Os segmentos eram mantidos em solução de Krebs por 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos. Após esse período de estabilização, era investigado o efeito contrátil do CCh, um agonista muscarínico (BLACK et al., 1986), e da histamina, um agonista histaminérgico (BRAUNSTEIN et al., 1988), sobre os anéis de traqueia de animais não asmáticos ou asmáticos. Os agonistas eram adicionados a cuba de maneira cumulativa, em preparações distintas, e o efeito contrátil observado a fim de construir uma curva concentrações-resposta para cada situação. Os valores de  $pD_2$  (logaritmo negativo, na base 10, da concentração molar de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo), calculados por regressão não linear, e de  $E_{max}$  eram obtidos para cada agonista contrátil.

#### **4.2.1.6 Efeito dos agonistas relaxantes isoprenalina e aminofilina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos**

A obtenção do órgão e a integridade do epitélio eram realizadas conforme descrito acima. Após o período de estabilização, era investigado o efeito relaxante da isoprenalina, um agonista  $\beta$ -adrenérgico (ITO et al., 1995), e da aminofilina, um inibidor inespecífico das fosfodiesterases (LIU et al., 2003), sobre os anéis de traqueia de animais não asmáticos ou asmáticos. Era induzida uma contração com  $10^{-6}$  M de CCh e após a formação do componente tônico sustentado, os agonistas eram adicionados à cuba de maneira cumulativa, em preparações distintas, e o efeito relaxante observado a fim de construir uma curva concentrações-resposta para cada agonista mencionado. Os valores de  $pD_2$  de cada agonista relaxante eram obtidos por regressão não linear.

### **4.2.2 Triagem farmacológica dos derivados *N*-sulfonilidrazônicos**

#### **4.2.2.1 Efeito dos derivados sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaias não asmáticos**

A obtenção dos órgãos e a integridade do epitélio eram realizadas de acordo com o item 4.2.1.3 Os segmentos eram mantidos em repouso durante 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, investigou-se o efeito relaxante dos derivados LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632 e LASSBio-1850 sobre a traqueia de animais não asmáticos pré-contráida com CCh, onde eram obtidas duas contrações tônicas de magnitudes similares induzidas por  $10^{-6}$  M do agonista supracitado e consideradas como controle e, durante a fase tônica da segunda resposta, os derivados eram adicionados, individualmente, de maneira cumulativa à cuba. Eram realizados experimentos tanto na ausência quanto na presença de epitélio funcional.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo CCh, sendo os valores de  $pD_2$  obtidos por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta de cada derivado.

#### **4.2.2.2 Efeito dos derivados sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaias asmáticos**

A obtenção dos órgãos e a integridade do epitélio eram realizadas conforme descrito acima. Os segmentos eram mantidos em repouso durante 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, investigou-se o efeito relaxante dos compostos LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851 sobre a traqueia dos cobaias asmáticos pré-contráida com CCh, onde eram obtidas duas contrações tônicas de magnitudes similares induzidas por  $10^{-6}$  M do agonista supracitado e consideradas como controle e, durante a fase tônica da segunda resposta, os compostos eram adicionados, individualmente, de maneira cumulativa à cuba. Eram realizados experimentos tanto na ausência quanto na presença de epitélio funcional.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo CCh, sendo os valores de  $pD_2$  obtidos por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta de cada derivado.

#### **4.2.3 Investigação do mecanismo de ação funcional do LASSBio-1847 em cobaias não asmáticos e asmáticos**

#### **4.2.3.1 Participação dos receptores adrenérgicos- $\beta$**

##### **4.2.3.1.1 Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de propranolol**

A traqueia era montada conforme o item 4.2.1.3. Após o período de estabilização,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  ou  $3 \times 10^{-6}$  M de propranolol, um bloqueador adrenérgico- $\beta$  não seletivo (BILOIKOVÁ; BAUER; KOLENA, 1987), era pré-incubado por 20 minutos em preparações distintas e uma resposta contrátil com CCh era induzida. Após a estabilização do componente tônico dessa contração, o LASSBio-1847, era adicionado à cuba em concentrações crescentes de maneira cumulativa e seu efeito relaxante era registrado. O efeito do LASSBio-1847 era avaliado na ausência do propranolol e tomado como controle. Os valores de  $pD_2$  do LASSBio-1847 foram comparados como descrito anteriormente.

##### **4.2.3.1.2 Efeito da isoprenalina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e presença do LASSBio-1847**

A traqueia era montada conforme o item 4.2.1.3. Após o período de estabilização,  $3 \times 10^{-6}$  ou  $10^{-6}$  M do LASSBio-1847 era pré-incubado por 20 minutos em preparações distintas de cobaias não asmáticos e asmáticos, respectivamente, e uma resposta contrátil com CCh era induzida. Após a estabilização do componente tônico dessa contração, a isoprenalina, um agonista  $\beta$ -adrenérgico (ITO et al., 1995), era adicionada à cuba em concentrações crescentes de maneira cumulativa e seu efeito relaxante era registrado. O efeito da isoprenalina era avaliado na ausência do LASSBio-1847 e tomado como controle. Os valores de  $pD_2$  da isoprenalina foram comparados como descrito anteriormente.

#### **4.2.3.2 Investigação da participação da via AC/cAMP/PKA**

##### **4.2.3.2.1 Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1847**

A traqueia era montada conforme o item 4.2.1.3. Após o período de estabilização, o LASSBio-1847 era pré-incubado por 20 minutos na concentração que mais se aproximasse ao seu valor de  $pD_2$  e uma resposta contrátil com CCh era induzida. Após a estabilização do componente tônico dessa contração, a forskolina, um ativador de ciclase de adenilil (BROOKER; PEDONE; BAROVSKY, 1983), era adicionado à cuba em concentrações crescentes de maneira cumulativa e seu efeito relaxante era registrado. O efeito da forskolina era avaliado na ausência do LASSBio-1847 e tomado como controle. Os valores de  $pD_2$  da forskolina foram calculados e comparados como descrito anteriormente.

#### **4.2.3.2.2 Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do LASSBio-1847**

A traqueia era montada conforme o item 4.2.1.3, em seguida as preparações eram expostas por 20 minutos ao LASSBio-1847 na concentração que mais se aproximasse ao seu valor de  $pD_2$  e uma segunda resposta contrátil ao CCh era obtida. Após a estabilização dessa segunda contração, durante a sua fase tônica e sustentada, a aminofilina, um inibidor não seletivo de PDEs (LIU et al., 2003), era adicionada à cuba de maneira cumulativa e seus efeitos relaxantes registrados. O efeito da aminofilina foi avaliado em experimentos concomitantes na ausência do LASSBio-1847. Foram comparados os valores de  $pD_2$  da aminofilina na ausência e presença do derivado.

#### **4.2.3.2.3 Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do H-89**

A traqueia era montada conforme o item 4.2.1.3 e após o período de estabilização, era incubado por 30 minutos  $10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$  e  $10^{-6}$  M de H-89, inibidor seletivo de PKA (LOCHNER; MOOLMAN, 2006; IRIÉ-N'GUESSAN et al., 2011) e uma resposta contrátil com CCh era induzida. Após a estabilização do componente tônico dessa contração, o LASSBio-1847 era adicionado à cuba em concentrações crescentes de maneira cumulativa e seu efeito relaxante era registrado. O efeito do LASSBio-1847 era avaliado na ausência do H-89 e tomado como controle. Os valores de  $pD_2$  do LASSBio-1847 foram comparados como descrito anteriormente.

#### **4.2.3.2.4 Quantificação dos níveis teciduais de cAMP**

A traqueia era montada conforme o item 4.2.1.3 e estabilizada por 60 minutos. Em seguida, era induzida uma resposta contrátil com CCh e após a formação do componente tônico dessa contração, era adicionado  $10^{-4}$  M de rolipram, um inibidor seletivo das PDE4 (DAL PIAZ; GIOVANNONI, 2000), ou  $10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M de LASSBio-1847, em preparações distintas e observado o efeito relaxante de cada situação. Ao obter-se o efeito máximo de cada substância, os anéis de traqueia eram coletados e imediatamente armazenados em nitrogênio líquido.

Posteriormente, uma solução a 5% de ácido tricloroacético (TCA) era adicionada ao tecido congelado, na proporção de um mL da solução para cada grama do tecido, e homogeneizado em gelo. O homogenato obtido foi centrifugado por 10 minutos a 1500 g e o sobrenadante cuidadosamente transferido para um tubo limpo, realizando-se em seguida a remoção do TCA com uma solução de água saturada com éter, numa proporção de cinco volumes dessa mistura para cada volume do sobrenadante obtido na centrifugação, sendo esse processo realizado mais duas vezes. Por fim, o éter residual era removido da amostra por aquecimento a 70 °C em banho-maria por 5 minutos.

A quantificação do conteúdo de cAMP nas amostras foi realizado utilizando-se uma kit de ELISA para quantificação de cAMP (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA). De acordo com o procedimento descrito no kit, a placa de ELISA com 96 poços foi preparada e a curva de dosagem padrão foi adicionada a placa (50  $\mu$ L/poço), em duplicata, em seguida adicionou-se as amostras provenientes dos anéis tratados com rolipram ou LASSBio-1847 nos poços previamente determinados (50  $\mu$ L/poço).

Por fim, a placa foi coberta com papel filme e incubada por 18 horas a 4 °C para o desenvolvimento da reação com os reagentes previamente adicionados de acordo com o procedimento padrão do kit. Após esse período, os reagentes foram removidos, os poços lavados e realizado a leitura da placa em um leitor de placas de ELISA no comprimento de onda entre 405 e 420 nm. Os dados de densidade ótica foram transformados para concentração de acordo com a curva de soluções padrão descritas no procedimento contido no guia do fabricante.

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste *t* (não-pareado) ou análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni e as diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de  $p < 0,05$ .

Como parâmetro de eficácia foi utilizado o efeito máximo ( $E_{\max}$ ) e como parâmetro de potência foi utilizado o  $pD_2$ . Os valores de  $pD_2$  (NEUBIG et al., 2003) foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados.

Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

# ***5 Resultados***

---

---

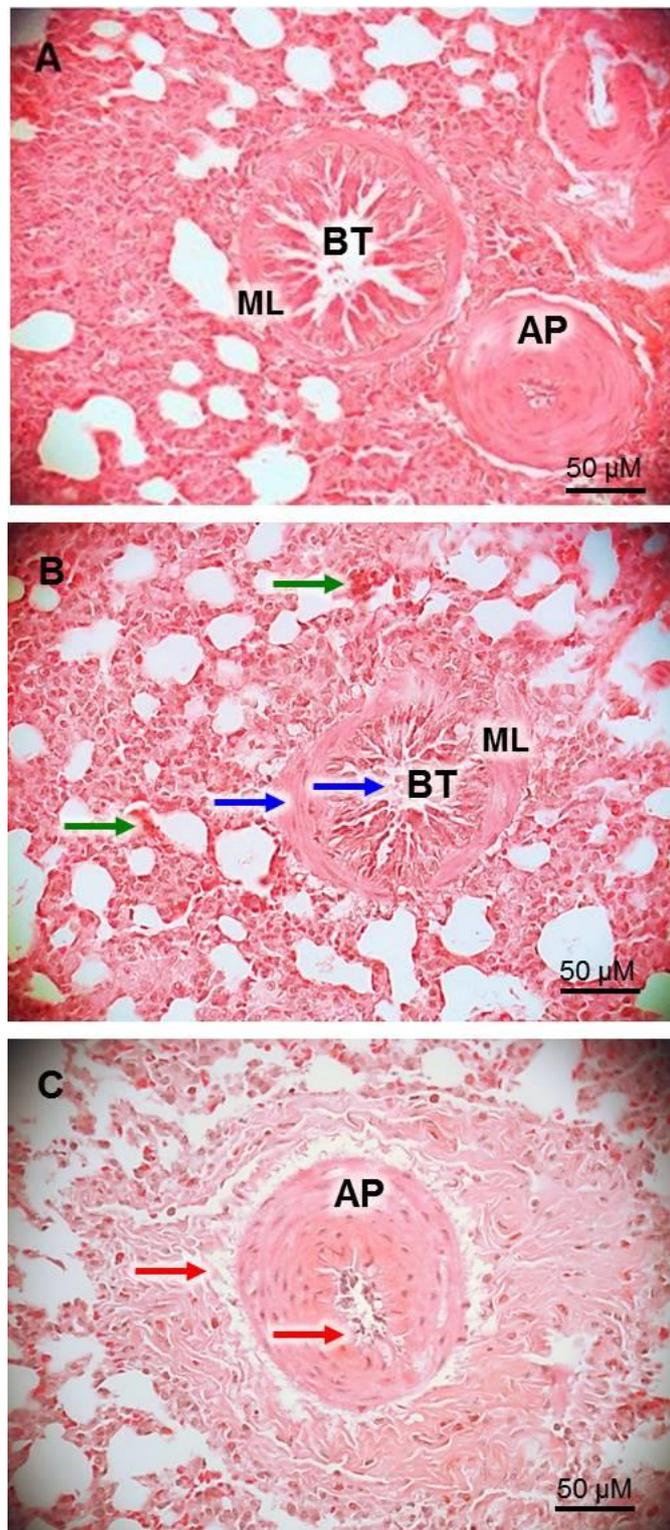


## **5.1 Implantação e padronização do modelo de asma em cobaia**

### **5.1.1 Avaliação histológica dos pulmões dos cobaias não asmáticos e asmáticos**

A partir do pulmão de cobaias não asmáticos foram obtidos os cortes histológicos controles (Figura 15A), onde é possível evidenciar um bronquíolo terminal (BT), o qual é constituído por uma camada delgada de músculo liso (ML), além de uma arteríola pulmonar (AP). A amostra histológica obtida dos pulmões de cobaias submetidos ao processo de indução de asma mostrou que as vias aéreas desse animais apresentavam uma hipertrofia da camada muscular lisa no bronquíolo terminal e redução no diâmetro luminal dessas vias (seta azul), um infiltrado de células inflamatórias (seta verde), além de alterações vasculares como túnica adventícia irregular, infiltrado de células e uma possível vasodilatação (setas vermelhas) (Figura 15B e C).

**Figura 14** – Imagens histológicas obtidas a partir de pulmões de cobaias não asmáticas (**A**) e asmáticas (**B e C**), destacando-se infiltrado de células inflamatórias (setas verdes), alterações nas vias aéreas (setas azuis) e vaso sanguíneo (setas vermelhas) (H.E., 40x).



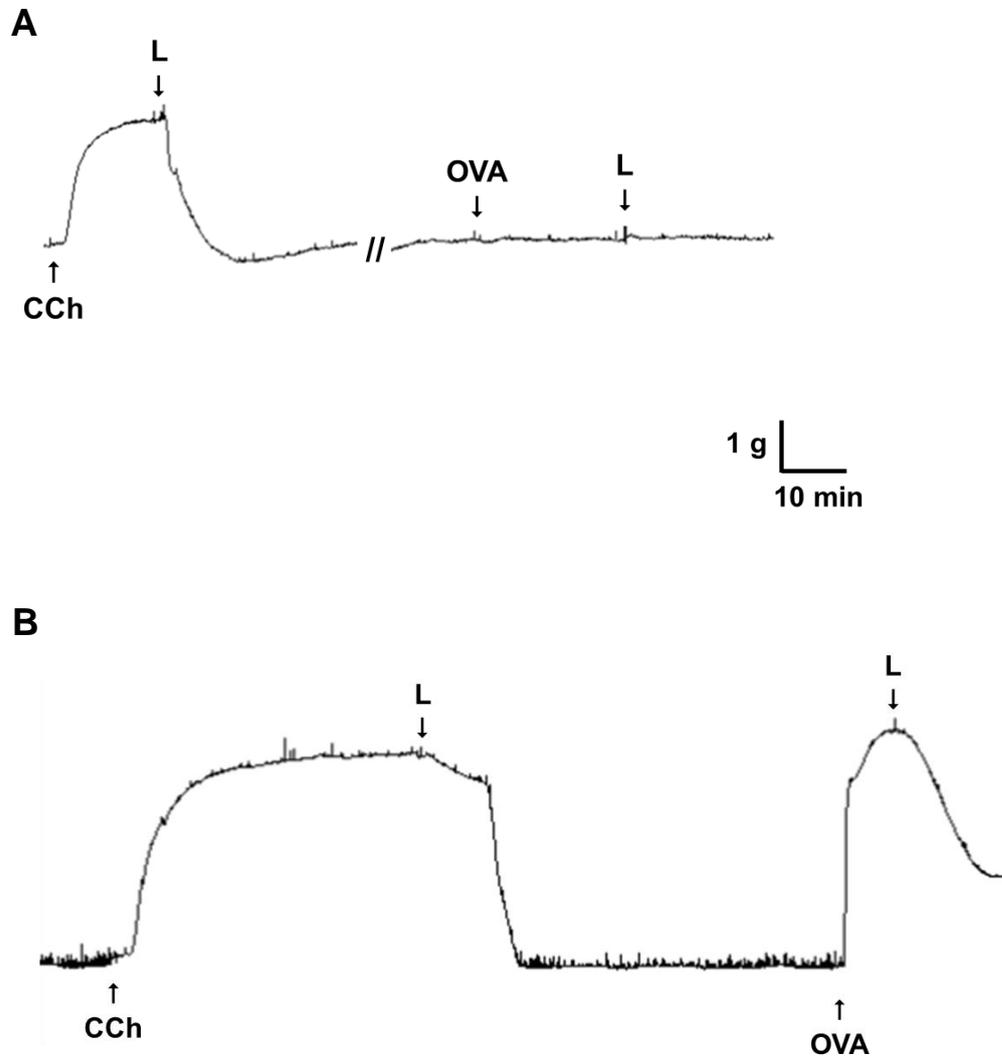
BT = Bronquíolo terminal; ML = músculo liso; AP: arteríola pulmonar

Fonte: Martins, 2016.

### **5.1.2 Efeito da OVA (reação de Schultz-Dale) sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos**

A adição de  $10^{-6}$  M de CCh nos anéis de traqueia isolados dos cobaias não asmáticos induziu uma contração sustentada com  $E_{\max} = 2,65 \pm 0,29$  g, valor similar ao observado nas traqueias dos cobaias asmáticos, onde o  $E_{\max}$  foi de  $3,26 \pm 0,34$  g, não havendo diferença estatística entre esses valores (Figura 15A e Gráfico 1A). Por sua vez, A adição de 10  $\mu\text{g/mL}$  de OVA às preparações de animais não asmáticos não induziu qualquer alteração no tônus basal do órgão, diferentemente do efeito contrátil observado nos animais previamente sensibilizados, onde se observou uma contração significativa com  $E_{\max}$  de  $2,64 \pm 0,19$  g (Figura 15B e Gráfico 1B).

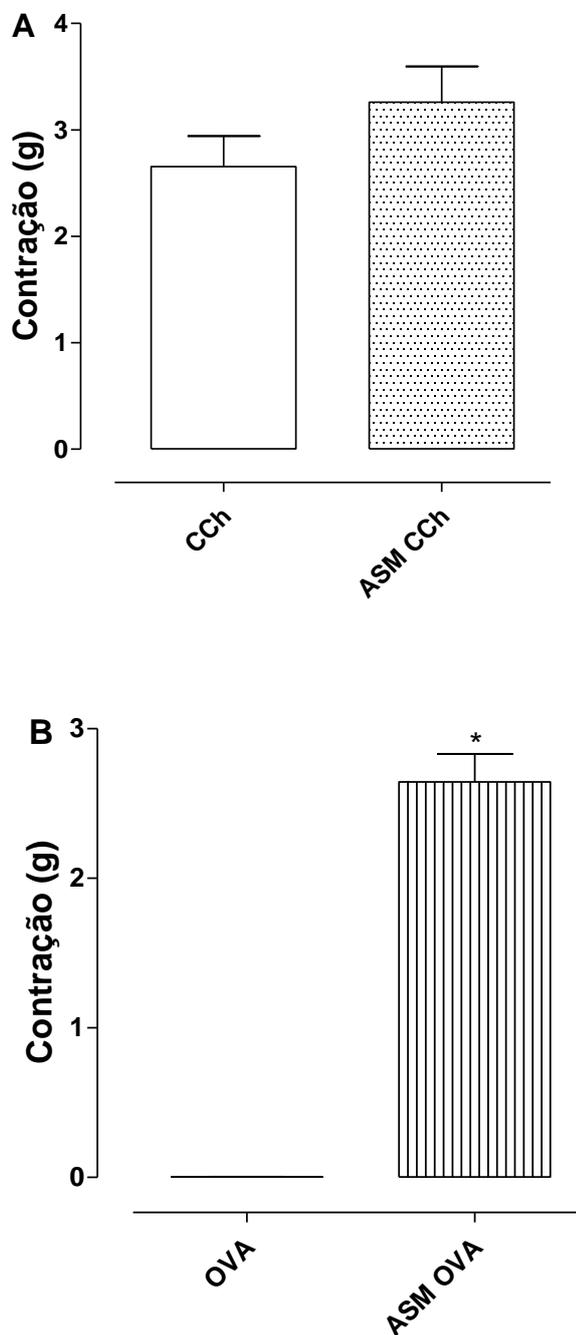
**Figura 15** – Registros representativos do efeito de  $10^{-6}$  M de CCh e de 10  $\mu\text{g/mL}$  de OVA em anéis de traqueia de cobaia não asmáticos (**A**) e asmáticos (**B**).



CCh = carbacol; OVA = ovalbumina; L = lavagem.

Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 1** – Efeito de  $10^{-6}$  M de CCh (**A**) e de 10  $\mu\text{g/mL}$  de OVA (**B**) sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos ( $n = 5$ ).



Teste  $T$ :  $*p < 0,05$ .

CCh = carbacol no animal não asmático; ASM CCh = carbacol no animal asmático;

OVA = ovalbumina no animal não asmático; ASM OVA = ovalbumina no animal asmático.

Fonte: Martins, 2016.

### **5.1.3 Efeito do agonista contrátil CCh sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos**

A adição cumulativa do CCh ( $10^{-9}$  –  $3 \times 10^{-5}$  M) induziu uma contração dependente de concentração na traqueia de ambos os grupos de animais.

Em animais não asmáticos, o CCh induziu uma contração de maneira equipotente tanto em traqueia com ( $pD_2 = 6,68 \pm 0,10$ ) e quanto sem ( $pD_2 = 6,81 \pm 0,11$ ) epitélio funcional (Figura 16A e B, Gráfico 2A). Por sua vez, nos cobaias asmáticos, o CCh apresentou valores de  $pD_2$  de  $6,50 \pm 0,08$  e de  $6,47 \pm 0,18$  na presença e na ausência do epitélio, respectivamente (Figura 16 C e D, Gráfico 2B).

Quando o parâmetro analisado foi a eficácia, na presença de epitélio obteve-se um  $E_{max}$  de 100% e de  $104,1 \pm 8,7\%$  para os animais não asmáticos e asmáticos, respectivamente. Por sua vez, onde os valores de  $E_{max}$  para o CCh foram 100% e  $112,5 \pm 8,9\%$  para os animais não asmáticos e asmáticos, respectivamente (Gráfico 3).

Ao analisar estatisticamente os parâmetros de potência e eficácia entre os animais não asmáticos e asmáticos, na presença ou na ausência de epitélio funcional, constatou-se que não houve nenhuma diferença significativa em nenhuma das comparações possíveis.

**Figura 16** – Registros representativos da adição cumulativa de CCh sobre a traqueia de cobaias não asmáticas (**A** e **B**) e asmáticas (**C** e **D**) na presença e ausência de epitélio funcional, respectivamente.

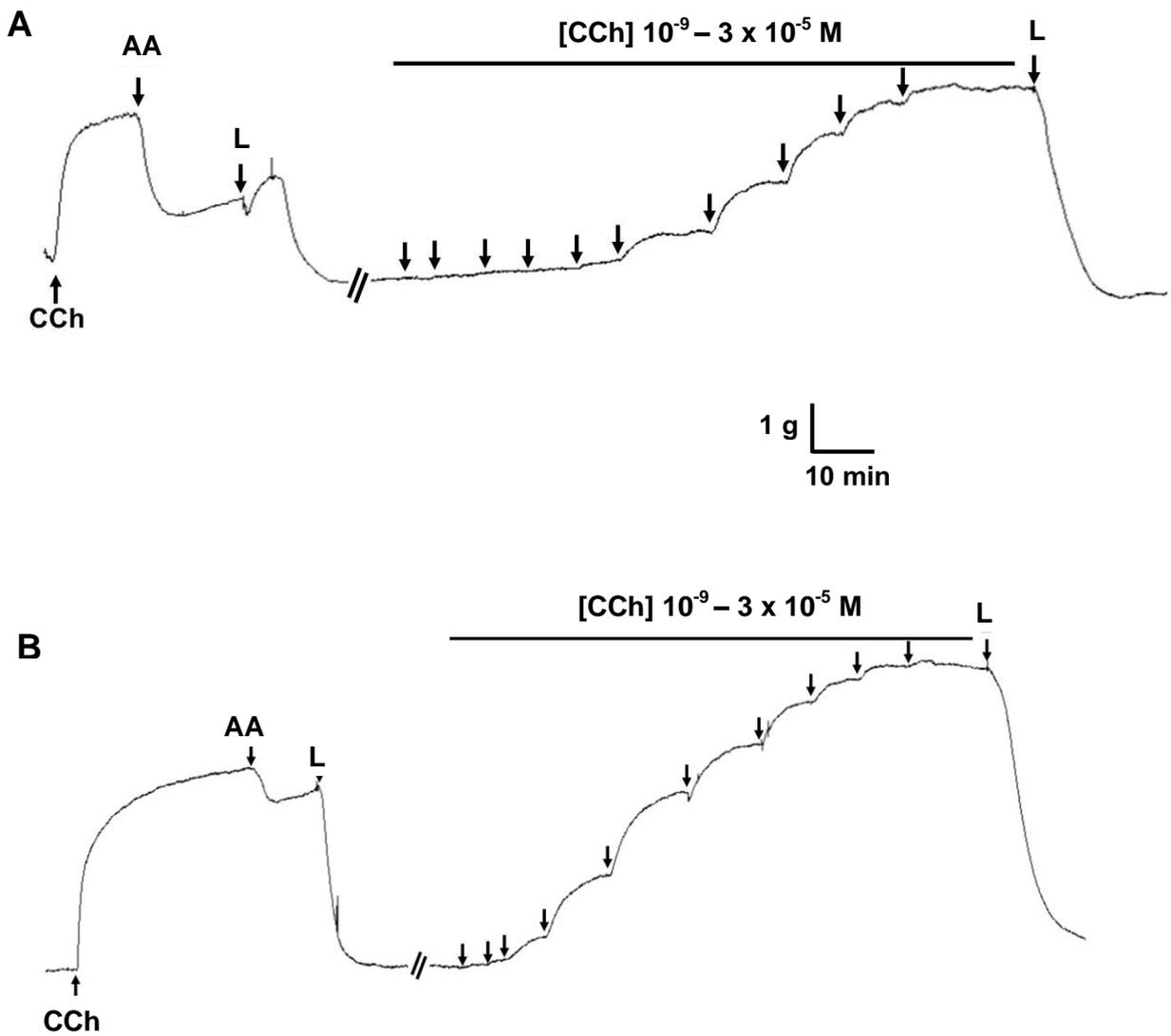
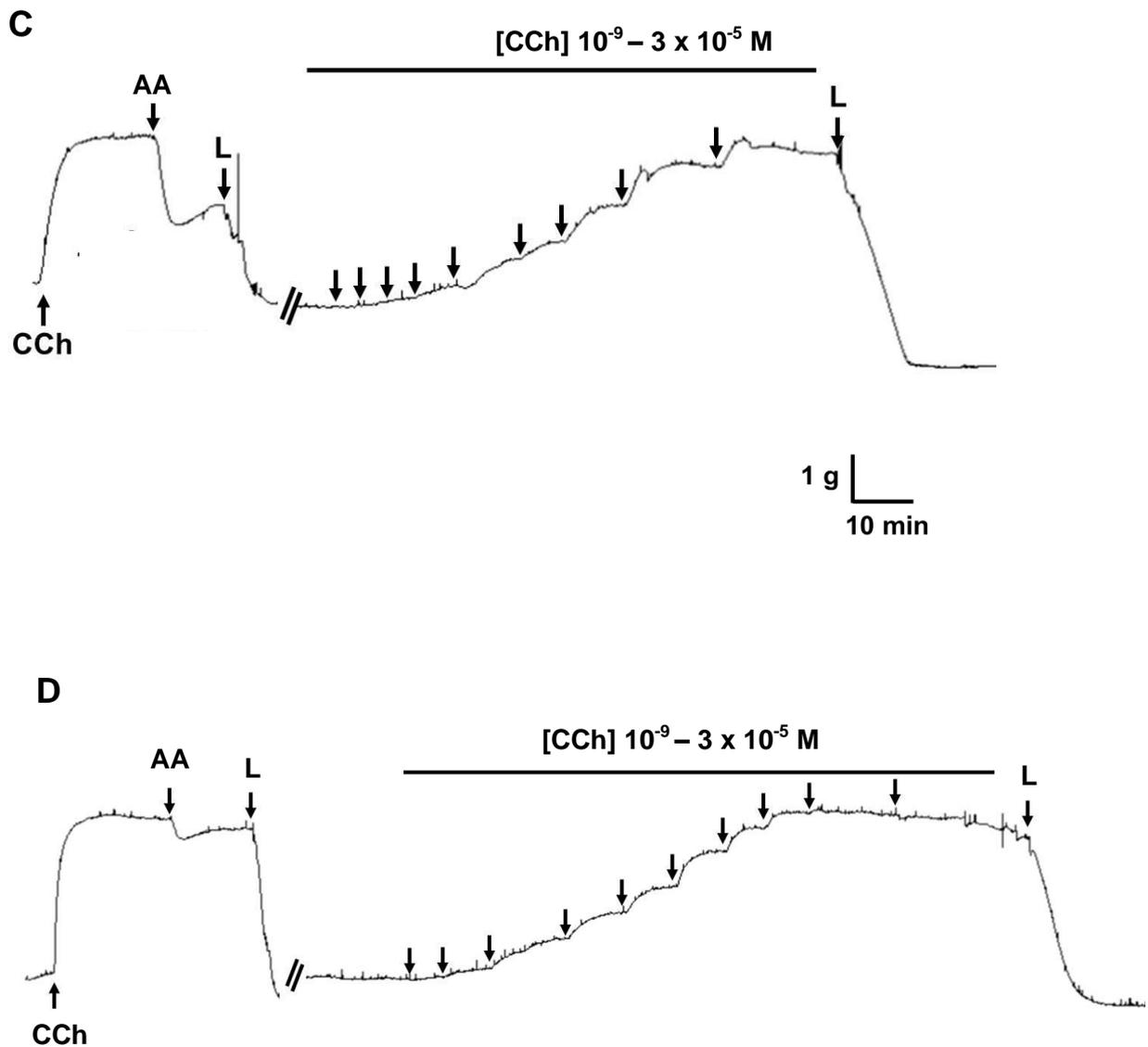
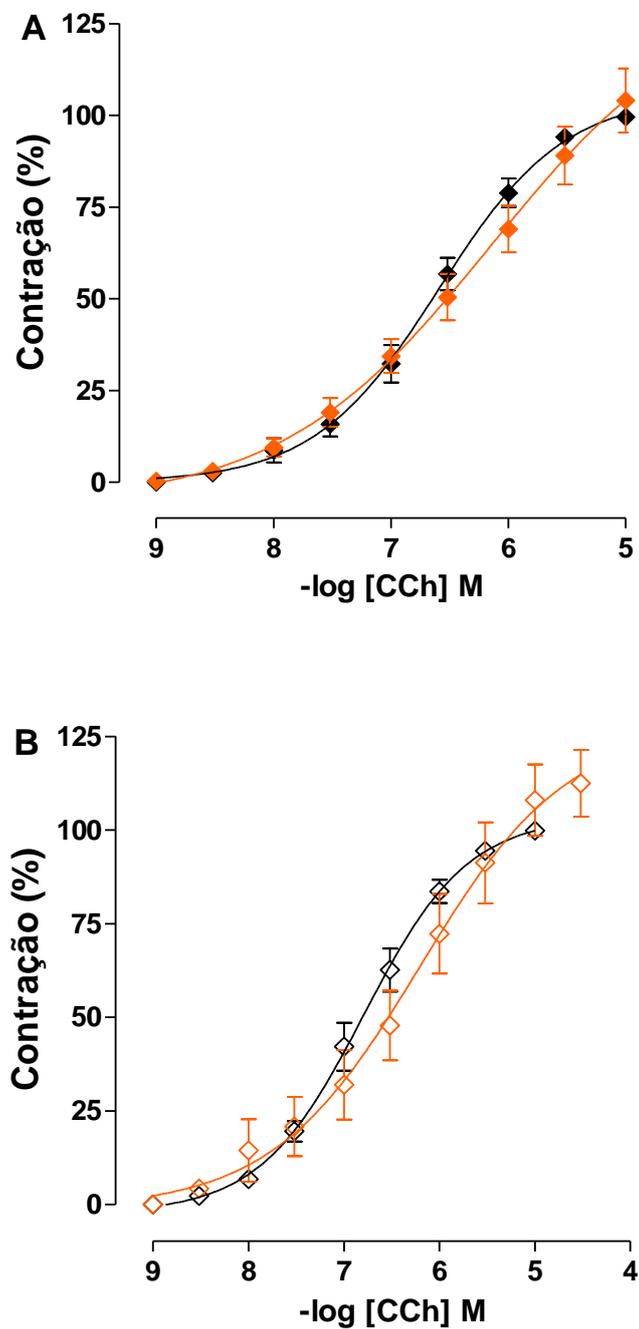


Figura 16 – Continuação



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa de CCh nas concentrações de  $10^{-8}$ ;  $3 \times 10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $3 \times 10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $3 \times 10^{-6}$ ;  $10^{-5}$  e  $3 \times 10^{-5}$  (A, B, C e D). CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

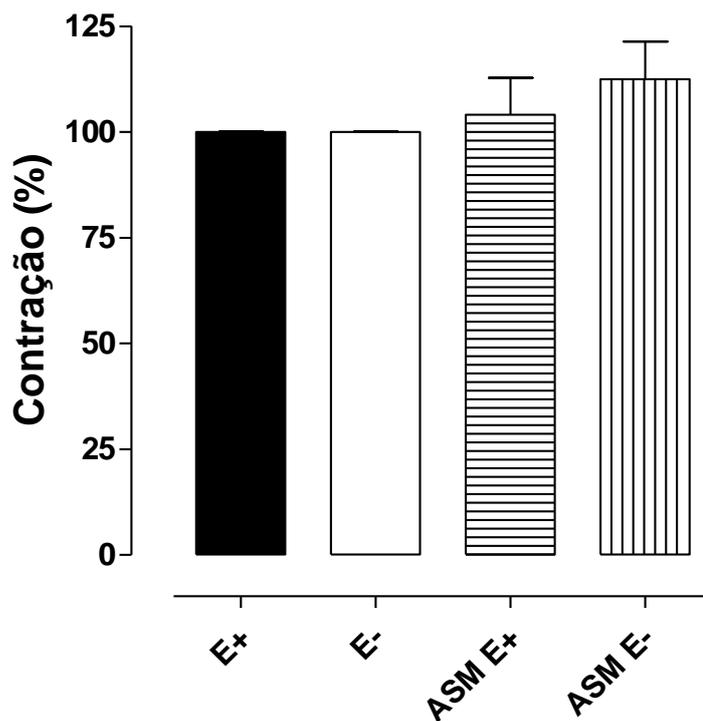
**Gráfico 2** – Efeito contrátil da adição cumulativa de CCh sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (◆, ◇) e asmáticos (♦, ◇) na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 3** – Efeito contrátil máximo induzido pela adição de CCh sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos na presença e na ausência de epitélio funcional (n = 5).



E+ = presença de epitélio no animal não asmático; E- = ausência de epitélio no animal não asmático; ASM E+ = presença de epitélio no animal asmático; ASM E- = ausência de epitélio no animal asmático.

Fonte: Martins, 2016.

#### **5.1.4 Efeito do agonista contrátil histamina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos**

A adição cumulativa da histamina ( $10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M) induziu uma contração dependente de concentração em ambos os grupos de animais.

Em animais não asmáticos, a histamina induziu uma contração de maneira equipotente em traqueia com ( $pD_2 = 5,22 \pm 0,06$ ) e sem ( $pD_2 = 5,36 \pm 0,11$ ) epitélio funcional (Figura 17A e B, Gráfico 4). Nos animais asmáticos, a histamina também produziu uma contração equipotente na traqueia com ( $pD_2 = 5,19 \pm 0,08$ ) e sem ( $pD_2 = 5,54 \pm 0,18$ ) epitélio funcional (Figuras 17C e D, Gráfico 4). Não foi observada diferença significativa entre os valores de  $pD_2$  quando se analisou os dados obtidos tanto quando se levou em consideração o tratamento asmático como quando se analisou a presença ou ausência do epitélio funcional.

Quanto à eficácia da histamina, pode-se verificar que a mesma foi significativamente maior nos cobaias asmáticos em detrimento aos não asmáticos. Nos primeiros, os valores de  $E_{max}$  foram de  $195,8 \pm 31,6\%$  e de  $144,1 \pm 12,6\%$  e comparados aos não asmáticos de 100% e 100%, na presença e na ausência do epitélio, respectivamente (Gráfico 5).

**Figura 17** – Registros representativos da adição cumulativa de histamina sobre a traqueia de cobaias não asmáticas (**A e B**) e asmáticas (**C e D**) na presença e ausência de epitélio funcional.

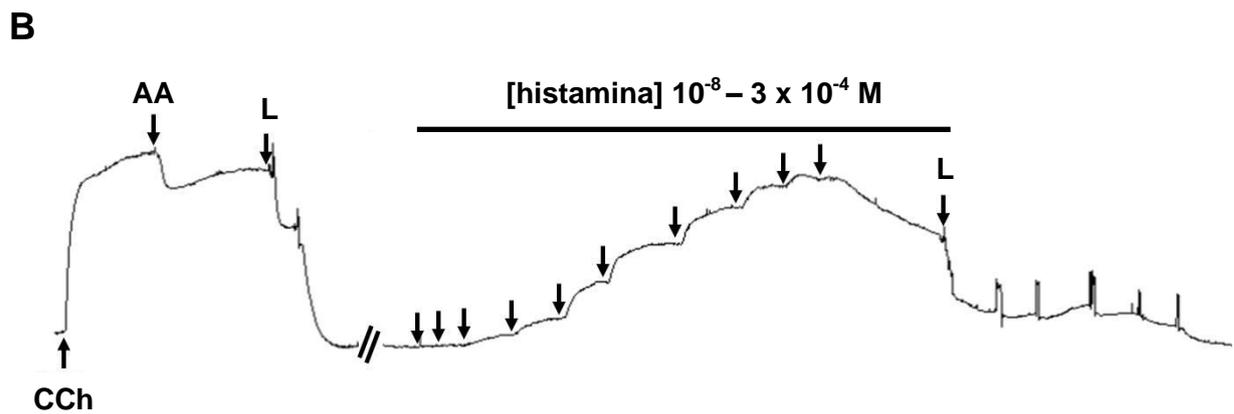
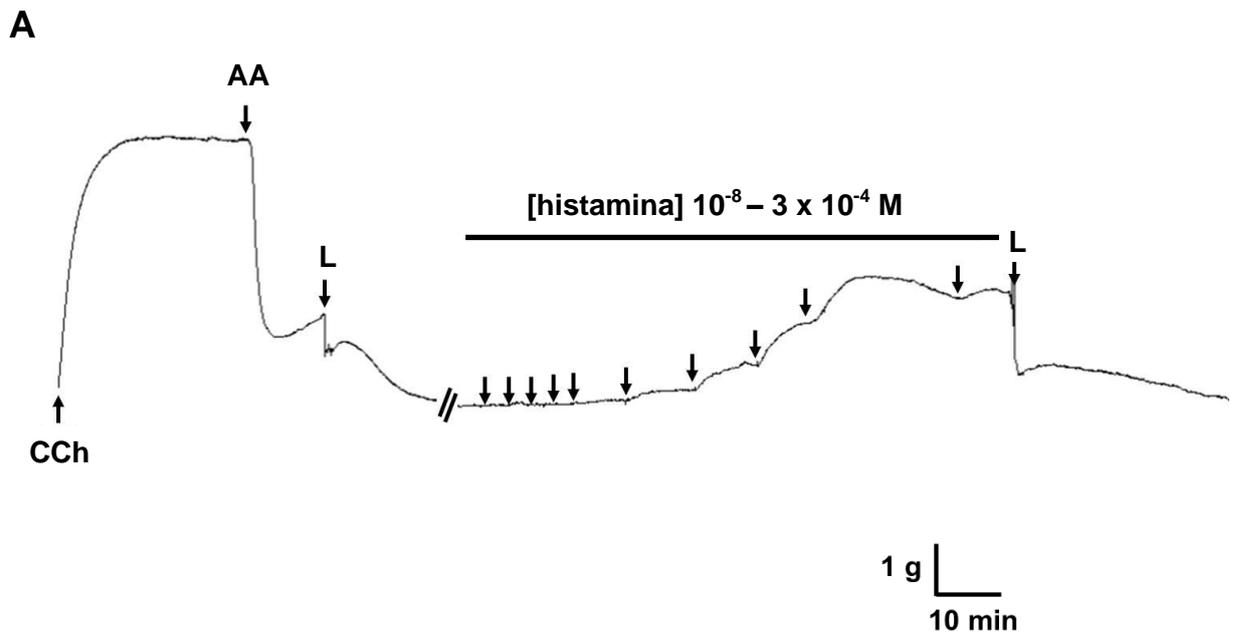
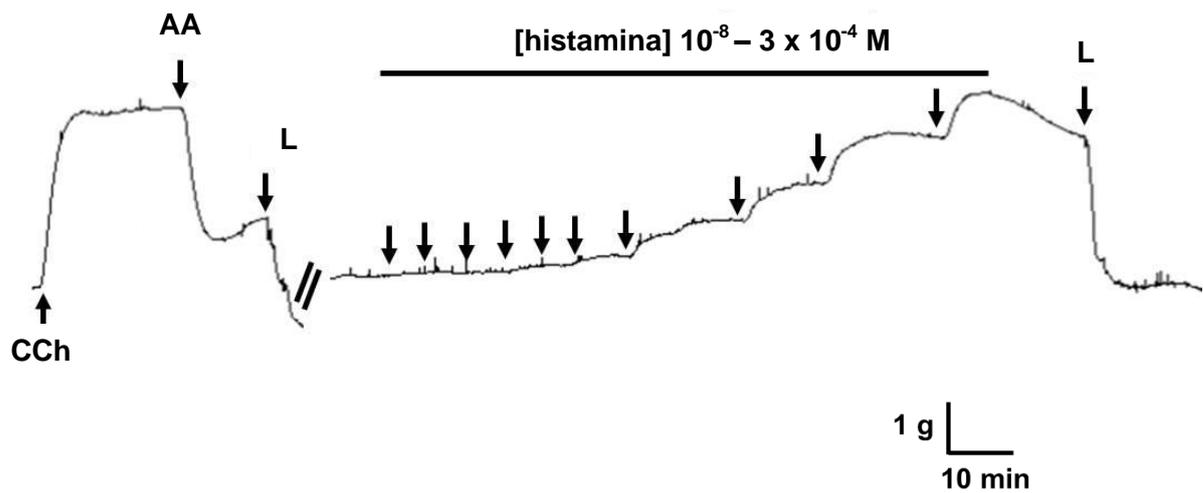
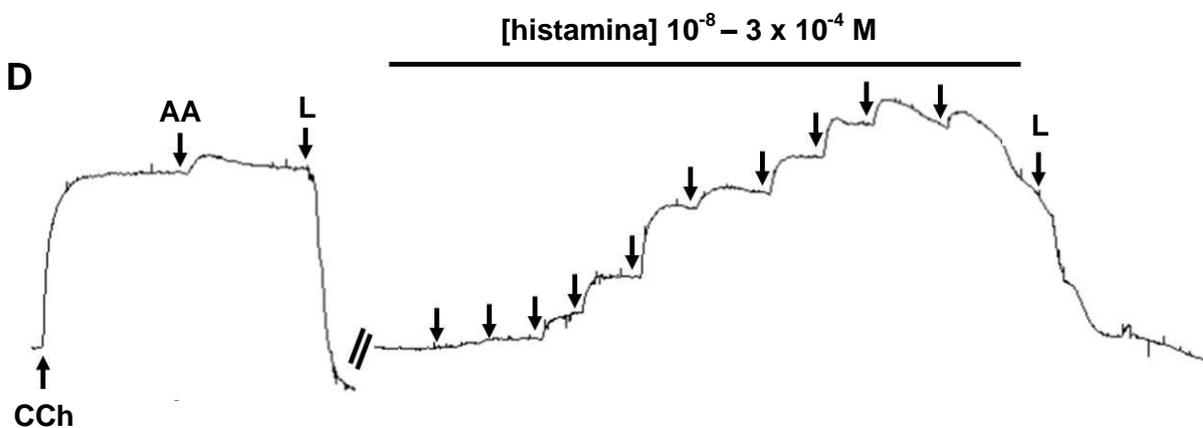


Figura 17 – Continuação

C

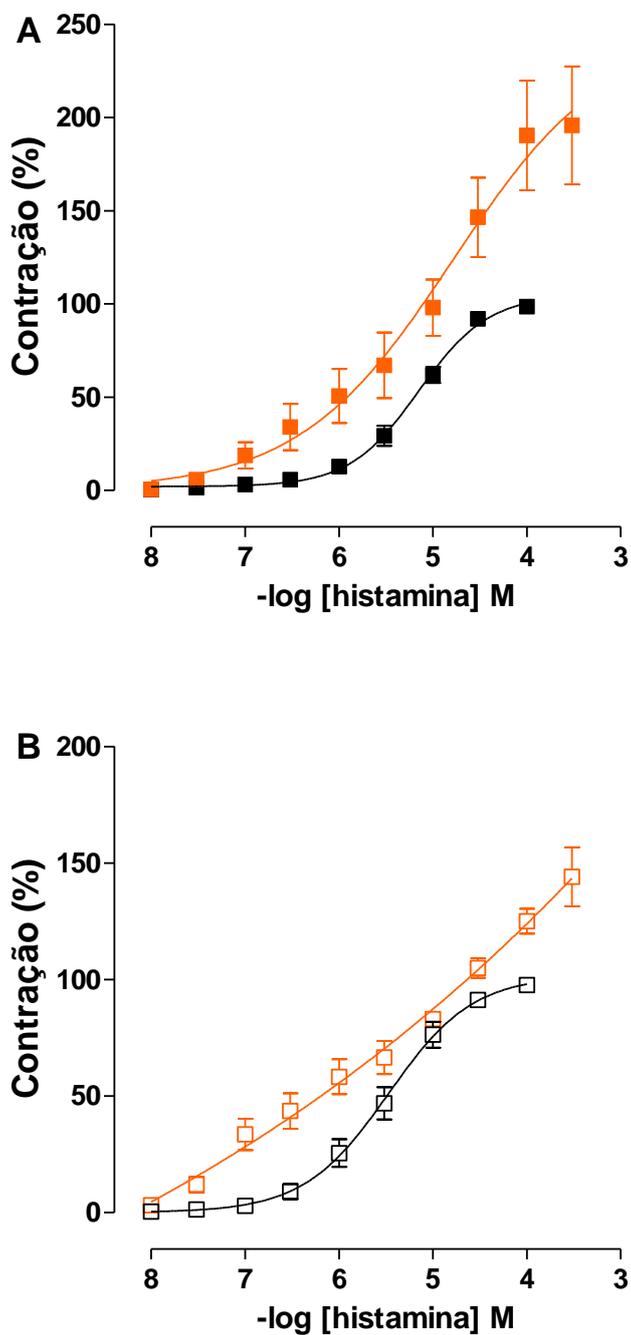


D



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa da histamina nas concentrações de  $10^{-8}$ ;  $3 \times 10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $3 \times 10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $3 \times 10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $3 \times 10^{-5}$ ;  $10^{-4}$  e  $3 \times 10^{-4}$  M (A, B, C e D). CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

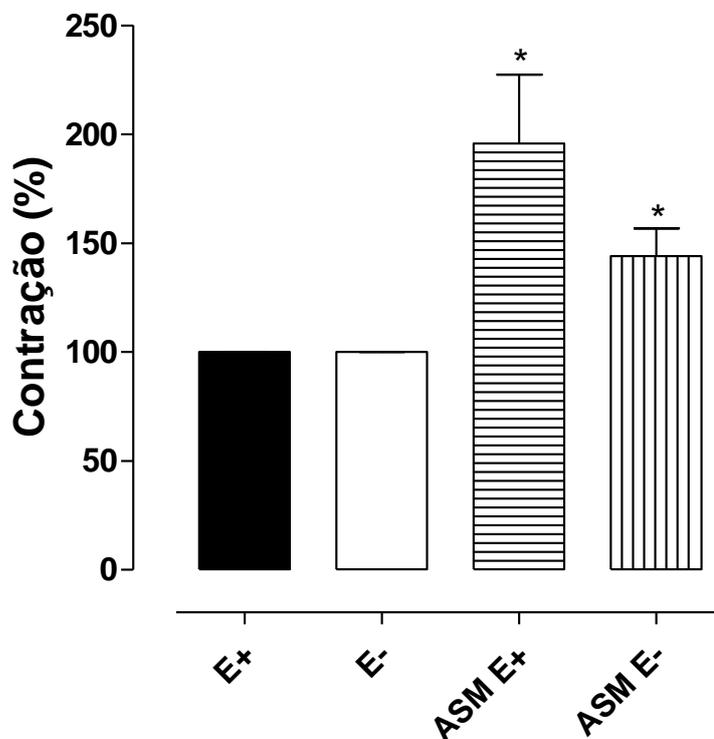
**Gráfico 4** – Efeito contrátil da adição cumulativa de histamina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos (■, □) e asmáticos (■, □) na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 5** – Efeito contrátil máximo induzido pela adição de histamina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos na presença e na ausência de epitélio funcional (n = 5).



Teste *T*: \* $p < 0,05$ ;

E+ = presença de epitélio no animal não asmático; E- = ausência de epitélio no animal não asmático; ASM E+ = presença de epitélio no animal asmático; ASM E- = ausência de epitélio no animal asmático.

Fonte: Martins, 2016.

### **5.1.5 Efeito do agonista relaxante isoprenalina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos**

A isoprenalina ( $10^{-10}$  –  $3 \times 10^{-8}$  M) relaxou a traqueia de maneira concentração-resposta tanto nos animais não asmáticos como nos asmáticos.

Nos animais não asmáticos, a potência relaxante da isoprenalina pode ser analisada pelos valores de  $pD_2$  de  $8,23 \pm 0,08$  e de  $8,35 \pm 0,05$ , na presença e na ausência do epitélio funcional, respectivamente (Figura 18A e B, Gráfico 6). No animal asmático, os valores de  $pD_2$  da isoprenalina foram  $8,27 \pm 0,11$  e  $8,31 \pm 0,08$  na presença e na ausência do epitélio, respectivamente (Figura 18C e D, Gráfico 6). Não foi observada diferença significativa entre os valores de  $pD_2$  quando se analisou os dados obtidos tanto quando se levou em consideração o tratamento asmático como quando se analisou a presença ou ausência do epitélio funcional.

Quanto à eficácia, obteve-se um  $E_{max}$  de 100% para a isoprenalina tanto para os cobaias não asmáticos como para os asmáticos, na presença e ausência de epitélio funcional.

**Figura 18** – Registros representativos do efeito relaxante de isoprenalina sobre a traqueia de cobaias não asmáticas (**A** e **B**) e asmáticas (**C** e **D**) pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh na presença e ausência de epitélio funcional, respectivamente.

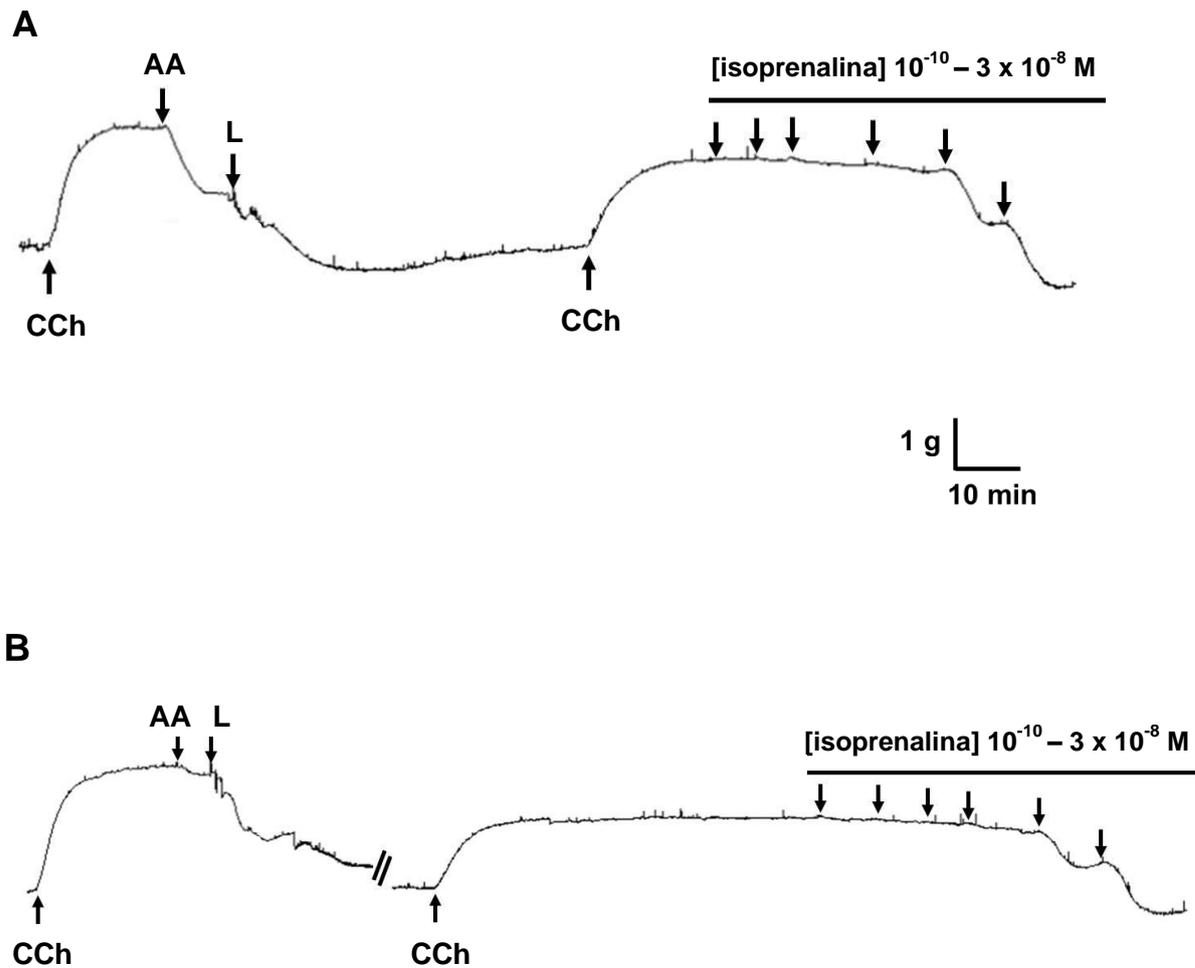
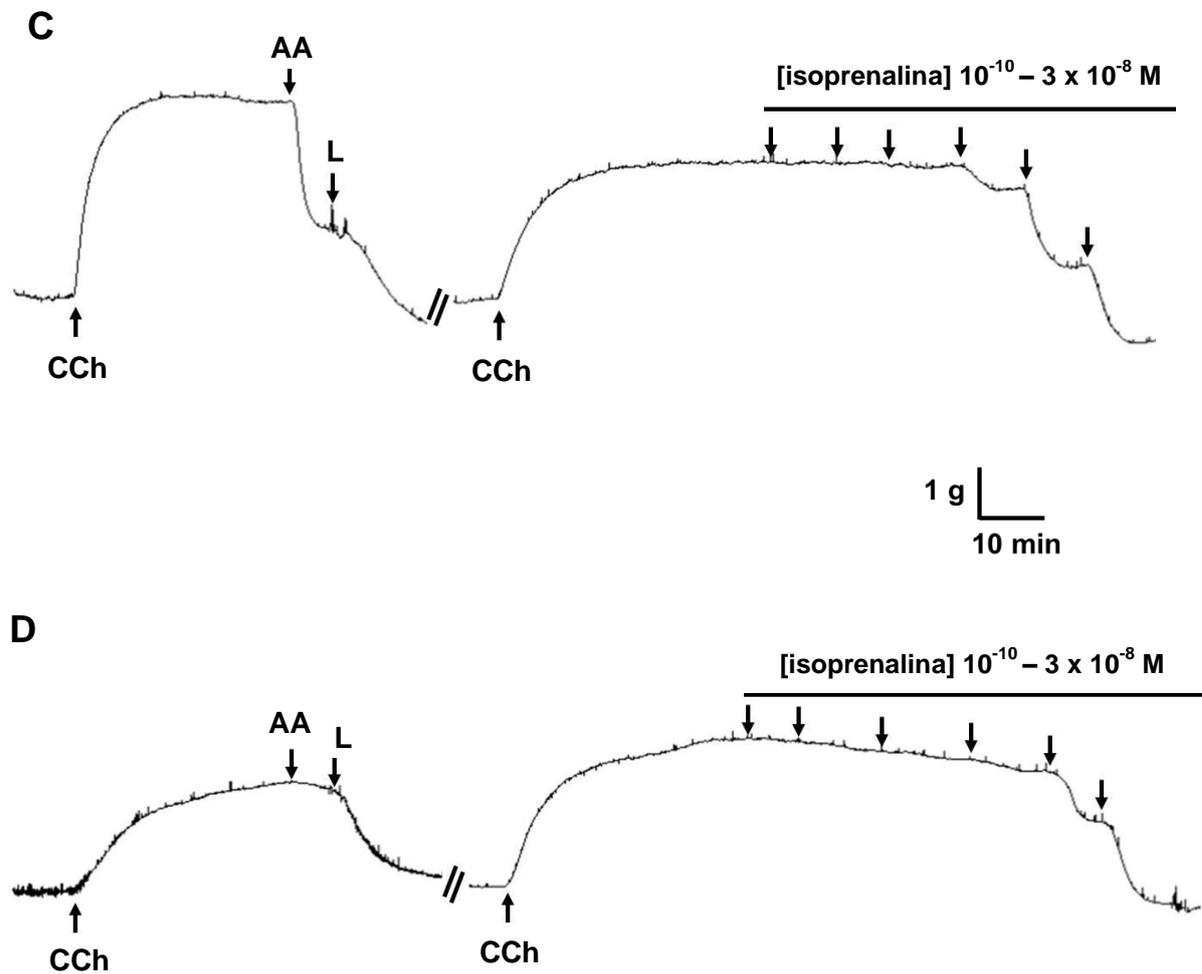
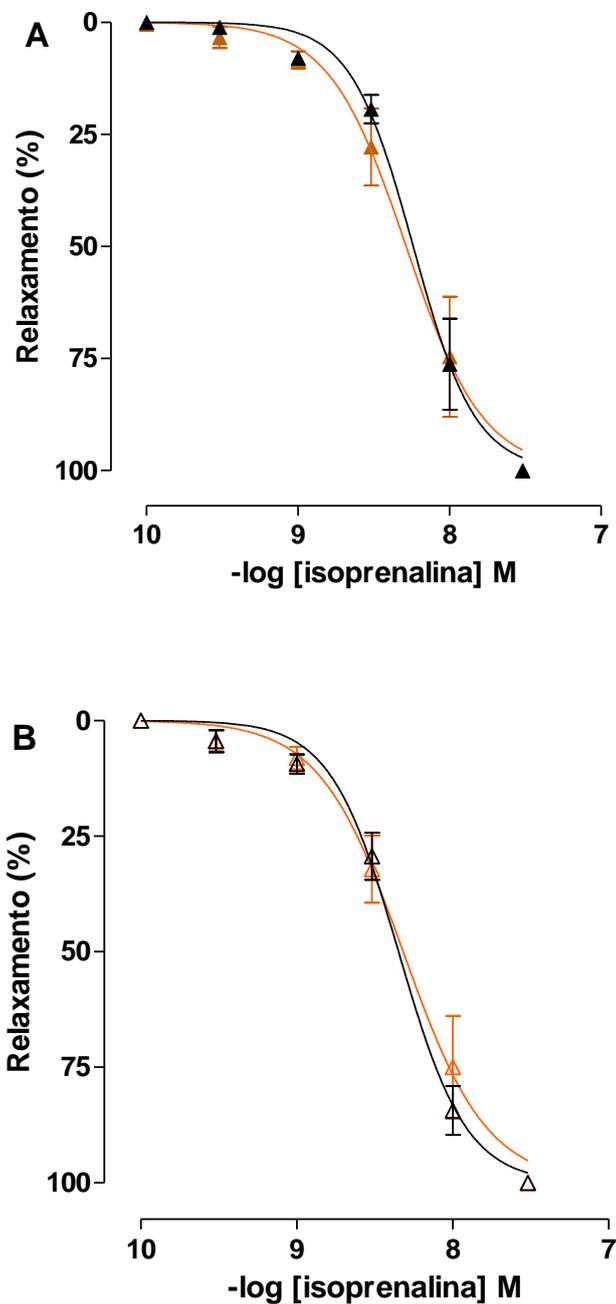


Figura 18 – Continuação



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa da isoprenalina nas concentrações de 10<sup>-10</sup>; 3 x 10<sup>-10</sup>; 10<sup>-9</sup>; 3 x 10<sup>-9</sup>; 10<sup>-8</sup> e 3 x 10<sup>-8</sup> M (A, B, C e D). CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

**Gráfico 6** – Efeito relaxante da isoprenalina sobre a traqueia de cobaias não asmáticas ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) e asmáticas ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) pré-contráida com  $10^{-6}$  M de CCh 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 = 5.

Fonte: Martins, 2016.

### **5.1.6 Efeito do agonista relaxante aminofilina sobre a traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos**

A adição cumulativa da aminofilina ( $10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M) relaxou a traqueia de maneira concentração-resposta tanto nos animais não asmáticos como nos asmáticos.

Nos animais não asmáticos, a potência relaxante da aminofilina pode ser analisada pelos valores de  $pD_2$  que foram de  $4,45 \pm 0,07$  e de  $4,19 \pm 0,07$ , na presença e na ausência do epitélio, respectivamente (Figura 19A e B, Gráfico 7A), havendo uma maior potência relaxante na presença do epitélio funcional. Nos animais asmáticos, os valores de  $pD_2$  foram  $4,40 \pm 0,05$  e de  $4,49 \pm 0,03$ , na presença e na ausência do epitélio, respectivamente (Figura 19C e D, Gráfico 7B), não havendo diferença significativa entre essas potências. Em todas as situações a eficácia máxima foi obtida (100%).

**Figura 19** – Registros representativos do efeito relaxante de aminofilina sobre a traqueia de cobaias não asmáticas (**A** e **B**) e asmáticas (**C** e **D**) pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh na presença e ausência de epitélio funcional, respectivamente.

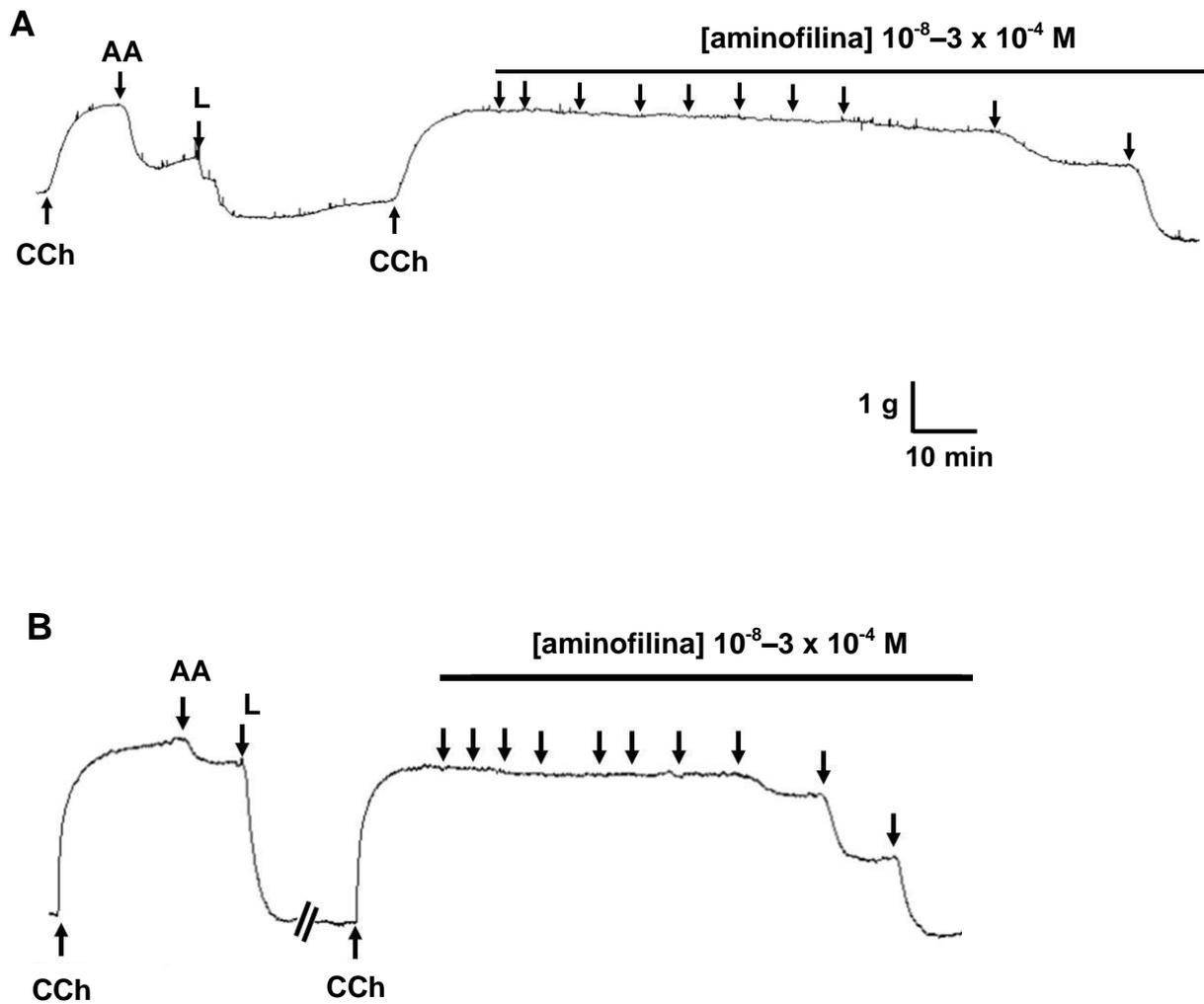
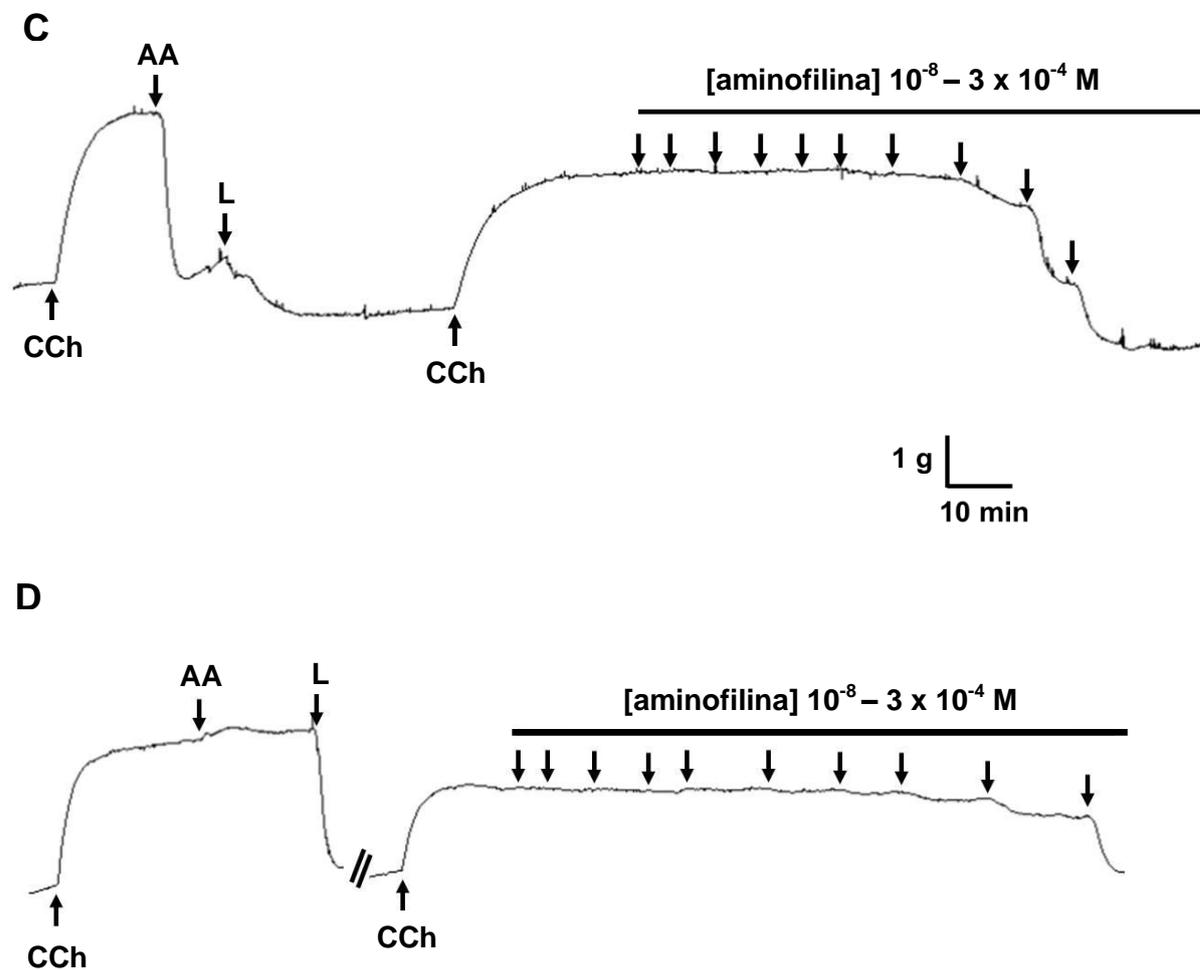
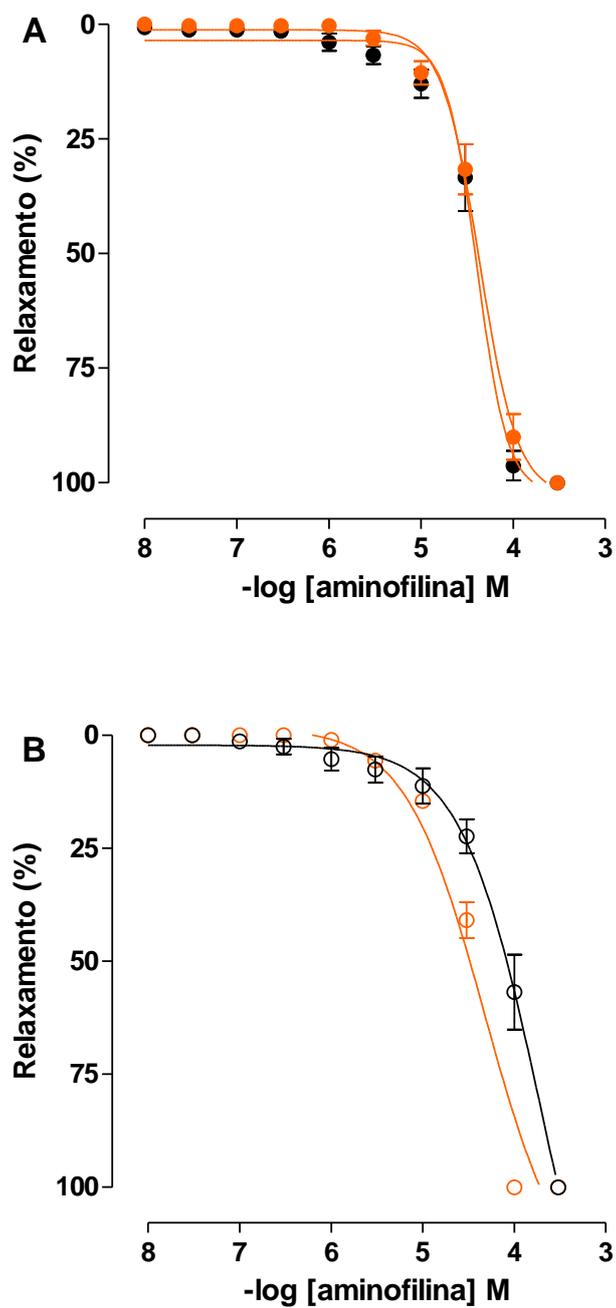


Figura 19 – Continuação



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa da aminofilina nas concentrações de  $10^{-8}$ ;  $3 \times 10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $3 \times 10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $3 \times 10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $3 \times 10^{-5}$ ;  $10^{-4}$  e  $3 \times 10^{-4}$  M (A, B, C e D). CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

**Gráfico 7** – Efeito relaxante da aminofilina sobre a traqueia de cobaias não asmáticas (●, ○) e asmáticas (●, ○) pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh 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,  $n = 5$ .

Fonte: Martins, 2016.

## 5.2 Triagem farmacológica

### 5.2.1 Efeito dos derivados *N*-sulfonilidrazônicos (LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632 e LASSBio-1850) sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaias não asmáticos

O LASSBio-1850 ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  M,  $n = 3$ ) relaxou de maneira significativa os anéis de traqueia de cobaia não asmático pré-contráido por  $10^{-6}$  M de CCh, no entanto com uma baixa eficácia farmacológica. Até a concentração de  $10^{-4}$  M esse derivado induziu um relaxamento máximo de  $26,2 \pm 7,5$  e de  $30,3 \pm 2,0\%$  na presença e na ausência de epitélio funcional (Gráfico 8, tabela 3), sendo o tempo de relaxamento de  $109,3 \pm 8,9$  e de  $107,7 \pm 9,3$  minutos, respectivamente.

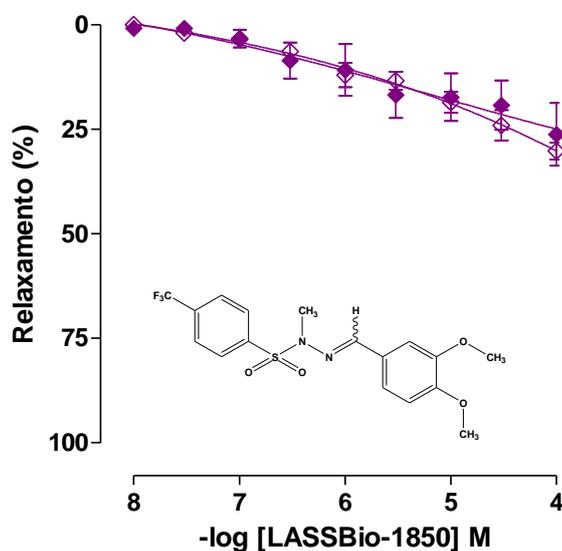
Diferentemente, o LASSBio-448, o LASSBio-1624 e o LASSBio-1632 ( $10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M,  $n = 5$ ) relaxaram de maneira significativa os anéis de traqueia de cobaia não asmático pré-contráido com  $10^{-6}$  M de CCh tanto na presença ( $pD_2 = 4,53 \pm 0,12$ ;  $4,96 \pm 0,09$  e  $5,08 \pm 0,26$ ) como na ausência ( $4,36 \pm 0,08$ ;  $5,13 \pm 0,15$  e  $5,09 \pm 0,21$ ) do epitélio funcional (Gráficos 9, 10 e 11; Tabela 3), respectivamente. O valor de  $E_{max}$  (100%) para esses três derivados foi atingido na concentração de  $3 \times 10^{-4}$  M em ambas as situações.

Os tempos de relaxamento foram de  $191,8 \pm 7,2$  e de  $185,5 \pm 10,3$  minutos para o LASSBio-448, de  $142,0 \pm 8,7$  e de  $151,5 \pm 13,9$  minutos para o LASSBio-1624 e de  $175,6 \pm 15,6$  e de  $159,2 \pm 17,3$  minutos para o LASSBio-1632 na presença e na ausência de epitélio funcional, respectivamente.

Comparando-se as potências do LASSBio-448, do LASSBio-1624 e do LASSBio-1632 é possível evidenciar uma equipotência entre esses três derivados.

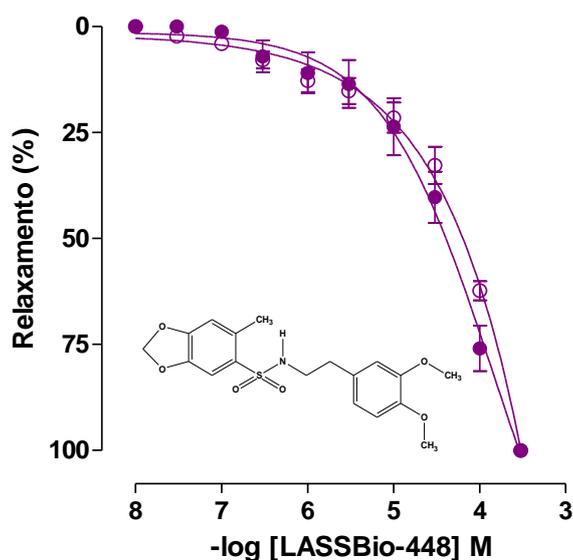
A responsividade da traqueia ao CCh foi revertida em até duas horas após a remoção dos derivados das preparações (dados não mostrados).

**Gráfico 8** – Efeito relaxante do LASSBio-1850 em anéis de traqueia de cobaia não asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (◆) e na ausência (◇) de epitélio funcional.



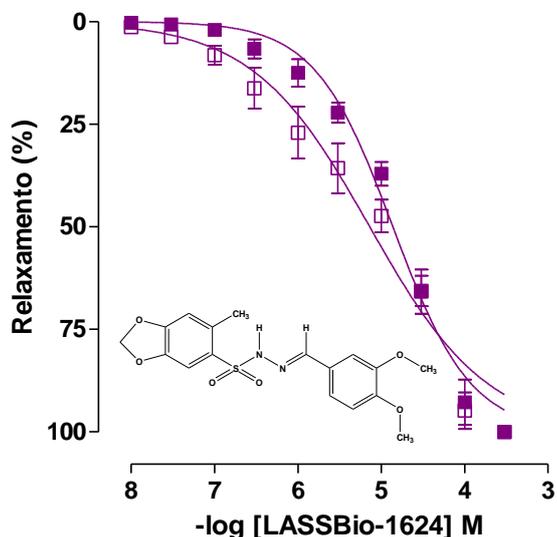
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ .  
Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 9** – Efeito relaxante do LASSBio-448 em anéis de traqueia de cobaia não asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (●) e na ausência (○) de epitélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ .  
Fonte: Martins, 2016.

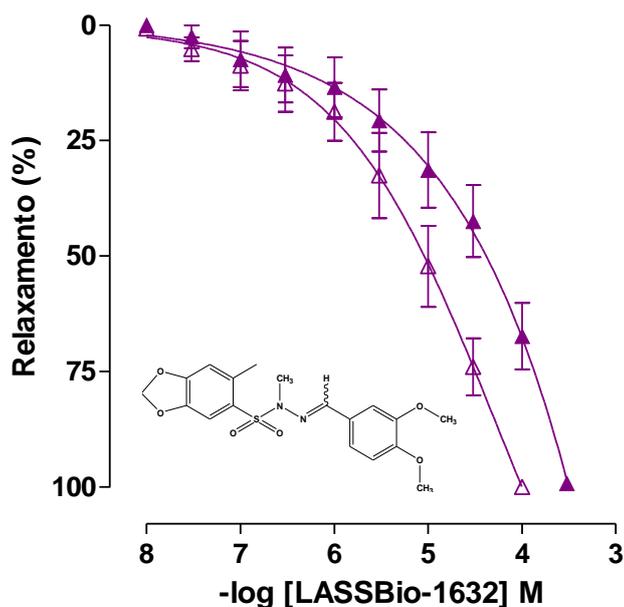
**Gráfico 10** – Efeito relaxante do LASSBio-1624 em anéis de traqueia de cobaia não asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 11** – Efeito relaxante do LASSBio-1632 em anéis de traqueia de cobaia não asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (▲) e na ausência (△) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

**Tabela 3** - Valores de  $pD_2$  do LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, e LASSBio-1850 na presença e na ausência de epitélio funcional em traqueia de cobaia não asmático.

LASSBio	Não asmático			
	E (+)		E (-)	
	$pD_2$	$E_{max} (%)$	$pD_2$	$E_{max} (%)$
448	$4,53 \pm 0,12$	100	$4,36 \pm 0,08$	100
1624	$4,96 \pm 0,09$	100	$5,13 \pm 0,15$	100
1632	$5,08 \pm 0,26$	100	$5,09 \pm 0,21$	100
1850	-	$26,2 \pm 7,5$	-	$30,3 \pm 2,0$

E (+) = presença de epitélio funcional; E (-) = ausência de epitélio funcional.

Fonte: Martins, 2016.

### 5.2.2 Efeito dos derivados *N*-sulfonilidrazônicos (LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851) sobre a contração tônica induzida por CCh em traqueia de cobaias asmáticos

O LASSBio-1850 ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  M,  $n = 3$ ) relaxou de maneira significativa os anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraído com  $10^{-6}$  M de CCh, no entanto com uma baixa eficácia farmacológica. Até a concentração de  $10^{-4}$  M esse derivado induziu um relaxamento máximo de  $30,3 \pm 2,3$  e de  $44,0 \pm 2,1\%$  na presença e na ausência de epitélio funcional (Gráfico 12, Tabela 4), sendo o tempo de relaxamento de  $109,3 \pm 8,9$  e de  $107,7 \pm 9,3$  minutos, respectivamente.

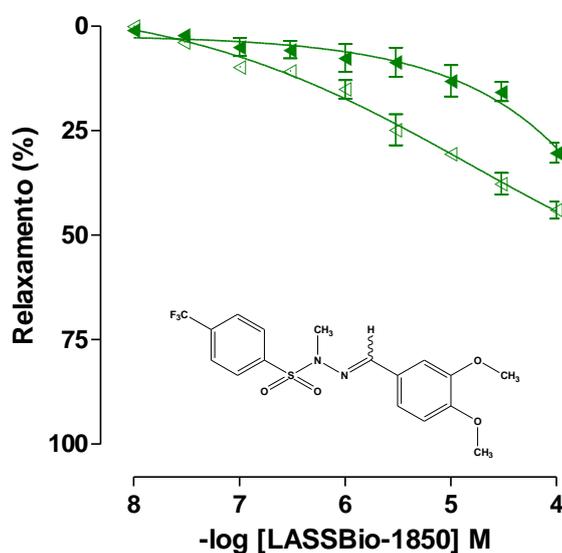
Por sua vez, o LASSBio-448, o LASSBio-1624, o LASSBio-1848, o LASSBio-1849 e o LASSBio-1851 relaxaram de maneira significativa os anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraído com  $10^{-6}$  M de CCh, tanto na presença ( $pD_2 = 4,61 \pm 0,20$ ;  $4,88 \pm 0,18$ ;  $4,84 \pm 0,10$ ;  $4,19 \pm 0,10$  e  $4,82 \pm 0,11$ ) como na ausência ( $pD_2 = 4,60 \pm 0,11$ ;  $4,93 \pm 0,08$ ;  $4,59 \pm 0,04$ ;  $4,21 \pm 0,07$  e  $4,72 \pm 0,08$ ) do epitélio funcional (Gráficos 13, 14, 15, 16 e 17; Tabela 4), respectivamente, não havendo diferença de potência farmacológica entre esses derivados. Os  $E_{max}$  (100%) dos LASSBio-448, do LASSBio-1624, do LASSBio-1848, do LASSBio-1849 foram atingidos na concentração de  $3 \times 10^{-4}$  M, enquanto que para o LASSBio-1851 foi utilizado a concentração de  $10^{-4}$  M.

De acordo com a potência farmacológica, o LASSBio-1632, o LASSBio-1846 e o LASSBio-1847 ( $10^{-8}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M,  $n = 5$ ) mostraram-se os mais potentes entre os derivados avaliados, e equipotentes entre si, nos animais asmáticos. Esses derivados relaxaram de maneira significativa os anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraído com  $10^{-6}$  M de CCh, tanto na presença ( $pD_2 = 5,19 \pm 0,21$ ;  $5,39 \pm 0,13$  e  $5,26 \pm 0,07$ ) como na ausência ( $pD_2 = 5,50 \pm 0,15$ ;  $5,54 \pm 0,07$  e  $5,44 \pm 0,07$ ) do epitélio funcional (Gráficos 18, 19 e 20; Tabela 4), respectivamente. O valor de  $E_{max}$  (100%) do LASSBio-1632 foi atingido na concentração de  $3 \times 10^{-4}$  M na presença e de  $10^{-4}$  M na ausência de epitélio funcional, respectivamente, enquanto que para o LASSBio-1846 e para o LASSBio-1847 o  $E_{max}$  foi obtido na concentração de  $3 \times 10^{-5}$  M em ambas as condições.

Os tempos de relaxamento para o LASSBio-448, o LASSBio-1624, o LASSBio-1632, o LASSBio-1846, o LASSBio-1847, o LASSBio-1848, o LASSBio-1849 e o LASSBio-1851 foram de  $175,8 \pm 11,8$ ;  $142,8 \pm 6,7$ ;  $140,8 \pm 13,2$ ;  $106,0 \pm 4,5$ ;  $114,8 \pm 7,6$ ;  $118,7 \pm 8,27$ ;  $150,3 \pm 5,9$  e  $149,2 \pm 12,4$  minutos na presença e de  $172,8 \pm 10,3$ ;  $163,2 \pm 11,5$ ;  $149,8 \pm 10,0$ ;  $96,6 \pm 6,4$ ;  $105,2 \pm 8,6$ ;  $120,0 \pm 16,9$ ;  $145,4 \pm 11,6$  e  $139,4 \pm 13,0$  minutos de epitélio funcional, respectivamente.

A responsividade da traqueia ao CCh foi revertida em até duas horas após a remoção dos derivados das preparações (dados não mostrados).

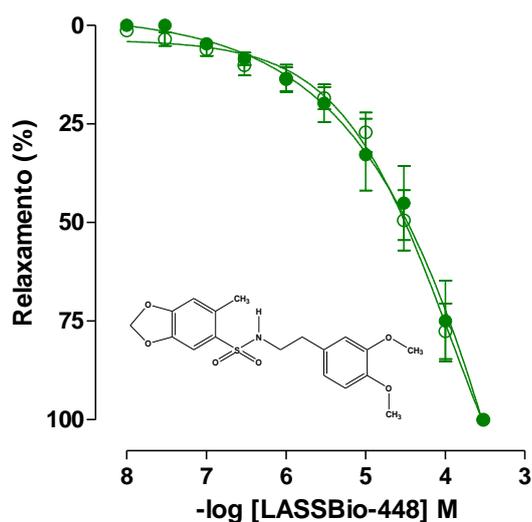
**Gráfico 12** – Efeito relaxante do LASSBio-1850 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença ( $\blacktriangle$ ) e na ausência ( $\triangleleft$ ) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

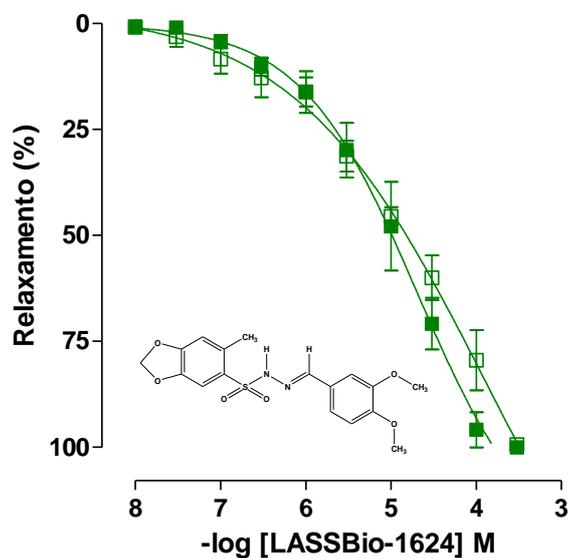
**Gráfico 13** – Efeito relaxante do LASSBio-448 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença ( $\bullet$ ) e na ausência ( $\circ$ ) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

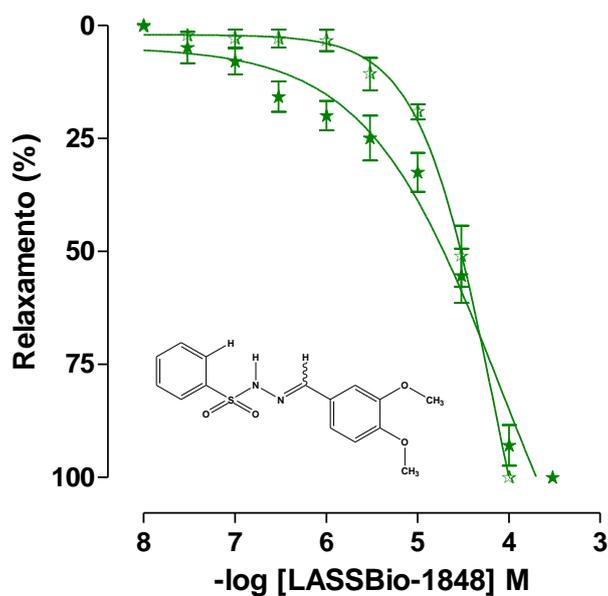
**Gráfico 14** – Efeito relaxante do LASSBio-1624 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

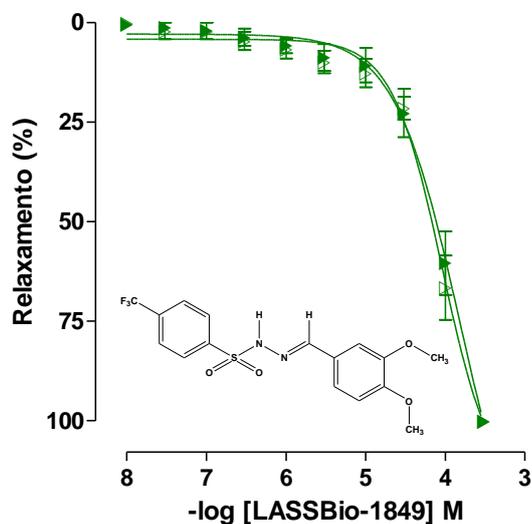
**Gráfico 15** – Efeito relaxante do LASSBio-1848 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (★) e na ausência (☆) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

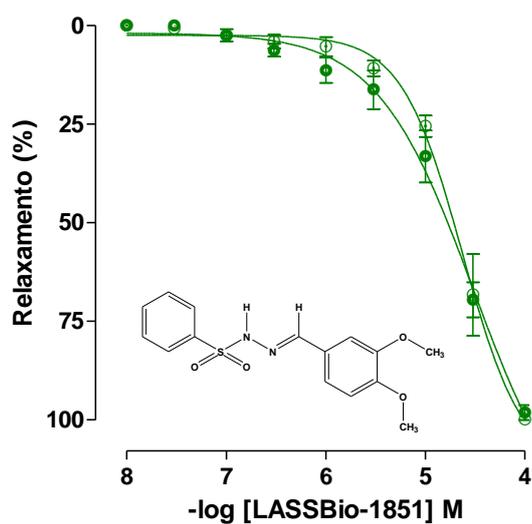
**Gráfico 16** – Efeito relaxante do LASSBio-1849 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (▶) e na ausência (▷) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

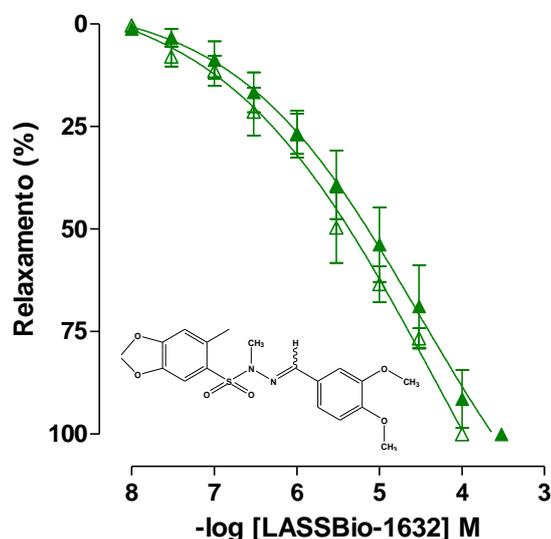
**Gráfico 17** – Efeito relaxante do LASSBio-1851 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (●) e na ausência (⊙) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

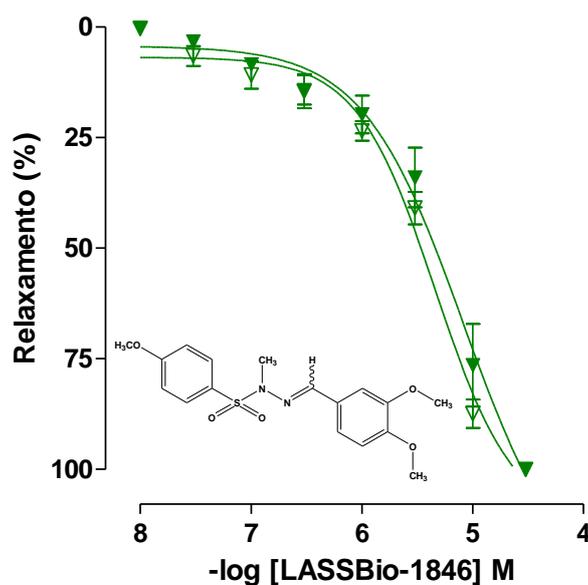
**Gráfico 18** – Efeito relaxante do LASSBio-1632 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença ( $\blacktriangle$ ) e na ausência ( $\triangle$ ) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

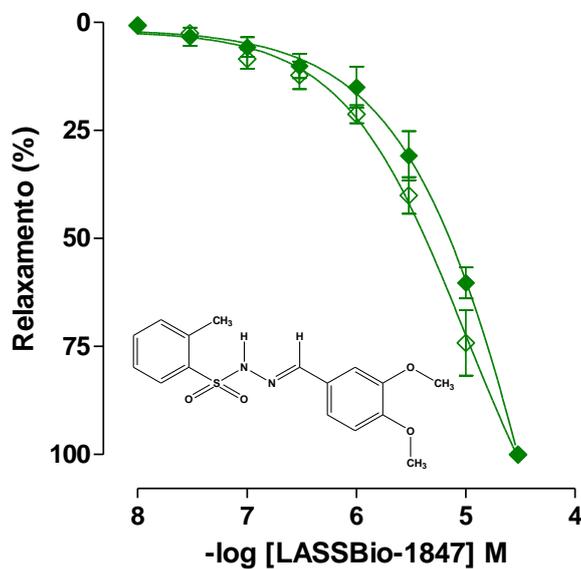
**Gráfico 19** – Efeito relaxante do LASSBio-1846 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença ( $\blacktriangledown$ ) e na ausência ( $\triangledown$ ) de epitélio funcional.



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

Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 20** – Efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaia asmático pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença (◆) e na ausência (◇) de epitélio funcional.



**Tabela 4** – Valores de  $pD_2$  do LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851 na presença e na ausência de epitélio funcional em traqueia de cobaia asmático.

LASSBio	Asmático			
	E (+)		E (-)	
	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$pD_2$	$E_{max}$ (%)
448	4,61 ± 0,20 <sup>*</sup>	100	4,60 ± 0,11 <sup>*</sup>	100
1624	4,88 ± 0,18	100	4,93 ± 0,08	100
1632	5,19 ± 0,21 <sup>¥</sup>	100	5,50 ± 0,15 <sup>¥</sup>	100
1846	5,39 ± 0,13 <sup>#</sup>	100	5,54 ± 0,07 <sup>#</sup>	100
1847	5,26 ± 0,07 <sup>\$</sup>	100	5,44 ± 0,07 <sup>\$</sup>	100
1848	4,84 ± 0,10	100	4,59 ± 0,04	100
1849	4,19 ± 0,10	100	4,21 ± 0,07 <sup>&amp;</sup>	100
1850	-	30,3 ± 2,3	-	44,0 ± 2,1
1851	4,82 ± 0,11	100	4,72 ± 0,08	100

E (+) = presença de epitélio funcional; E (-) = ausência de epitélio funcional.

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni.

E (+): <sup>\*</sup> $p < 0,05$  [448 vs. 1632/1846/1847]; <sup>#</sup> $p < 0,05$  [1846 vs. 1848/1849/1851]; <sup>\$</sup> $p < 0,05$  [1847 vs. 1848/1849]; <sup>¥</sup> $p < 0,05$  [1632 vs. 1848/1849];

E (-): <sup>\*</sup> $p < 0,05$  [448 vs. 1632/1846/1847]; <sup>#</sup> $p < 0,05$  [1846 vs. 1848/1849/1851]; <sup>\$</sup> $p < 0,001$  [1847 vs. 1848/1849/1851]; <sup>¥</sup> $p < 0,05$  [1632 vs. 1848/1849/1851]; <sup>&</sup> $p < 0,05$  [1624 vs. 1849].

Fonte: Martins, 2016.

### 5.3 Investigação do mecanismo de ação, em nível funcional, do LASSBio-1847 em traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos

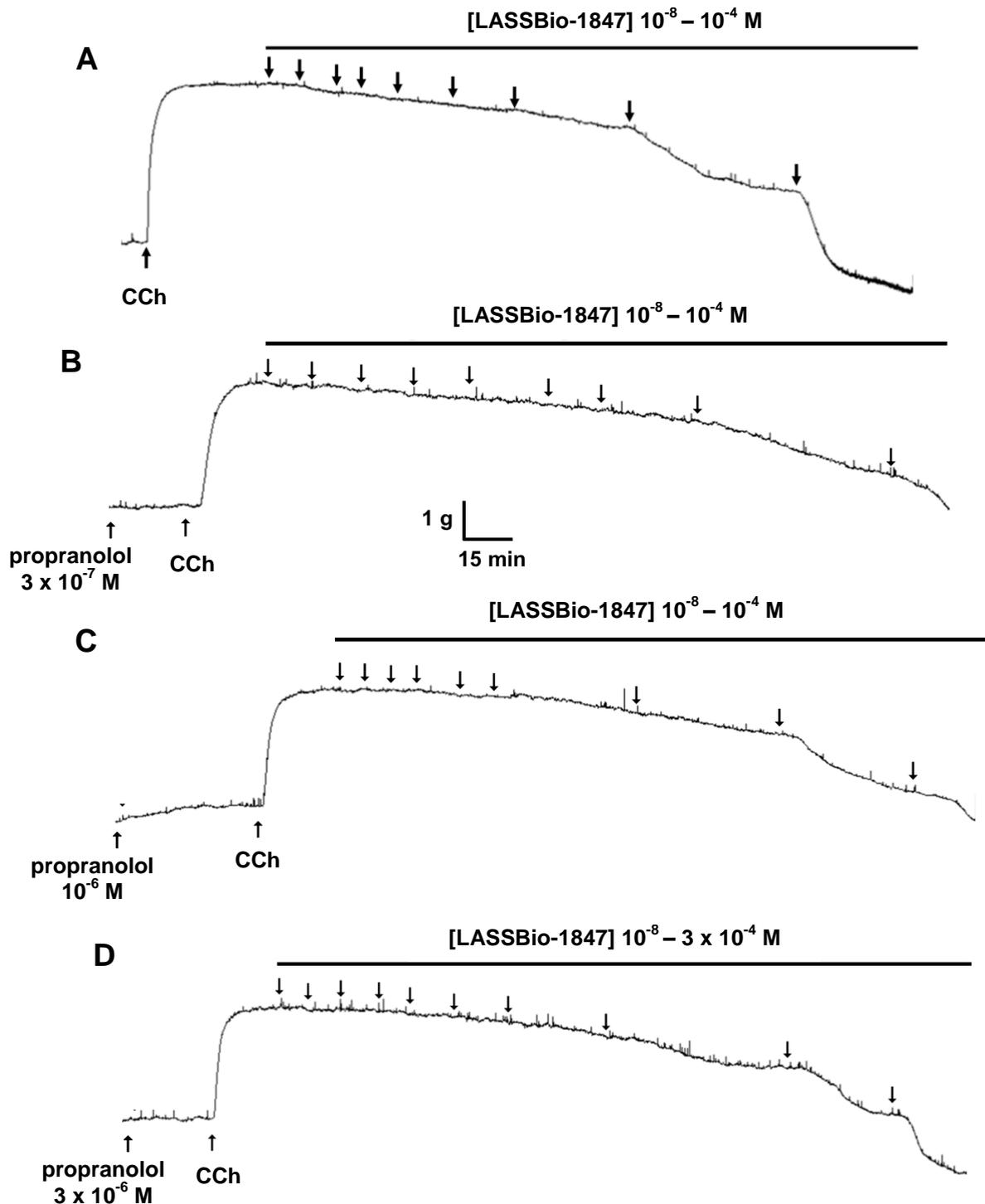
#### 5.3.1 Participação dos receptores adrenérgicos- $\beta$

##### 5.3.1.1 Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de propranolol

O LASSBio-1847 relaxou os anéis de traqueia de cobaia não asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência ( $pD_2 = 4,81 \pm 0,02$ ) e na presença de  $3 \times 10^{-7}$  ( $pD_2 = 4,80 \pm 0,08$ ), de  $10^{-6}$  ( $pD_2 = 5,00 \pm 0,04$ ) e de  $3 \times 10^{-6}$  M ( $pD_2 = 4,57 \pm 0,10$ ) de propranolol, um bloqueador não seletivos dos receptores adrenérgicos- $\beta$  (Figura 20A, B, C e D, Gráfico 21A). Foi observado que na presença de  $3 \times 10^{-7}$  M do bloqueador não houve alteração significativa da potência do derivado. Já na presença de  $10^{-6}$  M de propranolol, ocorreu um aumento na potência relaxante do LASSBio-1847 foi aumentada em 1,8 vezes e na presença de  $3 \times 10^{-6}$  M de propranolol a potência do derivado foi atenuada em 2,0 vezes. A concentração do LASSBio-1847 para produzir o  $E_{max}$  (100%) foi de  $10^{-4}$  M na ausência e na presença do bloqueador foi de  $3 \times 10^{-7}$  e de  $10^{-6}$  M. Quando na presença de  $3 \times 10^{-6}$  M do propranolol foi necessário  $3 \times 10^{-4}$  M do derivado para se obter o  $E_{max}$ .

Já em cobaias asmáticos, o LASSBio-1847 relaxou a traqueia desses animais pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência ( $pD_2 = 5,26 \pm 0,07$ ) e na presença de  $3 \times 10^{-7}$  ( $pD_2 = 4,81 \pm 0,05$ ), de  $10^{-6}$  ( $pD_2 = 4,78 \pm 0,07$ ) e de  $3 \times 10^{-6}$  M ( $pD_2 = 4,48 \pm 0,08$ ) de propranolol (Figura 21A, B, C e D, Gráfico 21B), havendo uma atenuação do efeito relaxante do derivado em 2,8, 3,2 e 6,2 vezes, respectivamente. A concentração do LASSBio-1847 para produzir o  $E_{max}$  (100%) foi de  $3 \times 10^{-5}$  M na ausência do propranolol, de  $10^{-4}$  M na presença de  $3 \times 10^{-7}$  e  $10^{-6}$  e de  $3 \times 10^{-4}$  na presença do  $3 \times 10^{-6}$  M do bloqueador.

**Figura 20** – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contráidos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (A) e na presença de  $3 \times 10^{-7}$  (B), de  $10^{-6}$  (C) e de  $3 \times 10^{-6}$  M (D) de propranolol.



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

Fonte: Martins, 2016.

**Figura 21** – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaias asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (A) e na presença de  $3 \times 10^{-7}$  (B), de  $10^{-6}$  (C) e de  $3 \times 10^{-6}$  M (D) de propranolol.

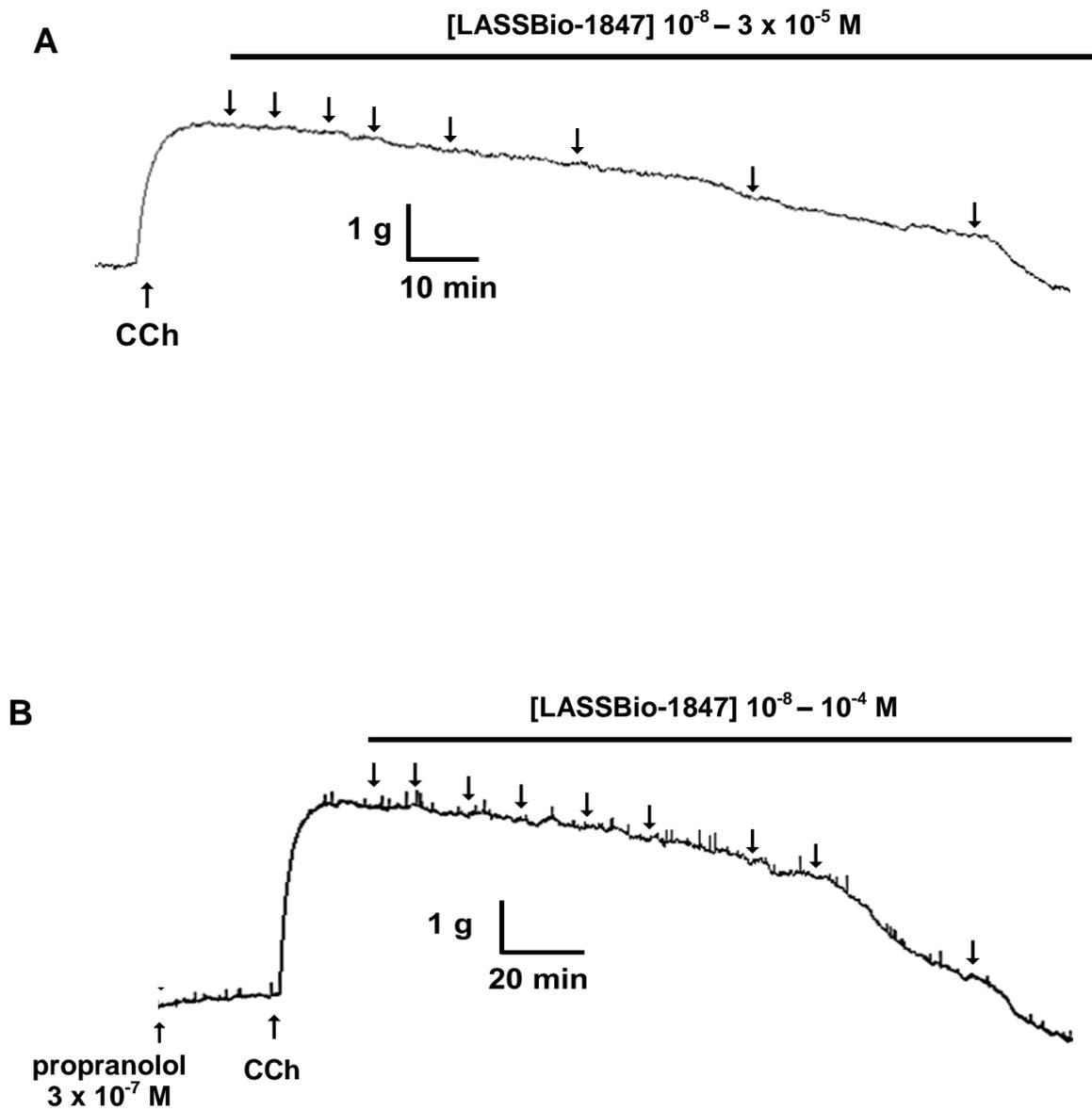
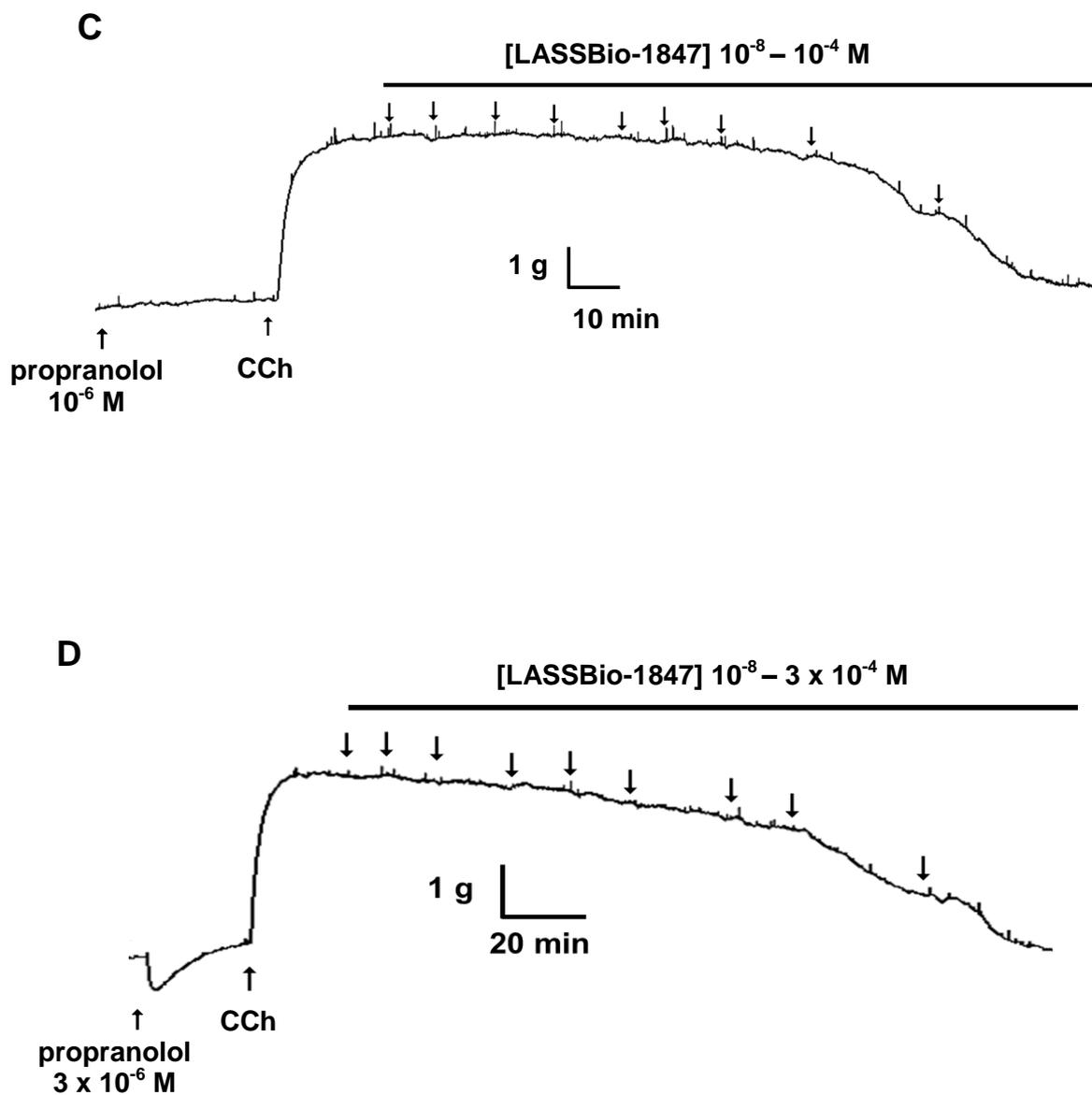


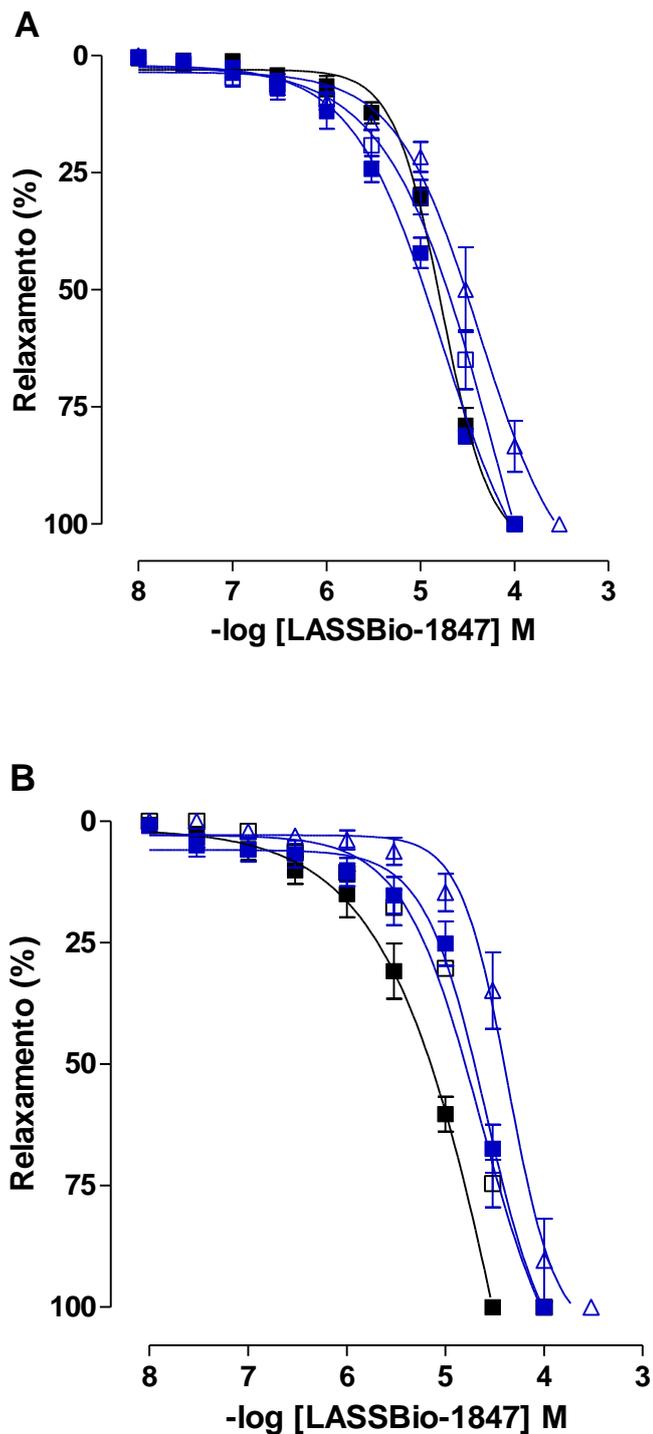
Figura 21 – Continuação



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1847 nas concentrações de  $10^{-8}$ ;  $3 \times 10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $3 \times 10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $3 \times 10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $3 \times 10^{-5}$  (A) e  $10^{-4}$  (B e C) e  $3 \times 10^{-4}$  (D). CCh = carbacol; L = lavagem.

Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 21** – Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (■) e na presença de  $3 \times 10^{-7}$  (□),  $10^{-6}$  (■) e  $3 \times 10^{-6}$  (△) M de propranolol em anéis de traqueia de cobaias não asmáticas (A) e asmáticas (B).



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

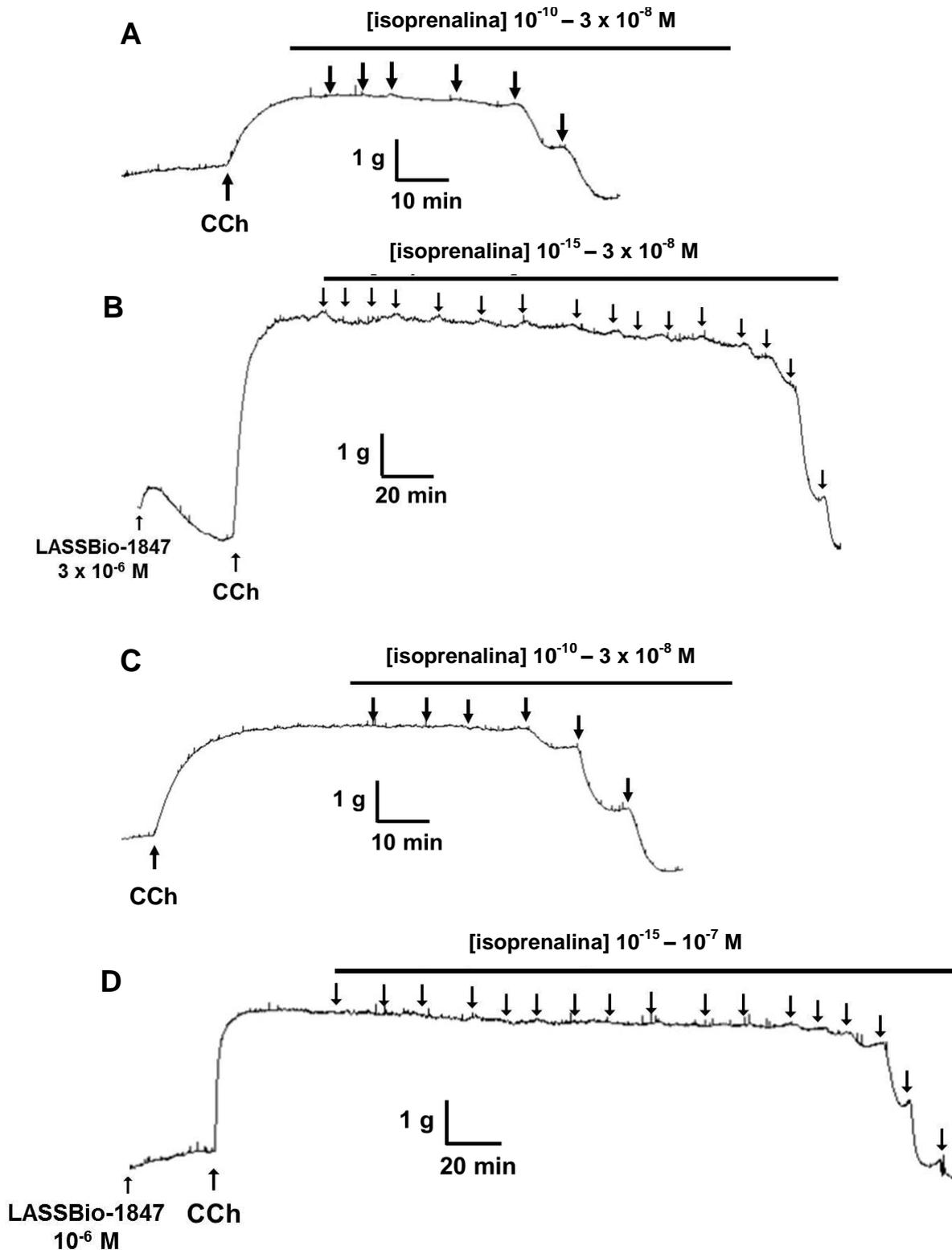
Fonte: Martins, 2016.

### **5.3.1.2 Efeito da isoprenalina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e presença do LASSBio-1847**

A isoprenalina ( $10^{-15}$  –  $3 \times 10^{-8}$  M) relaxou os anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência ( $pD_2 = 8,23 \pm 0,08$ ) e na presença ( $pD_2 = 8,50 \pm 0,08$ ) de  $3 \times 10^{-6}$  M do LASSBio-1847 (Figura 22A e B, Gráfico 22A). De acordo com valores de  $pD_2$ , pode-se evidenciar que o derivado aumentou a potência relaxante da isoprenalina em cerca de 5 vezes. A concentração da isoprenalina para produzir o  $E_{max}$  foi de  $3 \times 10^{-8}$  M tanto na presença quanto na ausência do LASSBio-1847.

Por sua vez, nos animais asmáticos, a isoprenalina ( $10^{-15}$  –  $10^{-7}$  M) relaxou os anéis de traqueia pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência ( $pD_2 = 8,27 \pm 0,11$ ) e na presença ( $pD_2 = 7,86 \pm 0,10$ ) de  $3 \times 10^{-6}$  M do LASSBio-1847 (Figura 22C e D, Gráfico 22B). Ao analisar os valores de  $pD_2$  observa-se uma redução na potência relaxante da isoprenalina em apenas cerca de 2 vezes na presença do derivado. A concentração da isoprenalina para produzir o  $E_{max}$  passou de  $3 \times 10^{-8}$  M na ausência do LASSBio-1847, para  $10^{-7}$  M na presença do mesmo.

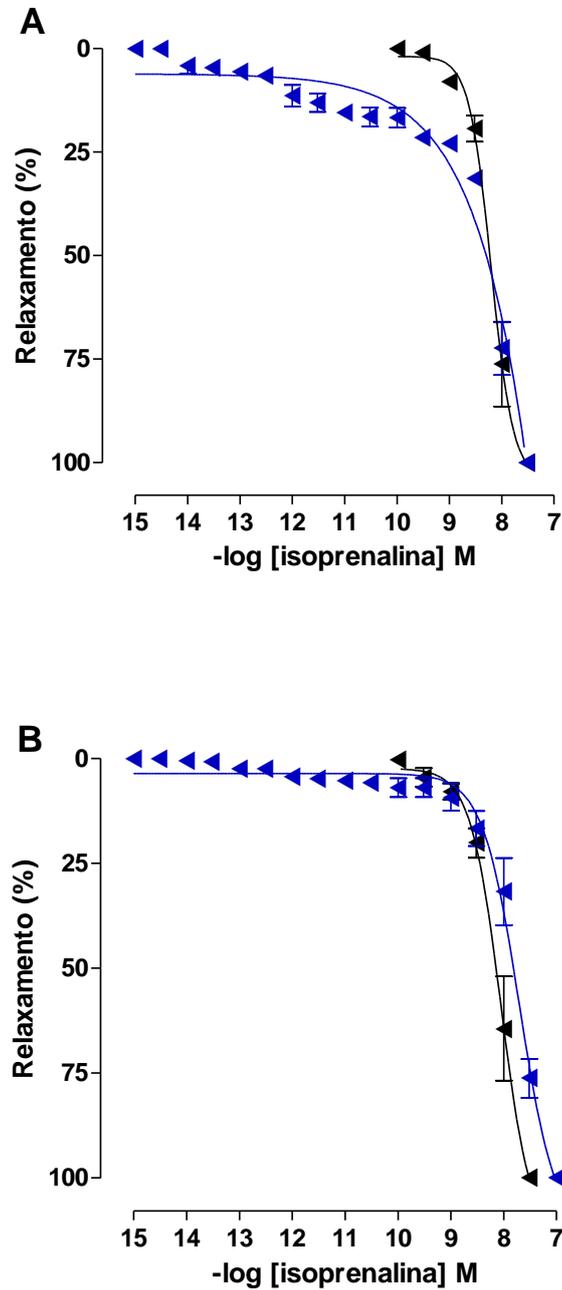
**Figura 22** – Registros representativos do efeito relaxante da isoprenalina em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos (**A** e **C**) e asmáticos (**B** e **D**) pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência e na presença do LASSBio-1847.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LASSBio-1847 nas concentrações de  $10^{-15}$ ;  $3 \times 10^{-15}$ ;  $10^{-14}$ ;  $3 \times 10^{-14}$ ;  $10^{-13}$ ;  $3 \times 10^{-13}$ ;  $10^{-12}$ ;  $3 \times 10^{-12}$ ;  $10^{-11}$ ;  $3 \times 10^{-11}$ ;  $10^{-10}$ ;  $3 \times 10^{-10}$ ;  $10^{-9}$ ;  $3 \times 10^{-9}$ ;  $10^{-8}$ ;  $3 \times 10^{-8}$  (**A**, **B** e **C**) e  $10^{-7}$  M (**D**). CCh = carbacol.

Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 22** – Efeito da isoprenalina sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (◄) e na presença (◄) do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaia não asmático (A) e asmático (B).



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

Fonte: Martins, 2016.

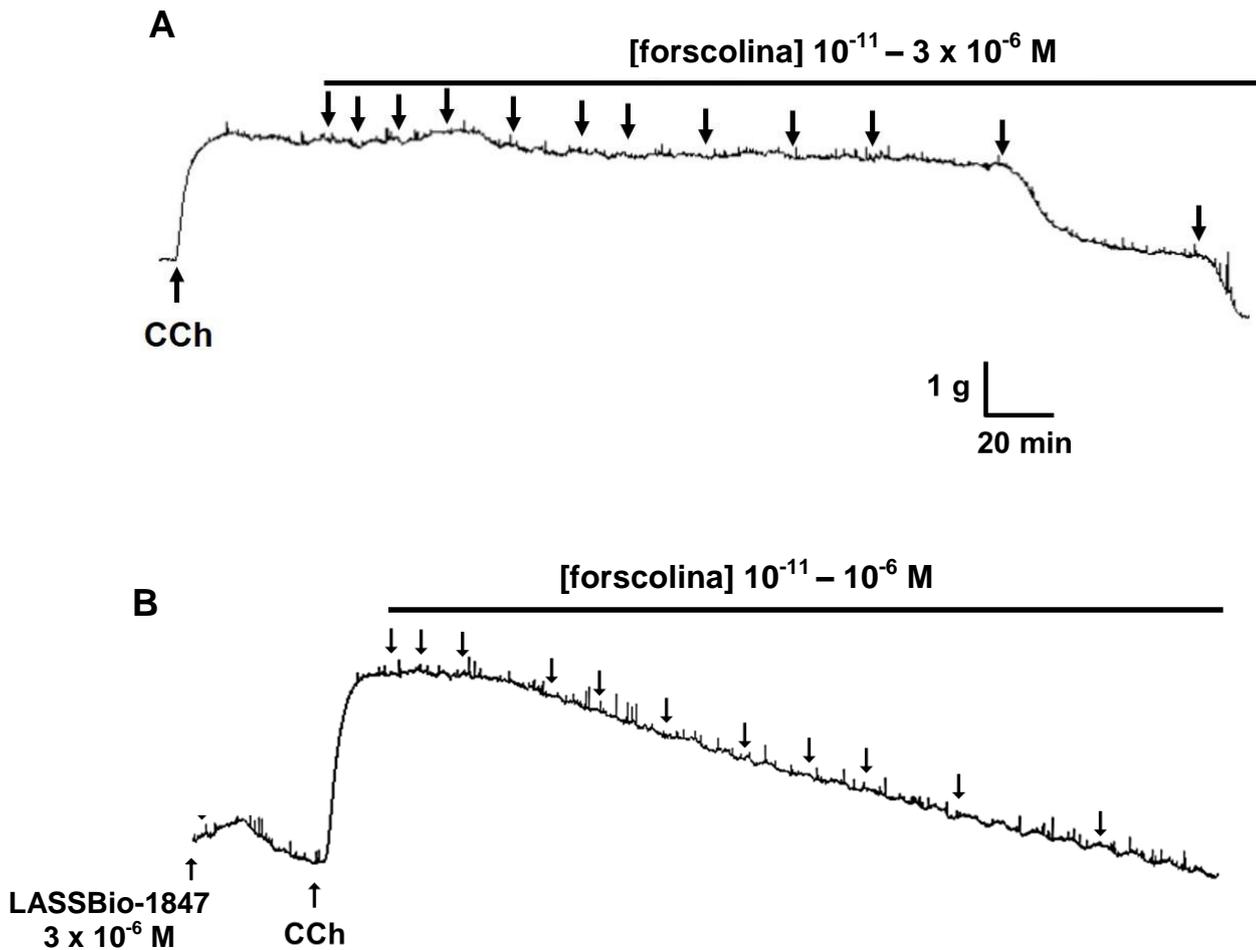
### **5.3.2 Investigação da participação da via AC/cAMP/PKA**

#### **5.3.2.1 Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de CCh na ausência e na presença do LASSBio-1847**

A forskolina ( $10^{-11}$  –  $3 \times 10^{-6}$  M,  $n = 5$ ) relaxou os anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência ( $pD_2 = 6,46 \pm 0,05$ ) e na presença ( $pD_2 = 8,26 \pm 0,14$ ) de  $3 \times 10^{-6}$  M do LASSBio-1847 (Figura 23A e B, Gráfico 23A). De acordo com valores de  $pD_2$ , pode-se evidenciar que o derivado aumentou a potência relaxante da forskolina em cerca de 54 vezes. A concentração da forskolina para produzir o  $E_{max}$  passou de  $3 \times 10^{-6}$  M na ausência do LASSBio-1847, para  $10^{-6}$  M na presença do mesmo.

Para os animais asmáticos, a forskolina ( $10^{-11}$  –  $10^{-6}$  M,  $n = 5$ ) relaxou os anéis de traqueia de cobaias asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência ( $pD_2 = 6,84 \pm 0,04$ ) e na presença ( $pD_2 = 7,43 \pm 0,10$ ) de  $10^{-6}$  M do LASSBio-1847 (Figura 24A e B, Gráfico 23B). Ao analisar os valores de  $pD_2$  observa-se um aumento na potência relaxante da forskolina em apenas cerca de 4 vezes na presença do composto. A concentração da forskolina para produzir o  $E_{max}$  foi de  $10^{-6}$  M tanto na ausência como na presença do LASSBio-1847.

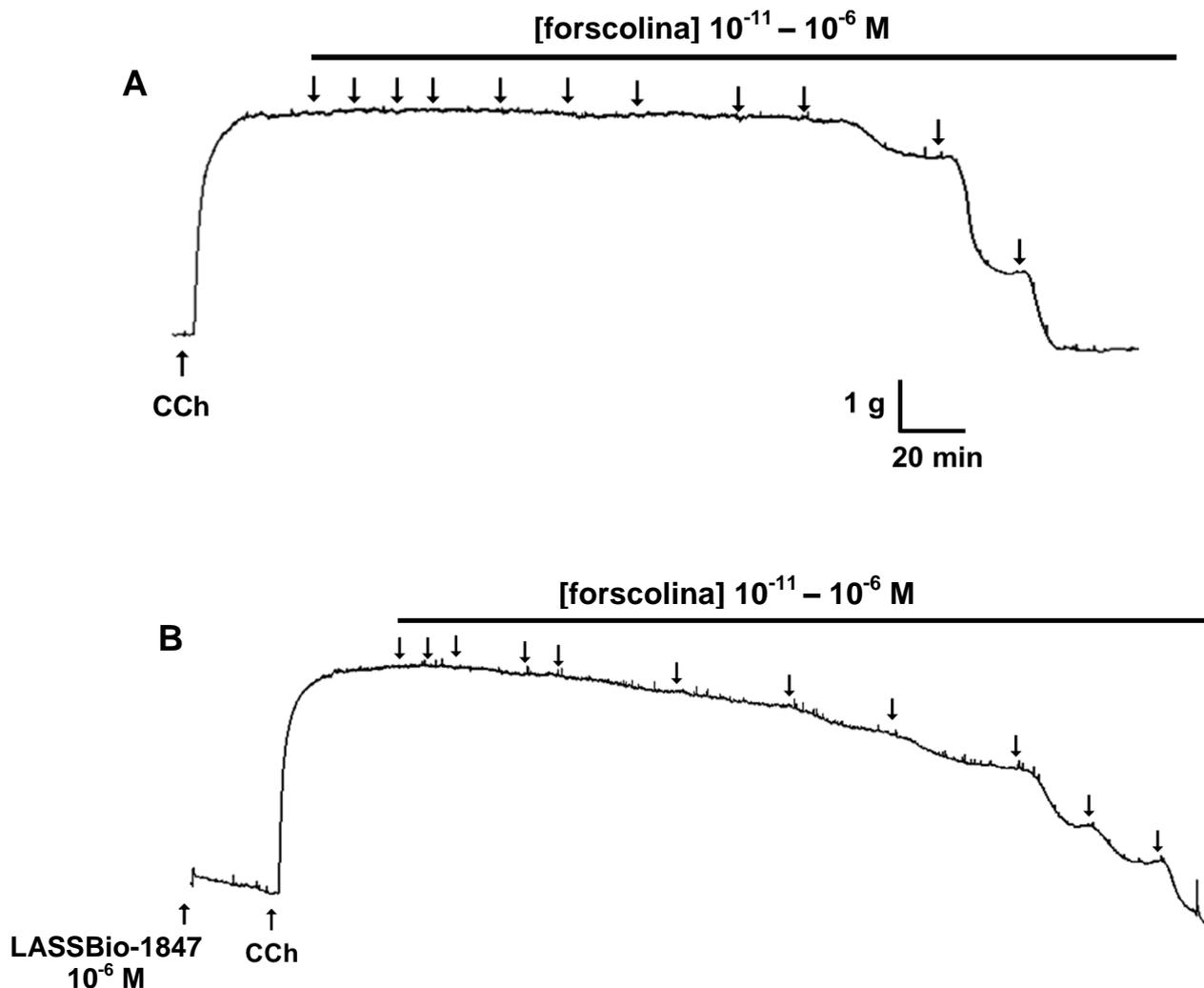
**Figura 23** – Registros representativos do efeito relaxante da forskolina em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (**A**) e na presença (**B**) de  $3 \times 10^{-6}$  M do LASSBio-1847.



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

Fonte: Martins, 2016.

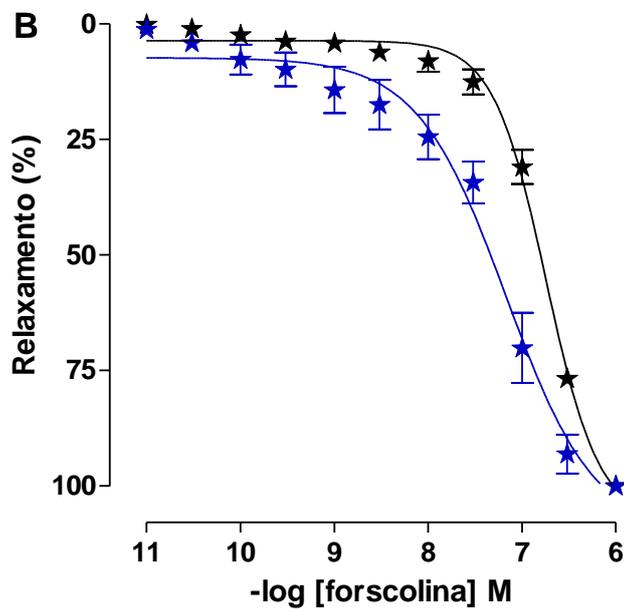
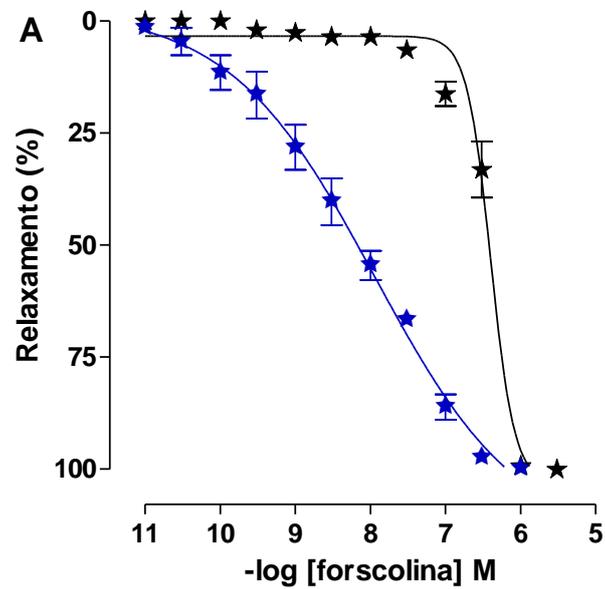
**Figura 24** – Registros representativos do efeito relaxante da forskolina em anéis de traqueia de cobaias asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de  $10^{-6}$  M do LASSBio-1847.



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

Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 23** – Efeito da forskolina sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (★) e na presença (★) do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobraia não asmático (A) e asmático (B).



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

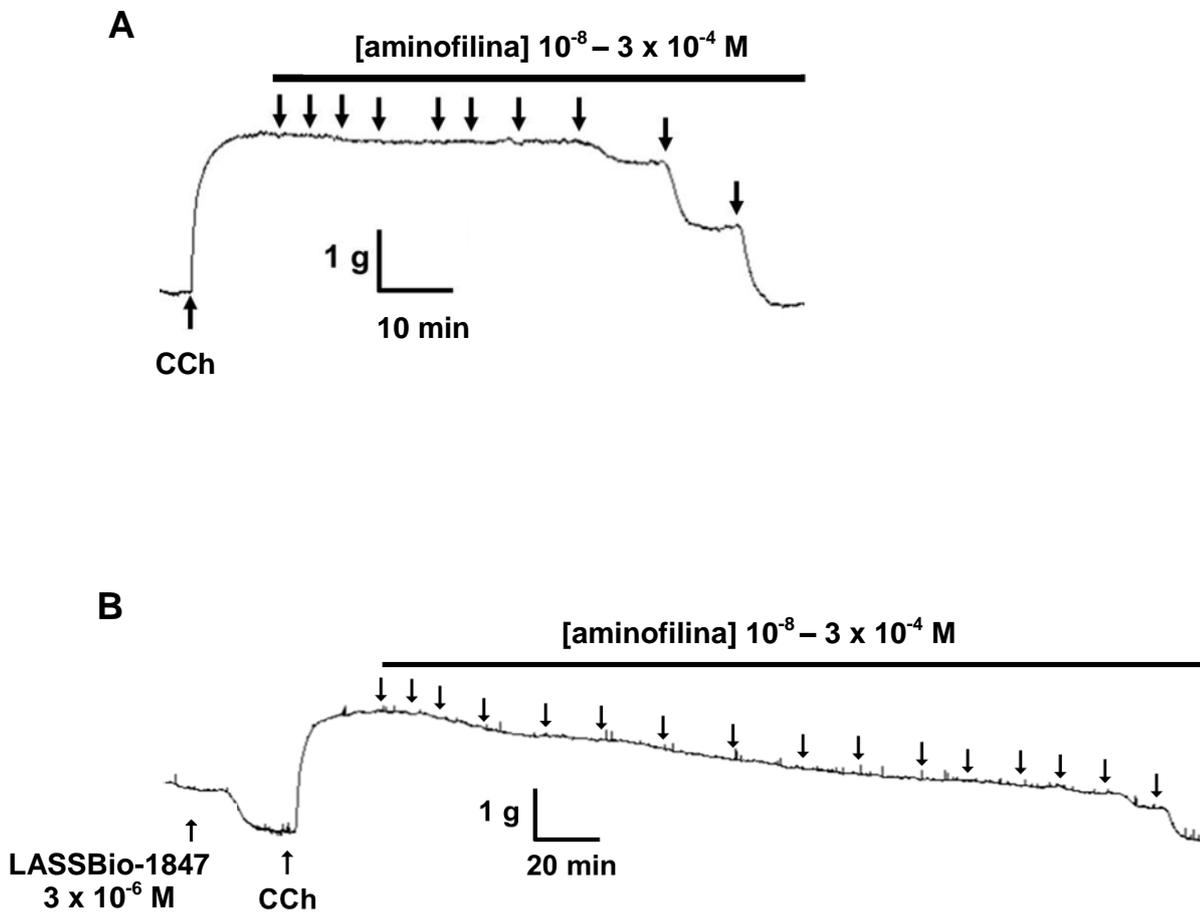
Fonte: Martins, 2016.

### **5.3.2.2 Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de CCh na ausência e na presença do LASSBio-1847**

A aminofilina relaxou os anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh ( $pD_2 = 4,17 \pm 0,07$ ) na faixa de concentração de  $10^{-8}$  à  $3 \times 10^{-4}$  M (Figura 25A, Gráfico 24A). Na presença de  $3 \times 10^{-6}$  M de LASSBio-1847, a aminofilina relaxou esses anéis de traqueia pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh, porém numa maior faixa de concentração de  $10^{-11}$  à  $3 \times 10^{-4}$  M ( $pD_2 = 6,31 \pm 0,27$ ) (Figura 25B, Gráfico 24A). De acordo com valores de  $pD_2$  pode-se evidenciar que o derivado levou a um incremento de potência relaxante da aminofilina de aproximadamente 147 vezes.

Nos animais submetidos ao processo de indução de asma, a aminofilina induziu um relaxamento significativo nos anéis de traqueia pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh ( $pD_2 = 4,36 \pm 0,02$ ) na faixa de concentração de  $10^{-8}$  à  $3 \times 10^{-4}$  M (Figura 26A, Gráfico 24B). Quando da pré-incubação de  $10^{-6}$  M de LASSBio-1847, a aminofilina relaxou os anéis de traqueia pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh numa maior faixa de concentração de  $10^{-11}$  à  $3 \times 10^{-4}$  M ( $pD_2 = 5,21 \pm 0,07$ ) (Figura 26B, Gráfico 24B). Ao analisar os valores de  $pD_2$  observa-se um aumento na potência relaxante da aminofilina em apenas cerca de 4 vezes na presença do derivado.

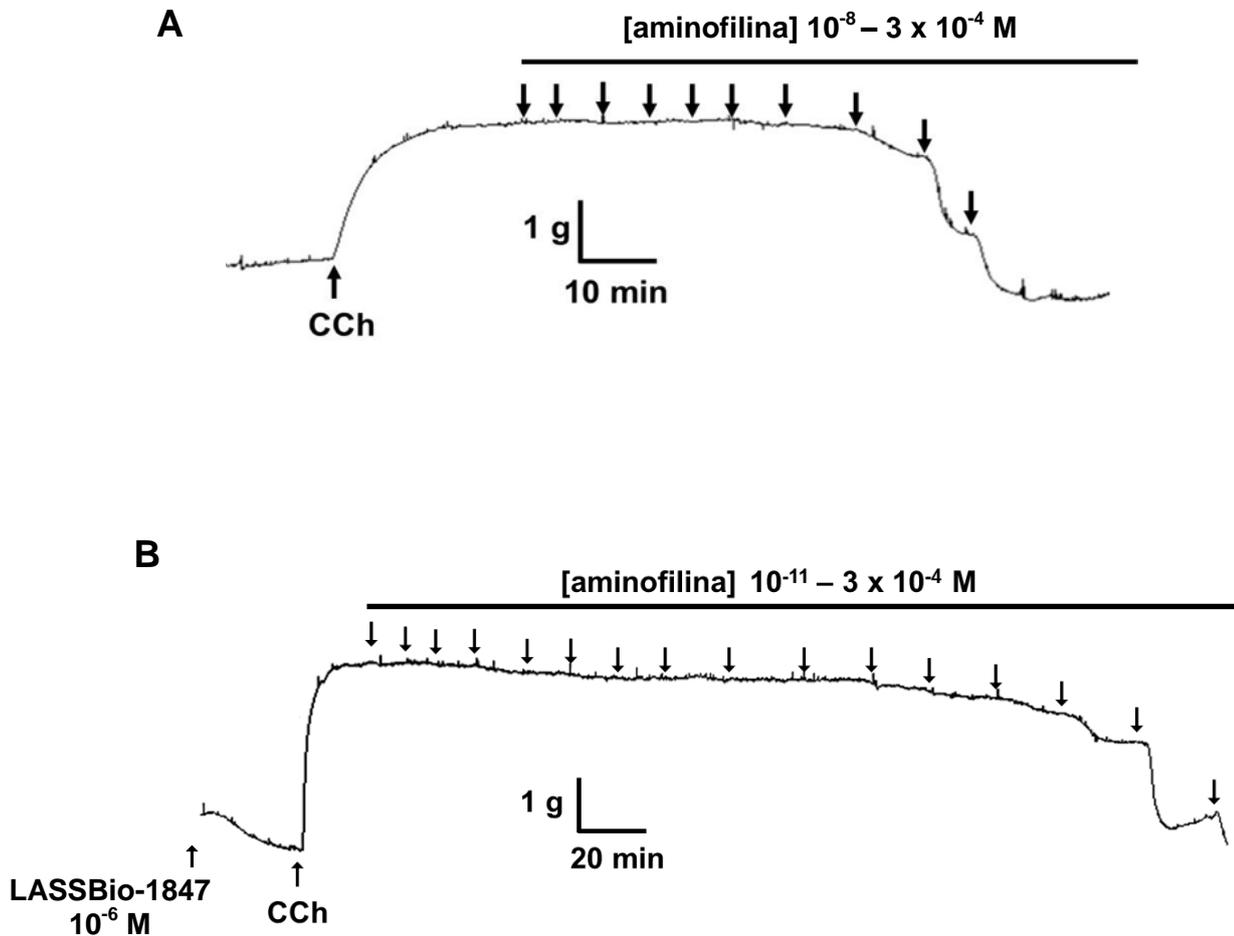
**Figura 25** – Registros representativos do efeito relaxante da aminofilina em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contráidos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (**A**) e na presença (**B**) de  $3 \times 10^{-6}$  M do LASSBio-1847.



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

Fonte: Martins, 2016.

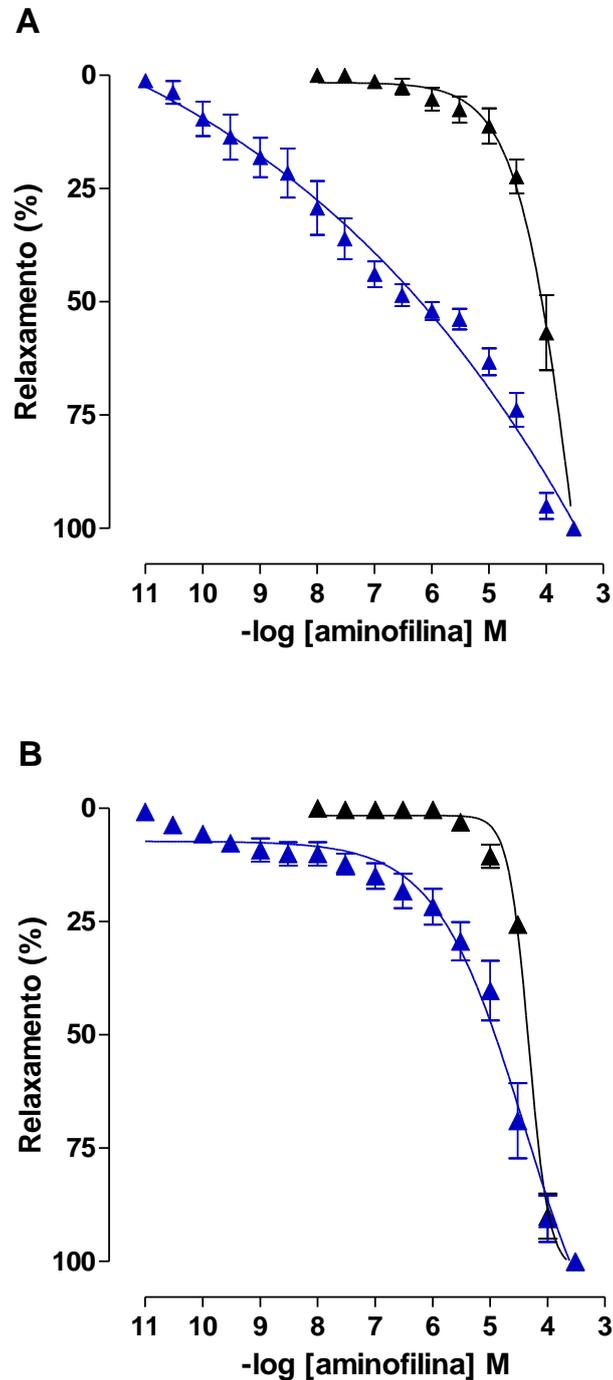
**Figura 26** – Registros representativos do efeito relaxante da aminofilina em anéis de traqueia de cobaias asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de  $10^{-6}$  M do LASSBio-1847.



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

Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 24** – Efeito da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (▲) e na presença (▲) do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaias não asmáticas (A) e asmáticas (B).



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

Fonte: Martins, 2016.

### 5.3.2.3 Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença do H-89

A curva de relaxamento do LASSBio-1847 ( $pD_2 = 4,81 \pm 0,02$ ) foi deslocada para a direita na presença de  $10^{-7}$  M ( $pD_2 = 4,65 \pm 0,06$ ), de  $3 \times 10^{-7}$  M ( $pD_2 = 4,66 \pm 0,04$ ) de H-89, um inibidor da PKA e, contraditoriamente, na presença de  $10^{-6}$  M ( $pD_2 = 5,21 \pm 0,11$ ) do inibidor a curva foi deslocada para a esquerda (Figura 27 A, B, C e D, Gráfico 25A). Assim, foi observado que na presença de  $10^{-7}$  e de  $3 \times 10^{-7}$  M do H-89 houve uma atenuação da potência relaxante do LASSBio-1847 de aproximadamente 1,5 vezes e, de maneira inversa, na presença de  $10^{-6}$  M do inibidor, foi observado um aumento de 1,4 vezes na potência relaxante do derivado. A concentração do LASSBio-1847 para produzir o  $E_{max}$  (100%) foi de  $10^{-4}$  M na ausência e na presença de  $10^{-6}$  M do H-89. Na presença de  $10^{-7}$  e de  $3 \times 10^{-7}$  M do H-89 foi necessário a adição de  $3 \times 10^{-4}$  M do derivado para se obter o  $E_{max}$  do mesmo.

Já em cobaias asmáticos, o LASSBio-1847 relaxou a traqueia desses animais pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência ( $pD_2 = 5,26 \pm 0,07$ ) e na presença de  $10^{-7}$  ( $pD_2 = 4,80 \pm 0,09$ ), de  $3 \times 10^{-7}$  ( $pD_2 = 4,74 \pm 0,08$ ) e de  $10^{-6}$  M ( $pD_2 = 4,82 \pm 0,05$ ) de H-89 (Figura 28 A, B, C e D, Gráfico 25B), havendo uma atenuação do efeito relaxante do derivado em 2,8, 3,1 e 2,9 vezes, respectivamente. A concentração do LASSBio-1847 para produzir o  $E_{max}$  (100%) foi de  $3 \times 10^{-5}$  M na ausência e de até  $3 \times 10^{-4}$  M na presença do inibidor da PKA nas concentrações acima mencionadas.

**Figura 27** – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaias não asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (**A**) e na presença de  $10^{-7}$  (**B**), de  $3 \times 10^{-7}$  (**C**) e de  $10^{-6}$  M (**D**) de H-89.

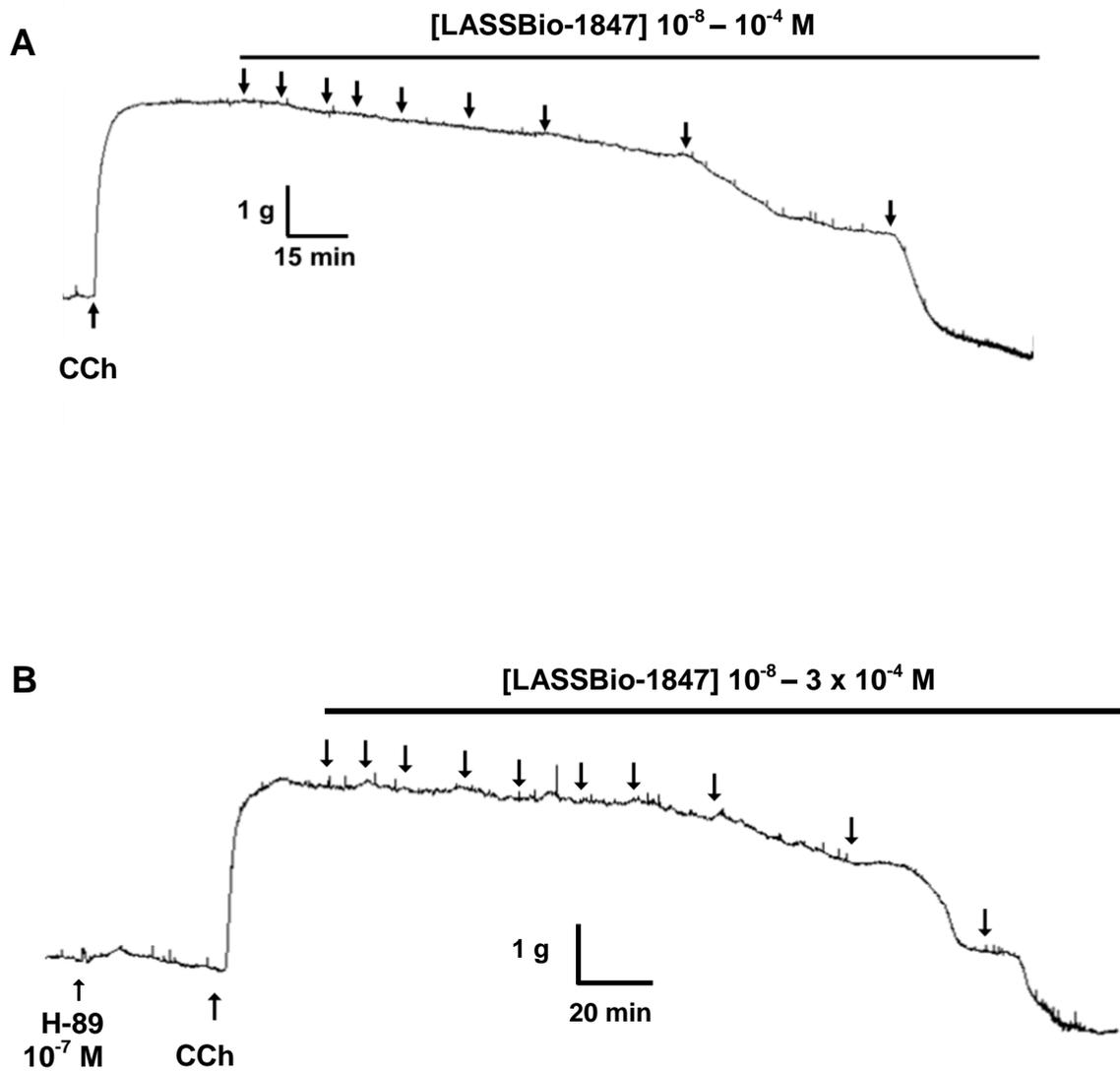
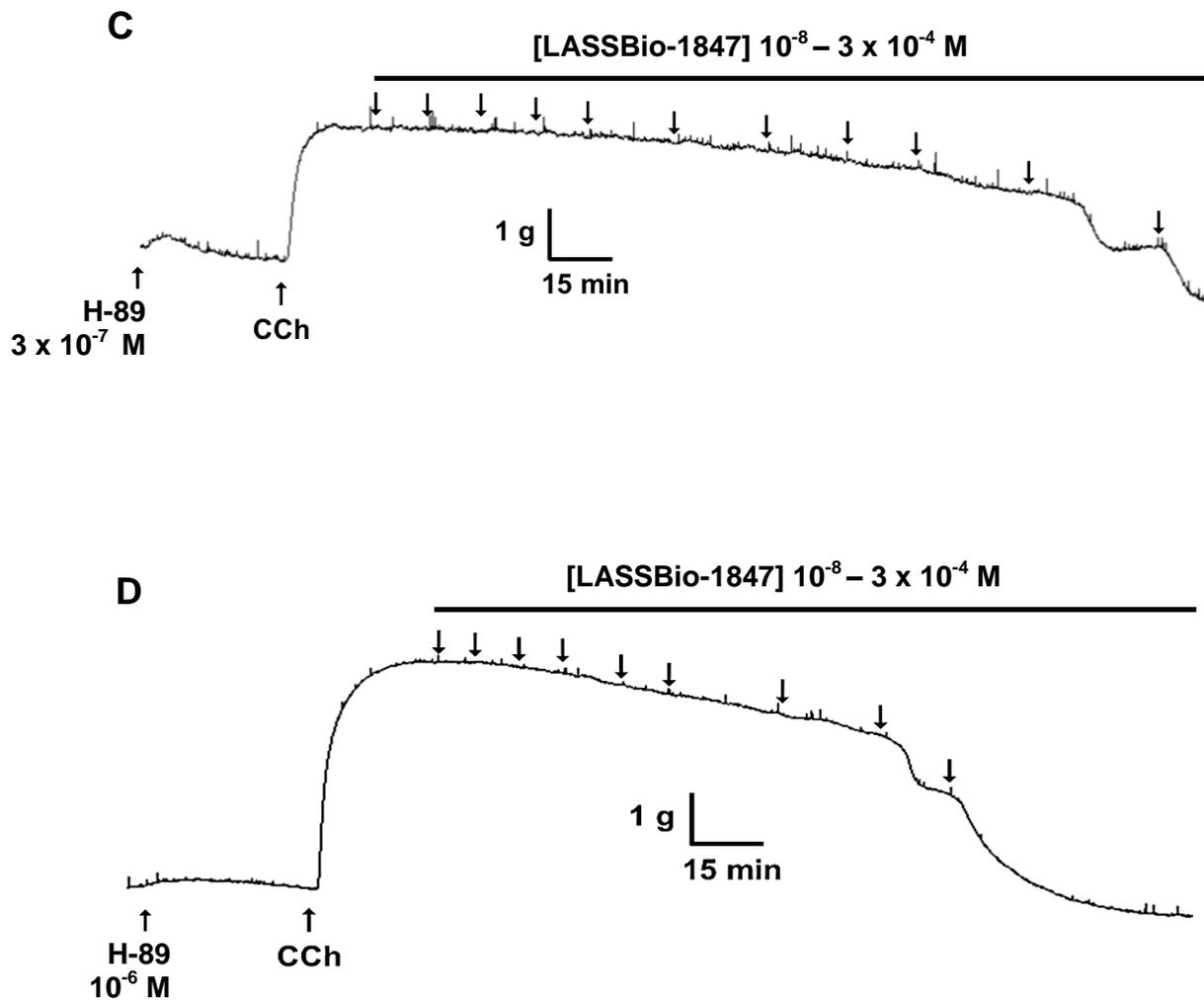


Figura 27 – Continuação



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

**Figura 28** – Registros representativos do efeito relaxante do LASSBio-1847 em anéis de traqueia de cobaias asmáticos pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (A) e na presença de  $10^{-7}$  (B), de  $3 \times 10^{-7}$  (C) e de  $10^{-6}$  M (D) de H-89.

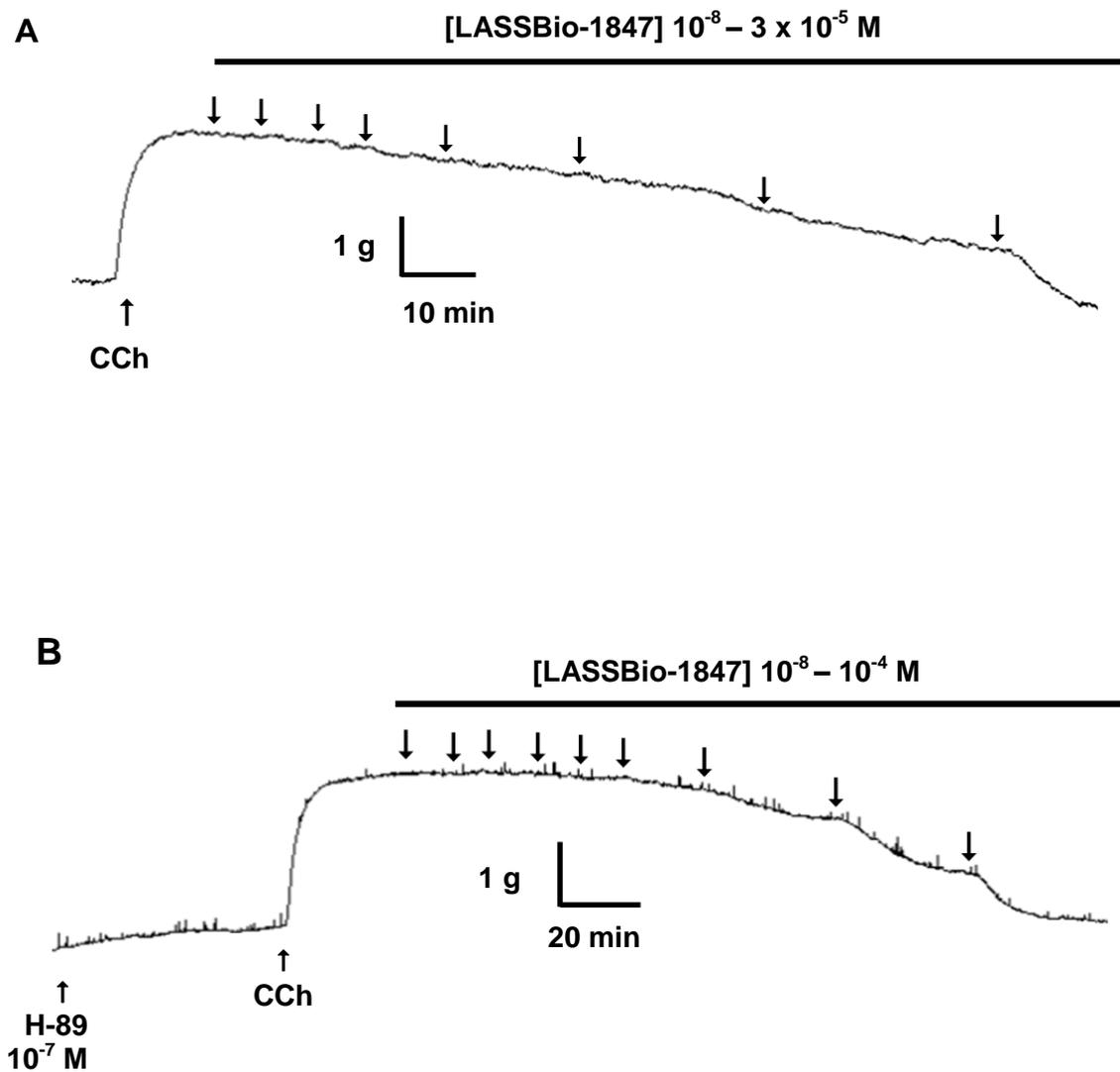
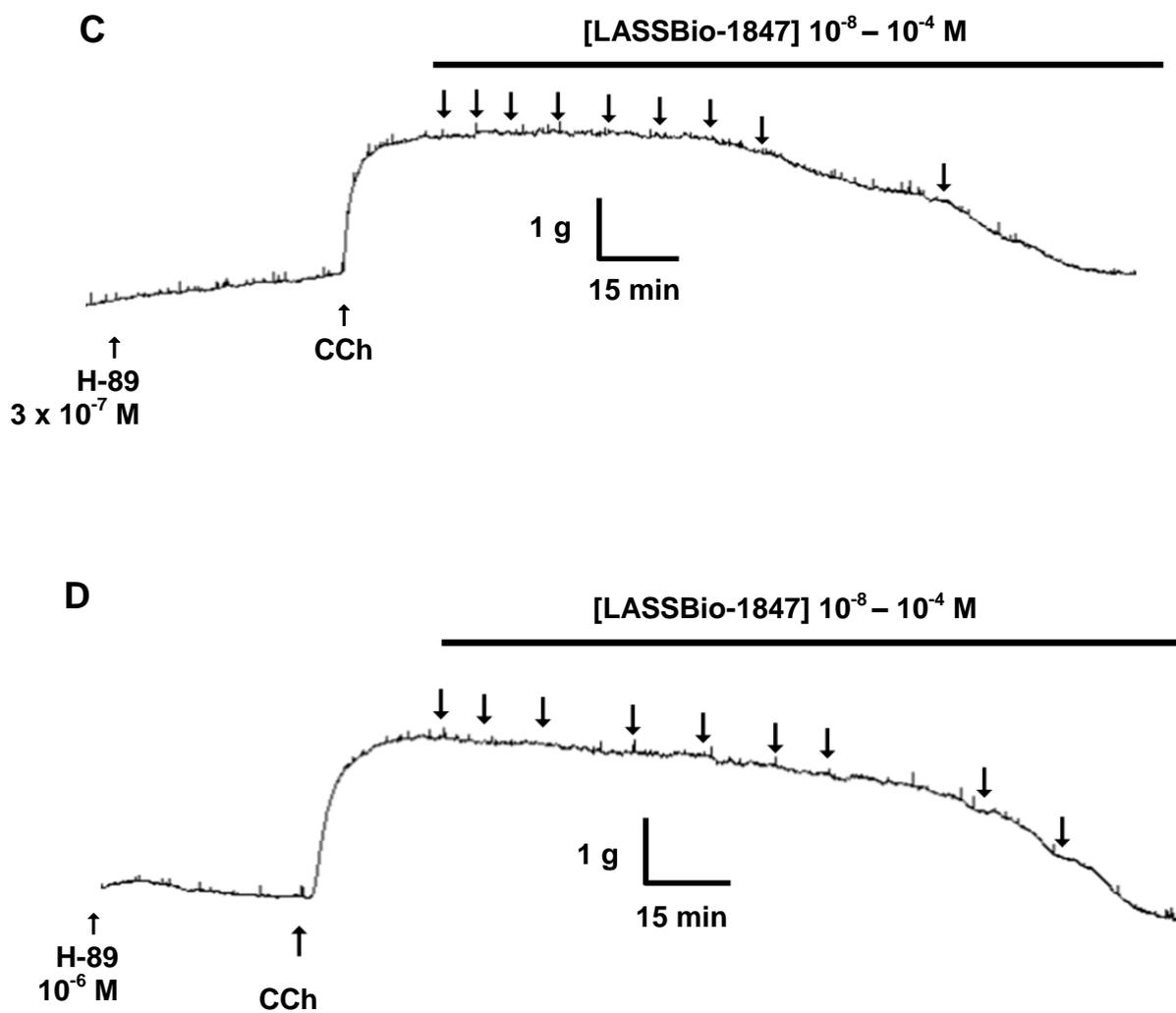


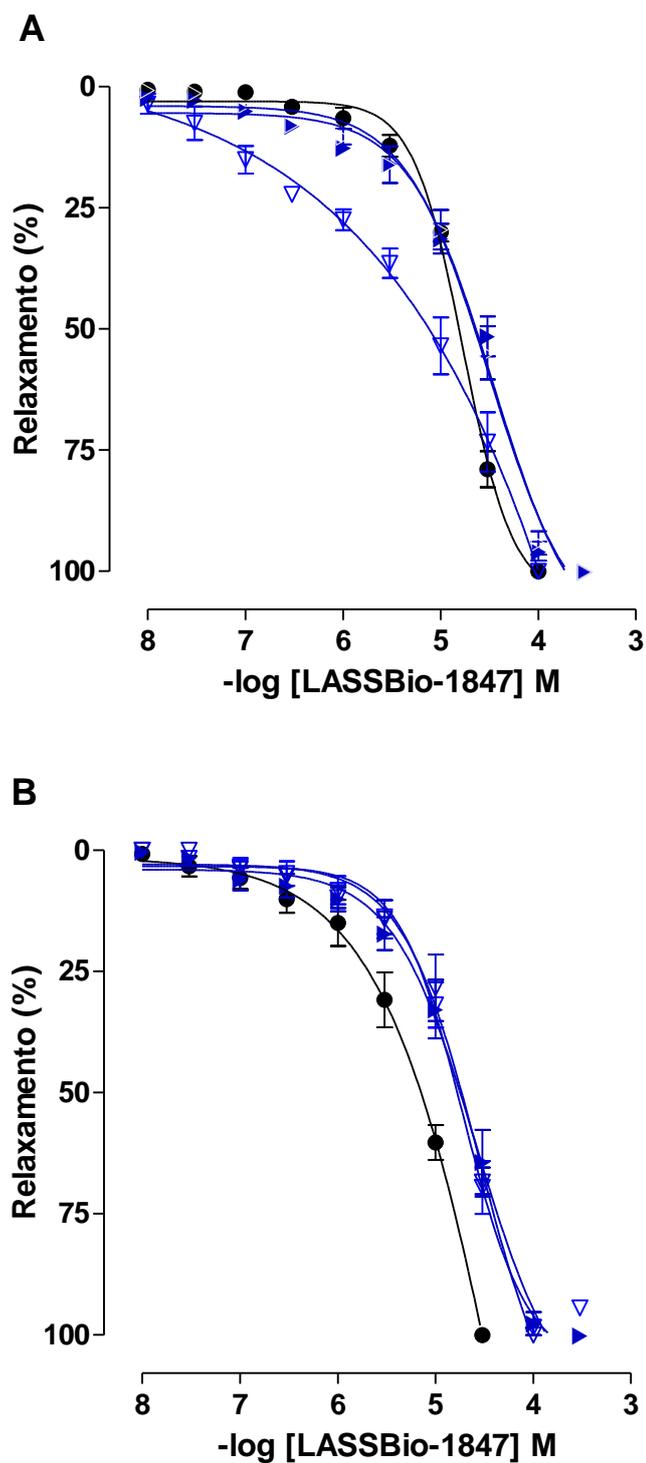
Figura 28 – Continuação



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

Fonte: Martins, 2016.

**Gráfico 25** – Efeito do LASSBio-1847 sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de CCh na ausência (●) e na presença de  $10^{-7}$  (▷),  $3 \times 10^{-7}$  (▶) e  $10^{-6}$  (▽) M de H-89 em anéis de traqueia de cobaias não asmáticas (A) e asmáticas (B).



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

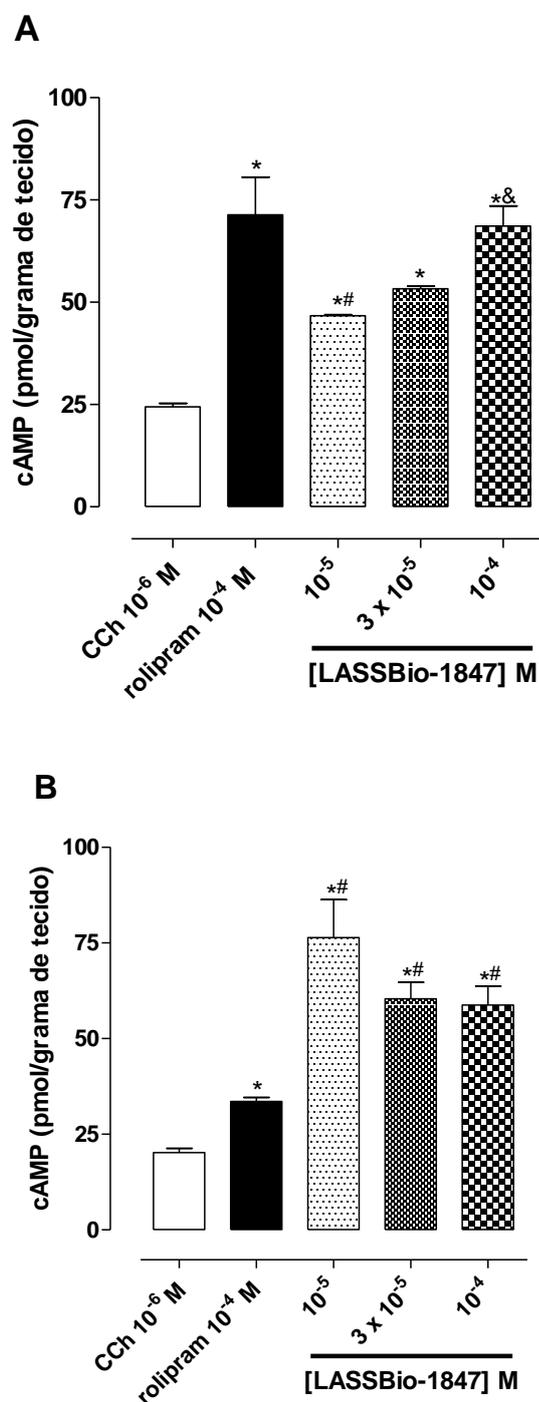
Fonte: Martins, 2016.

#### **5.3.2.4 Quantificação dos níveis teciduais de cAMP**

De acordo com o gráfico 26A, na dosagem dos níveis teciduais de cAMP pode-se constatar que, nos animais não asmáticos, a traqueia pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh apresentou  $24,4 \pm 0,9$  pmol/grama de tecido de cAMP e esse valor foi elevado significativamente para  $71,3 \pm 9,2$  pmol/grama de tecido de cAMP na presença de  $10^{-4}$  M de rolipram, um inibidor não seletivo das PDE4. Por sua vez, o LASSBio -1847 nas concentrações de  $10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M induziram um aumento significativo nos níveis teciduais de cAMP na traqueia pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh, com  $E_{max}$  de  $46,7 \pm 0,3$ ,  $53,3 \pm 0,6$  e  $68,6 \pm 4,9$  pmol/grama de tecido, respectivamente.

Nos anéis de traqueia de cobaias asmáticos, a concentração de  $10^{-4}$  M de rolipram elevou de maneira significativa os níveis de teciduais de cAMP de  $20,2 \pm 1,1$  no órgão somente pré-contraído com  $10^{-6}$  M de CCh para  $33,1 \pm 0,5$  pmol/grama de tecido. De maneira similar, o LASSBio-1847 nas concentrações de  $10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M levaram a um aumento significativo nos níveis teciduais de cAMP na traqueia pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh, com  $E_{max}$  de  $76,4 \pm 9,9$ ,  $60,4 \pm 4,3$  e  $58,7 \pm 6,4$  pmol/grama de tecido, respectivamente (Gráfico 26B).

**Gráfico 26** – Quantificação dos níveis teciduais de cAMP na traqueia de cobaias não asmáticas (A) e asmáticas (B) pré-contráida com  $10^{-6}$  M de CCh na ausência e presença de  $10^{-4}$  M de rolipram ou de  $10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M do LASSBio-1847.



Teste T: \* $p < 0,05$  (CCh vs. rolipram/LASSBio-1847); # $p < 0,05$  (rolipram vs. LASSBio-1847); & $p < 0,05$  ( $10^{-4}$  M de LASSBio vs.  $10^{-5}/3 \times 10^{-5}$  M de LASSBio-1847).

Fonte: Martins, 2016.

## **6 Discussão**

---

No presente estudo, implantou-se e padronizou-se um modelo de asma alérgica na espécie *Cavia porcellus* no Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas” (LFF), evidenciando-se alterações funcionais e histológicas inerentes ao quadro asmático, que demonstram a correta validação do modelo experimental escolhido. Posteriormente, realizou-se um estudo investigativo e comparativo a cerca de uma possível atividade relaxante dos derivados *N*-sulfonilidrazônicos LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851 em modelo funcional de músculo liso das vias aéreas de cobaias não asmáticos e asmáticos e, de maneira geral, os derivados apresentaram um efeito relaxante significativo e independente dos fatores derivados do epitélio em ambos os animais. Dentre esses, devido seus parâmetros de potência e eficácia farmacológicas, o LASSBio-1847 foi selecionado para a caracterização do mecanismo de ação, onde observou-se a participação dos receptores adrenérgicos- $\beta$ , possível ativação da AC, inibição das PDEs, o que elevou os níveis de cAMP teciduais levando a ativação da PKA e consequente relaxamento das vias aéreas.

A asma é uma doença respiratória clinicamente caracterizada por uma tendência excessiva para a obstrução reversível das vias aéreas. Isso pode surgir em resposta à exposição ambiental diária a alérgenos ou ainda ser agravada por infecções intercorrentes e, em pessoas sensibilizadas, por exposição ao alérgeno (GRAINGE et al., 2011). Essa doença é caracterizada pela inflamação das vias aéreas e por mudanças estruturais nos tecidos das vias respiratórias, como a hiperplasia epitelial de células caliciformes, deposição de colágeno subepitelial, hipertrofia e aumento da resposividade do músculo liso aéreo, além de alterações na microvasculatura pulmonar - coletivamente chamados de remodelamento das vias aéreas (FAHY, 2001; BECKETT; HOWARTH, 2003; HASHIMOTO; TANAKA; ABE, 2005).

O quadro asmático pode ainda induzir uma série de alterações morfológicas relacionadas à sua fisiopatologia, sendo essas mudanças demonstradas pela presença de muco nos pulmões, perda do epitélio ciliado respiratório, espessamento da membrana basal, infiltração de eosinófilos, edema e hipertrofia da camada muscular lisa, que coletivamente são denominadas de remodelamento das vias aéreas. Além disso, nesse remodelamento há modificações relacionadas aos vasos

presentes nas vias aéreas, onde esses se apresentam com espaço subepitelial reduzido sendo diretamente relacionado a gravidade da doença, aumento no calibre dos vasos como resultado da dilatação dos capilares, angiogênese, edema resultante do extravasamento microvascular e aumento da permeabilidade capilar (HARKNESS et al., 2014).

Dessa forma, a gama de processos relacionados a modificações patológicas que ocorre nas vias respiratórias de indivíduos asmáticos pode levar a respostas distintas para novos candidatos a drogas antiasmáticas, quando se compara a ação destes em modelos não asmáticos. Assim, a utilização de modelos animais que possuam um perfil asmático similar ao dos humanos, é de grande valia na tentativa de se obter respostas mais transponíveis ao homem.

Na literatura científica é vastamente relatado a utilização de modelos experimentais de asma que utilizam roedores, a exemplo de ratos e de camundongos. Os ratos apresentam muitas características da inflamação das vias aéreas e fisiologia pulmonar consistente com a asma alérgica em humanos (EIDELMAN; BELLOFIORE; MARTIN, 1988), no entanto esses animais exibem uma fraca resposta broncoconstritora e seus mastócitos liberam serotonina quando em excesso de histamina, assim configura-se como um modelo mais apropriado ao estudo da inflamação e imunologia que da resposta contrátil do músculo liso das vias aéreas. Os modelos de asma alérgica utilizando camundongos são os mais vastamente utilizados, e sua grande utilização é atribuída principalmente ao fato do sistema imunológico e do genoma desses animais ser muito bem caracterizado, o que permite manipulações das células imunes através de técnicas de engenharia genética, alvos farmacológicos ou transferência de subgrupos imunes (WRIGHT et al., 2013).

A utilização do cobaia (*Cavia porcellus*), um dos modelos animais mais antigos de resposta alérgica das vias aéreas com estudos datando de mais de 100 anos atrás (RICCIARDOLO et al., 2008), representa uma ferramenta de suma importância na descoberta de novas possibilidades terapêuticas na asma. O cobaia compartilha uma notável homologia com humanos em termos de anatomia e fisiopatologia das vias aéreas e pulmões, incluindo a liberação de histamina e leucotrienos pelos mastócitos e a presença de um perfil de resposta asmática imediata e outra tardia (WRIGHT et al., 2013). Ressalta-se ainda que os receptores farmacológicos nos

pulmões dos cobaias assemelham-se ao de humanos, o que explica a similaridade de resposta a exposição para a maioria das drogas (RESSMEYER et al., 2006).

De acordo com o exposto, para o objetivo deste estudo, o qual visa encontrar novos candidatos a fármacos antiasmáticos com ação relaxante sobre a musculatura lisa das vias aéreas, o modelo de asma em cobaias apresenta-se como o mais adequado, sendo assim selecionado para ser implantado e padronizado no Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas” (LFF). Após a realização do procedimento de indução da asma (Figura 12) e remoção dos pulmões dos animais, os mesmos foram analisados e constatou-se que, nos pulmões dos cobaias asmáticos, havia a presença de uma série de alterações morfológicas diretamente relacionadas ao quadro asmático, as quais acometiam não só a porção respiratória das vias aéreas, mas também a microvasculatura e a regiões circunvizinhas (Figura 14). Vale destacar, a presença do espessamento do músculo liso das vias aéreas, fato que pode ser relacionado a uma possível hiperplasia e/ou hipertrofia dessa musculatura, gerando um quadro característico da asma alérgica.

Dentre as modificações que acometem as vias aéreas dos pacientes asmáticos, merece destaque a hiperplasia e a hipertrofia da camada muscular lisa que envolve as vias aéreas, que pode contribuir para a gravidade do quadro asmático ao proporcionar uma maior capacidade contrátil ou diminuir os componentes que se opõe ao encurtamento das fibras musculares lisas (MORENO; HOGG; PARÉ, 1986; MCPARLAND; MACKLEM; PARÉ, 2003). O espessamento do músculo liso das vias aéreas em indivíduos asmáticos quando comparado a outros não asmáticos é extensamente relatado na literatura (DUNNILL, 1960; HEARD; HOSSAIN, 1973; HOGG; PARÉ, 1986; EBINA et al., 1990; MORENO; CARROLL et al., 1993; MCPARLAND; MACKLEM; PARÉ, 2003; JAMES et al., 2009; 2012) sendo relacionado à obstrução do fluxo aéreo nessas vias.

Além disso, também se identificou alterações nas arteríolas pulmonares no que diz respeito a irregularidades na túnica adventícia e uma vasodilatação, quando se compara a imagem do vaso obtido do animal não tratado na figura 14A. Essas modificações podem ser atribuídas ao quadro inflamatório existente na asma, onde pela presença de células imunes ou liberação crônica de mediadores inflamatórios, como a histamina, podem proporcionar as mudanças observadas. A presença de infiltrados de células inflamatórias, provavelmente eosinófilos e neutrófilos, fica bem

evidente tanto nas imagens relacionadas às vias aéreas como a relacionada a arteríola pulmonar dos animais submetidos a indução da asma, reforçando a presença do quadro inflamatório característico dessa doença. Os dados obtidos nessa etapa do estudo estão em consonância com a literatura científica da área (SMITH; BROADLEY, 2007; BAZÁN-PERKINS et al., 2009; EVANS et al., 2012; SHIROLE et al., 2014; WEI-XU et al., 2014) e indicam que a metodologia utilizada foi eficiente em induzir alterações morfológicas nas vias aéreas dos cobaias.

Embora tenha constatado que há mudanças estruturais inerentes à asma no aparato respiratório dos animais, não se sabia se essas modificações seriam traduzidas em diferenças funcionais na reatividade do músculo liso das vias aéreas. Nesse intuito, uma manobra clássica utilizada no presente trabalho foi a reação de Schultz-Dale, que ocorre quando um antígeno é capaz de induzir uma resposta contrátil em preparações de músculo liso proveniente de animais que tenham sido previamente sensibilizados a esse antígeno (SCHULTZ, 1910; DALE, 1913; CHAND; EYRE, 1978; BASTOS et al., 2009).

Essa reação pode ser utilizada como um parâmetro de hipersensibilidade imediata (CHAND; EYRE, 1978; FORSBERG; SÖRENBY, 1979), vários estudos apontam que a resposta contrátil observada na reação de Schultz-Dale é devido a ação coletiva e interação de vários agentes, como metabólitos do ácido araquidônico gerados pelos sistemas enzimáticos da 5-lipoxigenase (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) e da ciclo-oxigenase (prostaglandinas, endoperóxidos e tromboxanos) e, principalmente, pela liberação de histamina (ADAMS; LICHTENSTEIN, 1979; BURKA; PATERSON, 1980; 1981; HAND; SCHWALM; LEWIS, 1986).

Dessa maneira, a reação de Schultz-Dale pode ser utilizada para identificar se os animais foram devidamente imunizados ao antígeno, onde os anéis de traqueia ao serem expostos a 10 µg/mL de OVA devem apresentar uma contração imediatamente após a adição desse antígeno. E foi o que se observou, de acordo com a figura 15, onde a traqueia dos cobaias sensibilizados ao entrar em contato com a OVA, apresentou uma contração de magnitude semelhante a observada para o CCh, diferentemente do que foi obtido para os animais não sensibilizados, onde a adição da OVA não induziu qualquer efeito. Assim, através dos dados obtidos com a reação de Schultz-Dale fica comprovado que as alterações morfológicas

demonstradas pelo estudo histológico levaram a modificações funcionais, como a hiper-reatividade a OVA, nas vias aéreas dos cobaias sensibilizados.

Em seguida, uma vez observado que os cobaias submetidos ao processo de indução da asma alérgica apresentaram alterações morfofuncionais nas vias aéreas, decidiu-se analisar como seria o perfil de resposta do músculo liso aéreo desses animais à agonistas contráteis e relaxantes padrões. Inicialmente, decidiu-se avaliar o perfil contrátil da traqueia de cobaias tratadas e não tratadas em resposta ao CCh, um agonista muscarínico, e à histamina, um agonista histaminérgico. A escolha do agonista CCh deu-se pelo fato da inervação colinérgica ser a principal responsável pela manutenção do tônus das vias aéreas (OUEDRAOGO; ROUX, 2014) e a histamina ser um dos principais mediadores liberados durante os episódios de crises asmáticas (BARNES, 2008).

De acordo com os resultados obtidos (Gráficos 2 e 4), pode-se verificar que tanto os animais não asmáticos como os asmáticos apresentaram um perfil de resposta semelhante ao CCh, não havendo diferença significativa entre os parâmetros de potência e eficácia relativas, tanto na presença como na ausência do epitélio funcional, mostrando que a metodologia para indução da asma nos cobaias não alterou o aparato contrátil relacionado com a sinalização colinérgica. Quando o agonista utilizado foi a histamina observou-se uma equipotência contrátil, tanto na presença quanto na ausência do epitélio funcional. Interessantemente, quando se analisou a eficácia contrátil da histamina pode-se notar que nos animais asmáticos houve uma maior eficácia em relação aos não asmáticos, indicando que os animais tratados estariam, de alguma maneira, mais sensíveis à histamina. Esses achados estão em consonância com os relatos de Tsurikisawa et al., (2010) que mostraram que a hiper-reatividade das vias aéreas e a hipertrofia muscular observadas em pacientes asmáticos estavam relacionados à ação da histamina e não à ACh, devido a um possível aumento na expressão nos receptores  $H_1$  da histamina, mas não dos receptores  $M_3$  da ACh.

Dando continuidade ao processo de padronização do modelo de asma alérgica em cobaias, decidiu-se avaliar o efeito de agonistas relaxantes na traqueia dos animais não asmáticos e asmáticos, utilizando a isoprenalina, um agonista adrenérgico- $\beta$ , e a aminofilina, um inibidor não seletivo das PDEs. A partir dos resultados obtidos (Gráficos 6 e 7), pode-se observar que houve diferença estatística

significante na resposta à aminofilina na traqueia de cobaias não asmáticos na ausência de epitélio quando comparado à presença de epitélio nesses animais, bem como na presença e ausência de epitélio funcional dos animais asmáticos. Já na resposta à isoprenalina, não foi observada diferença estatística significativa nas potências e eficácias entre os grupos analisados. Quanto ao parâmetro de eficácia de ambos os agonistas relaxantes, constatou-se que não houve diferença estatística significativa dos grupos em questão.

Dessa maneira, pode-se observar que o aparato relaxante relacionado à via AC/cAMP/PKA permaneceu responsivo após a indução do modelo de asma nos cobaias, esses resultados corroboram os achados de Villanove et al. (1993) que mostraram que a sensibilização das vias aéreas humanas levou à uma redução da resposta relaxante dependente dos canais iônicos,  $Ca_v$  e de potássio, porém o aparato relaxante relacionado ao processo de ativação dos receptores adrenérgicos- $\beta$ , bem como a via de transdução relacionada ao acoplamento desses receptores, via AC/cAMP/PKA, permaneceu intacto e responsivo.

Diante dos resultados obtidos, têm-se evidências suficientes para afirmar que o modelo de asma em cobaias da espécie *Cavia porcellus* foi devidamente implantado e padronizado, sendo agora uma importante ferramenta para a descoberta de novas drogas com potencial ação antiasmática ou que venham a servir de ferramenta farmacológica para um melhor entendimento do quadro fisiopatológico dessa enfermidade.

Uma vez estabelecido o modelo de asma alérgica, partiu-se para a análise farmacológica de uma série de derivados sintéticos *N*-sulfonilidrazônicos inibidores da PDE4, com a finalidade de aprofundar os estudos acerca do potencial antiasmático desses compostos que possui como precursor o LASSBio-448, o qual demonstrou atividades relevantes relacionadas a ação inibidora da degranulação de mastócitos, inibidora da hiper-reatividade pulmonar murina e relaxante em traqueia de rato (MONTANA, 1998; CARDOZO, 2010; NUNES, 2013), no entanto devido a baixa potência apresentada por esse composto havia um comprometimento eventual de sua aplicação como candidato a fármaco, sugerindo a necessidade de otimização estrutural.

O interesse em se investigar substâncias com ação inibidora das PDEs reside no fato desta enzima ser a única família de enzimas capaz de degradar e

interromper a sinalização desencadeada pelo cAMP, um segundo mensageiro chave encontrado no meio intracelular, proporcionando assim um meio essencial de regulação dos níveis de cAMP. Nesse grupo de enzimas, destaca-se a família das PDE4, a qual é codificada por múltiplos genes, devido a sua ação seletiva sobre o cAMP e potencial utilização terapêutica de seus inibidores (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005).

Tendo em vista a vasta distribuição das isoformas de PDE4 no corpo humano, essas são descritas por participarem de importantes processos fisiológicos com efeitos sobre a cognição e comportamento (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005; KELLY; BRANDON, 2009; CHENG, et al., 2010), regulando a função das células inflamatórias e imunes (TORPHY, 1998; LOUKIDES et al., 2013), além de mediar o relaxamento dos miócitos das vias aéreas (BÄUMER et al., 2003; TRALAU-STEWART, et al., 2011). Dessa forma, a PDE4 configuram-se como um alvo terapêutico para drogas com potencial aplicação na depressão, na ansiedade, melhoramento da cognição, nas doenças de Alzheimer e Parkinson (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005; KELLY; BRANDON, 2009; CHENG et al., 2010), inflamação (TORPHY, 1998; LOUKIDES et al., 2013), inflamação pulmonar, DPOC e asma (BÄUMER et al., 2003; TRALAU-STEWART et al., 2011).

Recentemente, Medeiros (2015) evidenciou que alguns derivados *N*-sulfonilidrazônicos (LASSBio-1846, LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849 e LASSBio-1851) apresentaram efeito relaxante em traqueia de cobaia não asmático pré-contraída com CCh, sendo o LASSBio-1846 o de maior potência relaxante nesse modelo experimental. Visando dar continuidade a este estudo e traçar uma melhor relação entre os membros dessa série, avaliou-se a possível atividade relaxante do LASSBio-1624, LASSBio-1632 e LASSBio-1850, além do precursor LASSBio-448, no modelo funcional de músculo liso das vias aéreas de cobaia.

De acordo com os resultados obtidos, o LASSBio-1850 mostrou-se como uma exceção nessa série, uma vez que apresentou baixa eficácia farmacológica (< 50%). Por outro lado, pode-se constatar que os compostos LASSBio-448, LASSBio-1624 e LASSBio-1632 apresentaram efeito relaxante em traqueia de cobaia não asmático pré-contraída com CCh de maneira independente de epitélio funcional (Gráficos 8-11). Quando se comparam os valores de  $pD_2$  obtidos por Medeiros (2015) (Tabela 1) e os apresentados neste trabalho (Tabela 3), pode-se constatar que, em traqueia de

cobaia não asmático, o LASSBio-1846 e o LASSBio-1632 foram os derivados com maior potência relaxante dentre os demais componentes da série avaliada.

Em um estudo enzimático utilizando diferentes isoformas de PDE4 foi demonstrado que, de maneira geral, os derivados da série II apresentaram uma baixa atividade inibitória sobre essas enzimas, com exceção do LASSBio-1632 que as inibiu com valores semelhantes aos obtidos com o rolipram, inibidor utilizado como controle positivo (NUNES, 2013). Em nosso estudo funcional, o LASSBio-1632 apresentou uma potência relaxante similar à obtida com o LASSBio-1846 por Medeiros (2015), no entanto sendo necessário a utilização da concentração de  $3 \times 10^{-4}$  M para se obter 100% de relaxamento, enquanto que para o LASSBio-1846 foi utilizado a concentração de  $10^{-4}$  M. Dessa forma, mesmo esses dois derivados sendo equipotentes, o LASSBio-1846 mostrou-se como sendo o mais promissor da série investigada nos animais não asmáticos.

O fato de todos os derivados avaliados, com exceção do LASSBio-1850, terem apresentado bons parâmetros de potência e de eficácia relaxantes no modelo funcional de traqueia de cobaia não asmático, enquanto que somente o LASSBio-1632 destacou-se no estudo enzimático realizado por Nunes (2013) pode ser atribuído ao fato de que a atividade enzimática é medida *in vitro*, sob condições que, muitas vezes não se assemelham as *in vivo*. As condições escolhidas são geralmente um pH ótimo, concentrações saturadas de substrato, e a uma temperatura que é conveniente controlar (SCOPES, 2002). Mesmo com essas condições, as enzimas no meio tecidual íntegro sofrem modulação de componentes celulares, diferentemente do que ocorre quando essas estão isoladas. Dessa forma, pode-se constatar que provavelmente existem componentes no meio intracelular que, de alguma maneira, tenham favorecido a ligação ou interação dos derivados avaliados junto as PDE4, o que não havia acontecido nos estudos enzimáticos que utilizavam somente as enzimas isoladas.

Tendo em vista que neste trabalho implantou-se e padronizou-se um modelo funcional de asma alérgica em cobaias e que, até o momento, não havia nenhum dado na literatura sobre o efeito dos derivados *N*-sulfonilidrazônicos do LASSBio-448 neste modelo, decidiu-se avaliar uma possível ação relaxante do precursor da série, bem como dos seus derivados LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846,

LASSBio-1847, LASSBio-1848, LASSBio-1849, LASSBio-1850 e LASSBio-1851 com a finalidade de se comparar os achados obtidos nos dois modelos experimentais.

Conforme se pode constatar nos resultados obtidos, os derivados avaliados relaxaram a traqueia de cobaia asmático pré-contraída com CCh de maneira independente de epitélio funcional, onde todos os derivados apresentaram eficácia máxima (100%), ficando a exceção por parte do LASSBio-1850, que assim como nos animais não asmáticos, seu  $E_{max}$  não chegou a 50% de relaxamento (Gráficos 12-20). Quando se comparam os valores de  $pD_2$  dos derivados em cobaias asmáticas, observa-se que os LASSBio-1632, LASSBio-1846 e LASSBio-1847 foram os de maior potência relaxante e são equipotentes entre si (Tabela 4).

Nas vias aéreas, a modulação do tônus basal e a reatividade do músculo liso pode ocorrer por meio da liberação de fatores relaxantes derivados do epitélio (HASHIBA et al., 1999), tais como óxido nítrico (NO) (NIJKAMP et al., 1993) e prostaglandinas (FARMER et al., 1987). Assim, a priori, descarta-se a participação desses fatores no efeito relaxante dos derivados testados no músculo liso das vias aéreas de cobaias não asmáticos e asmáticos, uma vez que não foi observado diferença na potência farmacológica dos mesmos tanto na presença como na ausência do epitélio funcional.

Quando se comparam os resultados obtidos entre os dois grupos de animais, não asmáticos e asmáticos, observa-se alguns diferenças nos parâmetros de potência e eficácia dos compostos. O LASSBio-1849 que havia apresentado eficácia de  $70,9 \pm 3,3$  e de  $97,9 \pm 1,2\%$ , na presença e ausência de epitélio funcional, respectivamente, em animais não asmáticos (MEDEIROS, 2015), passou a apresentar uma eficácia máxima quando nas preparações dos animais asmáticos. Interessantemente, o LASSBio-1847 apresentou uma ganho de potência de 3,62 e de 4,41 vezes, na presença e ausência de epitélio funcional, respectivamente, nos animais asmáticos quando comparado a sua potência nos animais não sensibilizados. Os demais derivados (LASSBio-448, LASSBio-1624, LASSBio-1632, LASSBio-1846, LASSBio-1848, LASSBio-1850 e LASSBio-1851) não apresentaram alterações significantes nos parâmetros de potência e eficácia relaxantes entre os dois grupos de animais.

Quando se analisou todos os resultados obtidos até o momento, pode-se afirmar que o LASSBio-1850 foi o derivado que apresentou o pior perfil

farmacológico dentre todos os compostos testados, em ambas as situações experimentais, e uma possível explicação para isso pode residir em sua estrutura molecular (Figura 8), onde a presença de um radical trifluormetil (-CF<sub>3</sub>), grupamento fortemente retirador de elétrons, poderia estar proporcionando um efeito indutivo e dificultando ou impedindo a formação ou estabilização de ligações entre o LASSBio-1850 e as PDE4, não ocorrendo o reconhecimento da enzima e, por fim, resultou na baixa eficácia farmacológica observada.

Para que haja a ligação ao sítio ativo, os inibidores de PDE4 devem compartilhar duas características comuns: uma estrutura com anel planar que é mantida no interior do sítio por um par de resíduos hidrofóbicos e a formação de uma ou duas ligações de hidrogênio entre o inibidor e um resíduo de glutamina no sítio catalítico. Essa porção catalítica possui uma cavidade de, aproximadamente, 20 por 10 Å com 15 Å de profundidade, compreende 17 α-hélices e pode ser dividida em 3 subdomínios: uma região ligada a um metal bivalente, Zn<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, (sítio M), que forma um complexo com a porção fosfato do cAMP; uma região que contém uma glutamina (sítio Q), que forma uma ligação de hidrogênio com o nucleotídeo (purina) do cAMP e uma cavidade preenchida por moléculas de água (sítio S) (COLICELLI; KE, 2003; CARD, et al., 2004; HUAI; TRIPURANENI; AZAM, 2015).

Por sua vez, o LASSBio-1632, o LASSBio-1846 e o LASSBio-1847 foram os derivados a apresentar os perfis farmacológicos mais promissores, sendo os dois primeiros nos cobaias não asmáticos e os três equipotentes no modelo de asma. Observando-se suas estruturas químicas (Figura 8) nota-se a ausência de grupos retiradores fortes de elétrons, a exemplo do trifluormetil, e, provavelmente, a presença de metilas ou hidrogênios disponíveis esteja favorecendo o reconhecimento das PDE4 pelos derivados, conferindo aos mesmos uma destacada ação relaxante nos modelos funcionais de musculatura lisa das vias aéreas (JABARIS; PAL, 2008; NUNES, 2013; KODIMUTHALI; TRIPURANENI; AZAM, 2015).

Um estudo recente publicado por Azevedo e Kümmerle (2014), a partir de análises estruturais utilizando o *docking* molecular e o de co-cristais, foi elencado algumas características importantes que um inibidor ideal de PDE4 deve ter, estas são: 1) uma subunidade aromática que possa realizar interações  $\pi$ - $\pi$  *stacking* com resíduos de fenilalanina e interações hidrofóbicas com resíduos de isoleucina e

metionina; 2) possibilidade de atuar como acceptor de ligações de hidrogênio para interagir com a glutamina 369; 3) apresentar grupos hidrofóbicos ligados ao anel aromático que possam ser acomodados nos bolsões hidrofóbicos Q1 e Q2; 4) um grupo polar, ligado ao anel aromático por meio de espaçadores, que possa realizar interações eletrostáticas com os átomos do metal ou de ligações de hidrogênio com as águas presentes no subdomínio M; 5) apesar de não obrigatório, grupos polares também podem ser ligados ao anel aromático visando interações com o subdomínio de acesso ao solvente, que é rico em resíduos de aminoácidos polares, e desta forma podem auxiliar no aumento da hidrossolubilidade dos compostos (SRIVANI et al., 2008). Nesse sentido os derivados LASSBio-1632, LASSBio-1846 e LASSBio-1847 parecem suprir alguns dessas características, o que explicaria suas destacadas ações relaxantes.

Assim, este estudo apresenta três candidatos a fármacos promissores: o LASSBio-1632, o LASSBio-1846 e o LASSBio-1847. O primeiro mostrou-se equipotente em ambos os modelos utilizados, no entanto sendo necessário a utilização da concentração de  $3 \times 10^{-4}$  M para se alcançar o efeito máximo de relaxamento (Gráfico 18). O LASSBio-1846 apresentou potências farmacológicas similares entre os modelos não asmático e asmático, sendo preciso a concentração de  $3 \times 10^{-5}$  M para se obter o 100% de efeito máximo (Gráfico 19). Já no caso do LASSBio-1847 observou-se um ganho de potência em torno de quatro vezes nos experimentos com cobaias asmáticos em relação aos não asmáticos, além de também ter-se constatado um ganho na eficácia deste derivado pois o efeito máximo de relaxamento passou a ser obtido com a concentração de  $3 \times 10^{-5}$  M no caso dos animais sensibilizados, ao invés de  $10^{-4}$  M para os animais não tratados (Gráfico 20; Tabelas 1 e 4). Portanto, decidiu-se investigar o mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1847 em traqueia de cobaias não asmáticos e asmáticos, a fim de melhor caracterizar suas ações nesses dois modelos experimentais.

Nas vias aéreas, a cAMP é um regulador chave do tônus, sendo o principal efetor pró-relaxante no músculo liso dessas vias (BILLINGTON; HALL, 2012). O início clássico do processo da transdução de sinal que culmina com a elevação do conteúdo citosólico de cAMP dá-se pela ativação um GPCR acoplado à proteína  $G_s$ , e no músculo liso das vias aéreas o receptor majoritariamente envolvido nesse processo é o receptor adrenérgico- $\beta_2$ . Nos miócitos da traqueia, o subtipo de

receptor adrenérgico- $\beta$  mais expresso é o receptor adrenérgico- $\beta_2$  (MONTANO; BAZAN-PERKINS, 2005). Essa afirmação pode ser confirmada pelas seguintes observações: 1) As catecolaminas que produzem relaxamento do músculo liso das vias aéreas são classificados em potência como isoprenalina > adrenalina > noradrenalina (LANDS et al., 1967; NAGATOMO; KOIKE, 2000; TANAKA et al., 2005); 2) os receptores adrenérgicos- $\beta_2$  são ricamente expressos em músculo liso das vias aéreas, correspondendo a cerca de 70% dos receptores encontrados no corpo humano (CARSTAIRS; NIMMO; BARNES, 1985; BARNES, 1993; NIJKAMP, 1993; JOHNSON, 1998; NAGATOMO; KOIKE, 2000); 3) agonistas de receptores adrenérgicos- $\beta_2$  seletivos são amplamente utilizados para o tratamento de asma e relaxam de maneira efetiva o músculo liso (BRITTAİN et al., 1968; WALDECK, 2002; BILLINGTON; HALL, 2012). O efeito final decorrente da ativação de receptores adrenérgicos- $\beta_2$  leva a ativação da AC, conseqüente aumento nos níveis de cAMP e ativação da PKA, a proteína efetora, que atuará sobre uma série de alvos intracelulares culminando com a broncodilatação (TANAKA; HORINOUCI; KOIKE, 2005).

Levando em consideração a importância fisiológica dos receptores adrenérgicos- $\beta_2$  para a manutenção do tônus das vias aéreas e o fato de que Medeiros (2015) demonstrou que na investigação do mecanismo de ação relaxante do LASSBio-1846, a presença de um bloqueador dos receptores adrenérgicos- $\beta$ , houve uma redução na sua potência relaxante, o que sugere a modulação desses receptores, decidiu-se avaliar a participação desses receptores no mecanismo relaxante do LASSBio-1847, utilizando o propranolol, um bloqueador adrenérgico- $\beta$  não seletivo (BILOIKOVÁ; BAUER; KOLENA, 1987).

De acordo com o Gráfico 21A, nas preparações de traqueia de cobaia não asmático, na presença de  $3 \times 10^{-7}$ , de  $10^{-6}$  e de  $3 \times 10^{-6}$  M do propranolol houve modificações no efeito relaxante do LASSBio-1847 distintas, onde observou-se que na presença da concentração mais baixa não houve alteração na potência farmacológica do derivado, na presença concentração intermediária houve aumento da potência relaxante e na presença da maior concentração, constatou-se uma redução da ação relaxante do composto. Esses dados sugerem que o LASSBio-1847 não estaria atuando competitivamente no receptor adrenérgico- $\beta$ , mas sim, estaria de algum modo modulando-os alostericamente. Já nos resultados

obtidos com animais asmáticos, a presença de  $3 \times 10^{-7}$ , de  $10^{-6}$  e de  $3 \times 10^{-6}$  M do propranolol (Gráfico 21B) ocasionou uma redução na potência relaxante do LASSBio-1847, mostrando que nesses animais, o derivado estaria favorecendo a ativação dos receptores adrenérgicos- $\beta$ .

Ainda no sentido de se avaliar o envolvimento dos receptores adrenérgicos- $\beta$  no efeito relaxante do LASSBio-1847, levantou-se a hipótese de uma possível ação sinérgica entre a isoprenalina, um agonista dos receptores adrenérgicos- $\beta$ , e o derivado estudado. Caso fosse constatada uma potencialização do efeito relaxante da isoprenalina, a hipótese seria verdadeira e foi o que se observou nos animais não asmáticos. De acordo com o gráfico 22A, a isoprenalina apresentou um incremento de cerca de 5 vezes em sua potência relaxante quando na presença do derivado estudado, caracterizando a ação sinérgica entre as substâncias. Por outro lado, nos animais asmáticos, a pré-incubação do LASSBio-1847 atenuou o efeito relaxante da isoprenalina em cerca de 2 vezes, como se observa no gráfico 22B, reforçando a sugestão anterior de uma ação alostérica do LASSBio-1847 sobre o receptores adrenérgicos- $\beta$ . Esse resultado levanta a sugestão de que o quadro asmático pode induzir alterações na sinalização celular relacionada aos receptores adrenérgicos- $\beta$ , às PDEs e ao cAMP.

Na literatura científica já é bem documentado que a sinalização desencadeada pelo cAMP pode ser compartimentalizada em regiões subcelulares criando elevações distintas ou micro domínios desse segundo mensageiro no interior da célula (BUXTON; BRUNTON, 1983; JUREVICIUS; FISCHMEISTER, 1996; RICH et al., 2001; ZACCOLO; POZZAN, 2002; BARNES et al., 2005). Essa compartimentalização parece ser orquestrada pela proteína de ancoragem da cinase A (AKAP) (WILLOUGHBY et al., 2006; RICH et al., 2007; XIN et al., 2008) que coordena a localização de GPCRs, incluindo o adrenérgicos- $\beta_2$ , da ciclase de adenilil (AC), da PKA, das PDEs e das fosfatases garantindo a velocidade e fidelidade da via de sinalização do cAMP, além de limitar a propagação espacial dos sinais celulares desencadeados por este segundo mensageiro (HORVAT et al., 2012).

A expressão da AKAP é relatada em vários tecidos onde o cAMP possui papel fisiológico chave, como no coração (STANGHERLIN; ZACCOLO, 2011; MAUBAN et al., 2009), cérebro (SANDERSON; DELL'ACQUA, 2011), células T (TASKEN; RUPPELT, 2006) e músculo liso das vias aéreas (HORVAT et al., 2012),

inclusive sendo cogitada como um alvo terapêutico em potencial, dado a sua importância na regulação do aparato de sinalização desencadeado pela ativação da proteína  $G_s$ . Estudos de co-imunoprecipitação produziram evidências que as isoformas longas de PDE4 e de PKA podem estar complexadas com as AKAPs localizadas nas regiões perinuclear e perimembranar da célula limitando a ativação *downstream* dos alvos do cAMP (DODGE et al., 2001; TASKÉN et al., 2001; BAILLIE; HOUSLAY, 2005), sendo uma evidência direta que o complexo AKAP/PKA/PDE4 tem papel primordial na dinâmica dos níveis de cAMP em microdomínios na membrana plasmática em condições fisiológicas (HORVAT et al., 2012).

Além da AKAP, outros estudos apontam a existência de interações físicas e formação de microdomínios entre as PDE4 e diversas proteínas com funções de ancoragem, como a  $\beta$ -arrestina (PERRY, 2002), o receptor para a cinase C ativada 1 (RACK-1) (YARWOOD et al., 1999), a miomegalina (VERDE et al., 2001), a proteína similar ao elemento nuclear 1 (NDEL1) (COLLINS et al., 2008) e a espectrina (CREIGHTON et al., 2008). Diante desses fatos, a hipótese levantada nesse estudo é que o LASSBio-1847 ao ligar-se à PDE4 estaria manipulando a microrregião onde essa enzima se localiza, de maneira a modular positivamente o receptor adrenérgico- $\beta_2$  o que explicaria tanto as alterações na potência relaxante do composto na presença do propranolol como o ganho de potência do LASSBio-1847 nos experimentos em animais asmáticos.

Fisiologicamente, o conteúdo citosólico de cAMP, um importante segundo mensageiro relacionado diretamente com o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas, pode ser elevado pela ativação da AC, que é o principal efetor da sinalização dos receptores transmembranares acoplados a proteína  $G_s$ . Até o momento, nove isoformas foram identificadas (AC1 – 9) (PREMONT, 1994), sendo comprovada a expressão de quase todas as isoformas desta enzima no músculo liso das vias aéreas de humanos, ficando a exceção por parte das isoformas 3 e 8 (BILLINGTON et al., 1999; XU et al., 2001). As isoformas de AC estão sujeitas a múltiplas formas de regulação, no entanto a ativação desta, em condições fisiológicas, ocorre quase que exclusivamente pela subunidade  $\alpha$  da proteína  $G_s$  (TAUSSIG; ZIMMERMANN, 1998), que, por sua vez, é ativada via receptores adrenérgicos- $\beta_2$ .

Após esta ativação a AC irá realizar a conversão do ATP em cAMP, o qual irá desempenhar suas funções celulares de acordo com o estímulo que o gerou. Todas as isoformas desta enzima podem ser ativadas pela forskolina, um ativador direto (MANOLOPOULOS; SAMET; LELKES, 1995), que é um diterpeno do tipo labdano isolado de *Coleus forskohlii* (Laminaceae) (HANKS; HUNTER, 1995). Uma vez que a forskolina induz o relaxamento das vias aéreas pela ativação da AC, e consequente elevação do conteúdo citosólico de cAMP, decidiu-se investigar se o LASSBio-1847 poderia influenciar, direta ou indiretamente, essa etapa da formação do cAMP. Caso essa hipótese fosse verdadeira, seria observado um ganho de potência relaxante na curva de relaxamento concentração-resposta a forskolina e, interessantemente foi o que se observou tanto nos animais não asmáticos como nos asmáticos (Gráfico 23).

Nos experimentos executados com animais não asmáticos, a presença de  $3 \times 10^{-6}$  M de LASSBio-1847 deslocou a curva de relaxamento à forskolina para a esquerda, proporcionando um aumento na potência relaxante diterpeno de, aproximadamente, 54 vezes. Por sua vez, nas preparações de músculo liso das vias aéreas de animais asmáticos, a pré-incubação de  $10^{-6}$  M do derivado levou a uma maior potência do ativador de AC de cerca de 4 vezes. Esses achados mostram que o LASSBio-1847 pode estar favorecendo a ativação da AC ou da via *downstream* de relaxamento da AC ou, mais provavelmente, atuando sinergicamente ao inibir as PDE4 e favorecendo o acúmulo do cAMP produzido pela ativação da AC para assim promover seu efeito relaxante sobre a musculatura lisa traqueal de ambos os grupos de cobaias. Em estudo similar, utilizando a traqueia de cobaias não asmáticos, foi observado que o LASSBio-1846 foi capaz aumentar a potência relaxante da forskolina em cerca de 11 vezes, também sugerindo uma ação sinérgica entre esse derivado e o ativador da AC (MEDEIROS, 2015).

O cAMP é um segundo mensageiro que produz respostas biológicas rápidas e devido a isso é necessário que a célula tenha um mecanismo disponível que dissipe esse sinal tão rápido quanto seja exigido (BILLINGTON; HALL, 2012). Essa função é prontamente desempenhada pelos membros da família das PDEs, cuja importância só tem crescido desde a sua descoberta no início dos anos 1970 por UZUNOV e WEISS (1972). Até o momento, onze famílias distintas de PDEs foram identificadas, sendo cada uma destas constituída por múltiplos membros, e

destacando-se ainda as famílias 4, 7 e 8 por serem específicas para a degradação do cAMP (FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011).

Substâncias que tem a capacidade de aumentar o conteúdo intracelular de nucleotídeos cíclicos têm seu efeito relaxante potencializado por meio da inibição das PDEs nos mais variados tecidos, devido ao acúmulo do conteúdo de cAMP e/ou cGMP (BENDER; BEAVO, 2006; LUGNIER, 2006). Uma forma de investigar de maneira indireta a participação de nucleotídeos cíclicos, em nível funcional, no efeito relaxante de uma droga teste, é a utilização de inibidores de PDEs, como a aminofilina (JENNE, 1992; LIU et al., 2003). Dessa maneira, para verificar se o LASSBio-1847, um possível inibidor seletivo das PDE4, realmente teria uma ação inibitória sobre as essas enzimas, realizou-se um procedimento experimental na presença da aminofilina, um inibidor não seletivo das PDEs, onde se esperaria uma ação sinérgica e potencializadora da ação relaxante dessa última.

Essa hipótese provou-se verdadeira, uma vez que de acordo com o Gráfico 24A e B, a curva de relaxamento à aminofilina foi deslocada para a esquerda, na presença de  $3 \times 10^{-6}$  M ou de  $10^{-6}$  M de LASSBio-1847, nos animais não asmáticos e asmáticos, respectivamente. Esse deslocamento da curva de relaxamento pode ser traduzido como potencialização do efeito da aminofilina em torno de 147 e 4 vezes em animais não asmáticos e asmáticos, respectivamente, sugerindo que o efeito dessa molécula se dá por uma possível inibição de PDEs. Esses resultados corroboram o fato do LASSBio-1847 ter sido sintetizado como inibidor de PDE4, assim a ação sinérgica estaria dando-se pela inibição conjunta tanto da PDE4, por parte do derivado, como das demais isoformas de PDEs pela aminofilina. Em outro estudo semelhante, avaliou-se a capacidade de sinergismo do LASSBio-1846 junto a aminofilina e observou-se que, no músculo liso das vias aéreas de animais não asmáticos, o derivado aumentou a capacidade relaxante da aminofilina em cerca de 255 vezes (MEDEIROS, 2015), corroborando os achados descritos neste trabalho.

De acordo com relatos da literatura, é elencado o envolvimento de mais de cem mediadores no processo fisiopatológico inerente a asma, incluindo prostaglandinas, leucotrienos, quimiocinas, citocinas, proteases e fatores de crescimento, além de numerosos tipos celulares como mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e linfócitos (BARNES, 2006; HOLGATE, 2007; SPINA, 2008), o que sugere uma grande complexidade na estratégia para o

desenvolvimento de qualquer candidato a fármaco antiasmático, haja vista a gama de possibilidades de interações químicas ou físicas entre essa droga e os mediadores e células existentes na asma.

Além disso, Méhats et al. (2003) demonstraram o papel crucial da isoforma PDE4D no controle da contração do músculo liso das vias aéreas, em especial na transmissão colinérgica, enfatizando que possíveis mutações nessa PDE poderia refletir diretamente a atividade contrátil dessas vias. Por sua vez, estudos têm demonstrado que alterações no perfil de expressão e ou de resposta das PDE4 em pacientes asmáticos pode ocorrer, podendo ser evidenciado tanto enzimas com maior atividade ou *up-regulated* (CHAN et al., 1993, GANTNER et al., 1997), como também uma a atividade catalítica total aumentada das PDEs, apesar de se constatar uma atividade reduzida da PDE4 na asma moderada a grave (LANDELLS et al., 2000), evidenciando-se que na patogênese da asma ainda não se têm um padrão estabelecido para a expressão/funcionalidade das PDE4.

Vale ainda a pena salientar que, do ponto de vista molecular, a relação entre os domínios UCR1 e 2 da PDE4 pode se dar por uma interação eletrostática entre a porção C-terminal hidrofóbica do UCR1 e a porção N-terminal hidrofílica do UCR2, sendo essa interação crucial para que ocorra a fosforilação da porção UCR1 pela PKA, ocasionando alterações conformacionais que levam a ativação da PDE4 (BEARD, et al., 2000). Mutações no resíduo de serina 54 (S54), que é alvo da PKA, para um resíduo de aspartato ou glutamato, que são carregados negativamente, ou ainda mutações próximas ao resíduo de glutamato 53 (E53) podem mimetizar a ativação da PDE4 pela PKA (HOFFMANN et al. 1998), levantando a hipótese de que resíduos carregados negativamente são necessários para a interação iônica que regulam a atividade catalítica da enzima (McCAHILL et al., 2008). Além disso, a fosforilação da PKA no resíduo S54 também levou a um aumento da inibição da PDE4D3 pelo rolipram (ALVAREZ et al. 1995; HOFFMANN et al. 1998), permitindo afirmar que mutações em S54 e em E53, ou nas proximidades desses resíduos, levam a mudanças na configuração de cargas na porção UCR1, ocasionando alterações mensuráveis na atividade catalítica da enzima ou ainda modificando a sua interação com os seus inibidores (HOFFMANN et al. 1998).

Levando em considerações estas premissas e analisando-se os dados obtidos, foi possível constatar que a capacidade do LASSBio-1847 em potencializar

as respostas relaxantes da forskolina, um ativador da AC, e da aminofilina, um inibidor não seletivo das PDEs, foi menos pronunciada quando se utilizou cobaias asmáticos. A hipótese formulada para explicar essa observação foi que o modelo de alérgica asma em cobaias induziu alterações na expressão ou funcionalidade das PDE4 ou de proteínas responsáveis pela compartimentalização da sinalização celular desencadeada pelo cAMP, o que teria reduzido a capacidade de se obter um efeito relaxante sinérgico entre o LASSBio-1847 e as outras ferramentas utilizadas.

Nesse sentido, alguns estudos recentes têm apresentado dados que evidenciam alterações na expressão das PDE4 na asma. Trial et al. (2011) demonstraram que, em células proveniente das vias aéreas de pacientes asmáticos, a isoprenalina, um agonista dos receptores adrenérgicos- $\beta_2$ , apresenta uma redução em sua capacidade de elevar a  $[cAMP]_c$  devido ao aumento na expressão da isoforma PDE4D, sendo esse fenômeno relacionado ao processo de hiperplasia e hipertrofia ocasionado pelo remodelamento das vias aéreas na asma. Tang et al. (2005) evidenciaram que ratos sensibilizados com OVA apresentam um incremento na expressão nas PDE4, além de estas enzimas estarem mais ativas, havendo uma correlação entre essa maior atividade e o aumento na produção de interleucinas, a exemplo da IL-4.

Um dos paradigmas canônicos da sinalização celular é que a PKA é a principal molécula efetora na via de sinalização desencadeada pelo receptor adrenérgico- $\beta_2$ /AC/cAMP (MORGAN et al., 2014), sendo desta forma, um elemento chave no processo de relaxamento do músculo liso das vias aéreas. Como até o momento todos os indícios apontam para que o LASSBio-1847 esteja modulando esta via para levar ao relaxamento do músculo liso das vias respiratórias dos cobaias não asmáticos e asmáticos, decidiu-se avaliar o ação do derivado na presença do H-89, um inibidor da PKA (IRIÉ-N'GUESSAN et al., 2011; LOCHNER; MOOLMAN, 2006) e caso o LASSBio-1847 estivesse favorecendo a ativação da PKA, esperava-se observar que a curva de relaxamento fosse deslocada para a direita.

De acordo com o gráfico 25A e B, observou-se que na traqueia de cobaias não asmáticos pré-contraído com  $10^{-6}$  M de CCh, a presença de  $10^{-7}$  e de  $3 \times 10^{-7}$  M do H-89 levou a uma atenuação da curva de relaxamento do LASSBio-1847, fato que comprova que a PKA participa da via de sinalização ativada pelo derivado e,

paradoxalmente, a presença de  $10^{-6}$  M de H-89 levou a uma potencialização do efeito relaxante do LASSBio-1847. Já nos animais asmáticos, a curva de relaxamento do LASSBio-1847 em traqueia de cobaia pré-contraída com  $10^{-6}$  M de CCh foi deslocada para a direita na presença de  $10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$  e  $10^{-6}$  M de H-89 de maneira similar, evidenciando a participação da PKA no mecanismo relaxante do derivado. Dessa forma, os achados sugerem que o mecanismo de ação do LASSBio-1847 envolve a modulação positiva da PKA, através da inibição das PDEs, para assim levar ao relaxamento das vias aéreas em cobaia. No entanto, o fato do inibidor da PKA não ter abolido o efeito relaxante do composto avaliado em ambos os grupos de animais testados, pode ser indício de que outras vias ou outros passos da via AC/cAMP/PKA possam estar envolvidos.

O efeito aparentemente inesperado da concentração de  $10^{-6}$  M do H-89 nos animais não asmáticos, pode ser explicado por uma possível ligação do inibidor a algum sítio alostérico dos receptores muscarínicos (LAZARENO et al., 2000), havendo assim uma interação entre o inibidor e esse receptor que teria facilitado o relaxamento da preparação. Resultados semelhantes foram observados anteriormente por SPICUZZA e colaboradores (2001) ao utilizar o KT 5720, outro inibidor da PKA, que relataram uma interação cooperativa entre o inibidor utilizado e os receptores muscarínicos. Outro ponto a ser levantado é o fato do H-89 não ser uma ferramenta tão seletiva para a PKA, uma vez que é afirmado na literatura que esse inibidor, a depender da faixa de concentração utilizada, pode modular, pelo menos, outras oito cinases, a exemplo da MAPKAP-K1b, MSK1, SGK, ROCK II, AMPK, entre outras. Dessa forma, o uso do H-89, que é comercializado como um seletivo e potente inibidor da PKA (DAVIES et al., 2000), bem como a interpretação dos dados obtidos devem ser feitos de maneira cautelosa.

Até o momento, os dados obtidos nesse estudo evidenciaram que o LASSBio-1847 estaria modulando a via de sinalização dos receptores adrenérgicos- $\beta$ /AC/PDEs para assim elevar os níveis citosólicos de cAMP e, conseqüentemente, levar ao relaxamento do músculo liso das vias aéreas tanto de cobaias não asmáticas como dos asmáticos. Como forma de confirmar esses achados funcionais, foi realizado a quantificação tecidual de cAMP em ambos os grupos de animais. Conforme o gráfico 26A, observou-se que, nos cobaias não asmáticas, o LASSBio-1847 induziu um aumento significativo de cAMP nas

concentrações testada, sendo que na concentração de  $10^{-4}$  M, seu efeito foi similar ao obtido para  $10^{-4}$  M de rolipram, um inibidor seletivo das PDE4. Por sua vez, nos animais asmáticos, o produto-teste proporcionou um aumento na [cAMP]<sub>c</sub> significativa e equipotente entre as concentrações utilizadas, sendo esse efeito maior que o observado para  $10^{-4}$  M de rolipram, como evidenciado no gráfico 26B. Assim, esses achados reforçam a hipótese de que nos animais submetidos ao processo de indução de asma houve uma possível alteração na expressão, estrutura e/ou funcionalidade das PDE4, mas não pareceu comprometer a sinalização da via dos receptores adrenérgicos- $\beta$ /AC/cAMP, uma vez que os níveis de cAMP elevaram-se na presença do LASSBio-1847. Sendo ainda possível hipotetizar uma alteração na expressão ou funcionalidade dos  $Ca_v$  ou dos canais de potássio presentes nas vias aéreas asmáticas, como já sugerido por Villanove et al. (1993).

Estudos têm demonstrado que o desenvolvimento de uma única molécula bifuncional no tratamento da asma e de outras doenças que necessitam de uma associação de medicamentos, como por exemplo, a asma, a DPOC e as doenças autoimunes, a citar, a artrite reumatoide, para o alívio dos sintomas, pode ser interessante no sentido de que facilita a adesão e pode otimizar o tratamento desses pacientes. Além disso, diminui a probabilidade de interações medicamentosas que podem ocorrer com essa combinação terapêutica. No caso das desordens que acometem o trato respiratório, é muito comum se ter um tratamento baseado na combinação de agonistas adrenérgicos- $\beta_2$  com inibidores de PDE, onde ambos atuam por meio da modulação de cAMP (SELDON; MEJA; GIEMBYCZ, 2005; TANNHEIMER et al., 2012 a, b).

Tomados em conjunto, os resultados obtidos nesta etapa de caracterização do mecanismo de ação funcional do LASSBio-1847 nos levam a sugerir que este possa ser uma molécula bifuncional, atuando não apenas pela inibição das PDE4, mas também modulando positivamente os receptores adrenérgicos- $\beta_2$  ou a microrregião relacionada a sinalização do cAMP para assim, conjuntamente, levar ao aumento citosólico do cAMP, disparando toda a cascata de transdução inerente a este segundo mensageiro e culminando com o relaxamento das vias aéreas dos cobaias não asmáticos e asmáticos. Por fim, neste trabalho, ficou demonstrado pela primeira vez que o LASSBio-1847 se configura como uma molécula promissora para se dar prosseguimento aos estudos farmacológicos e, futuramente, ser utilizado

como uma ferramenta na terapêutica para desordens respiratórias ou como um arcabouço molecular no desenvolvimento de outras moléculas de interesse medicinal.

# ***7 Conclusões***

---

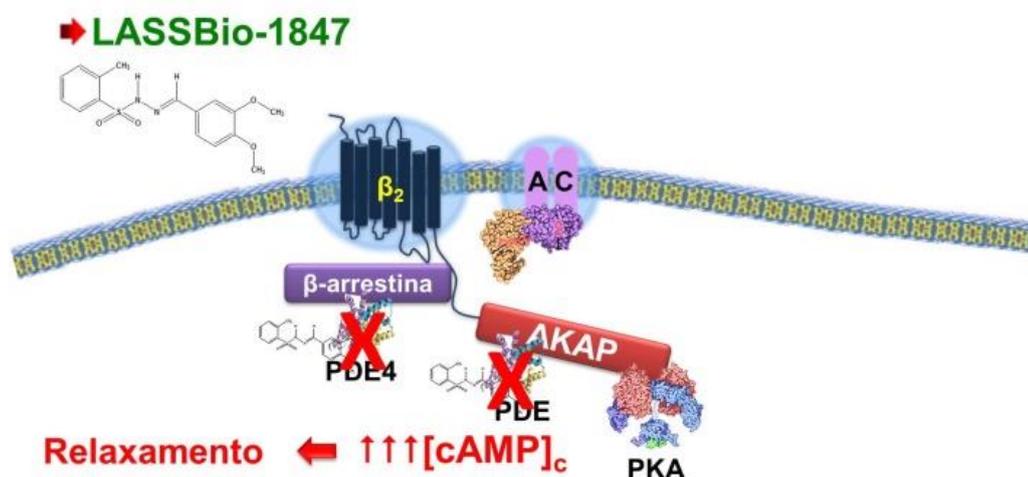


No presente estudo de realizou-se a implantação e padronização do modelo de asma alérgica em cobaias (*Cavia porcellus*) no Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas”, sendo esse modelo validado pela observação de alterações morfofuncionais características do quadro asmático através de análises histológicas, uma responsividade à OVA aumentada nos animais sensibilizados, além da observação de respostas concernentes à asma para agonistas contráteis e relaxantes.

Na etapa de investigação da atividade relaxante dos derivados *N*-sulfonilidrazônicos do LASSBio-448 em animais não asmáticos e asmáticos, constatou-se que os derivados, de maneira geral, apresentaram efeito relaxante tanto em ambos os grupos, sem exceção o LASSBio-1850 que mostrou uma eficácia baixa e destacando-se o LASSBio-1632, LASSBio-1846 e LASSBio-1847 por apresentar maior potência relaxante, sendo este último o único a apresentar incremento de potência entre os dois grupos estudados.

Na caracterização do mecanismo de ação do LASSBio-1847 em animais não asmáticos e asmáticos, observou-se que os fatores relaxantes derivados do epitélio traqueal não estão envolvidos, que há participação dos receptores adrenérgicos- $\beta$ , bem como a modulação positiva da via AC/PKA e inibição das PDEs, o que proporcionou uma elevação tecidual na  $[cAMP]_c$ .

**Figura 29** - Mapa conceitual do mecanismo de ação proposto para o LASSBio-1847 nas vias aéreas de cobaias não asmáticos e asmáticos.



Fonte: Martins, 2016.

# ***Referências***

---

---

ADAMS, G. K.; LICHTENSTEIN, L. In vitro studies of antigen-induced bronchospasm: effect of antihistamine and SRS-A antagonist on response of sensitized guinea pig and human airways to antigen. **The Journal of Immunology**, v. 122, n. 2, p. 555-562, 1979.

AIKAWA, T. S. H. M. T.; SHIMURA, S.; SASAKI, H.; EBINA, M.; TAKISHIMA, T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. **CHEST Journal**, v. 101, n. 4, p. 916-921, 1992.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5rd edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164 Suppl 1, p. S142-143, 2011.

ALFVÉN, T., BRAUN-FAHRLÄNDER, C., BRUNEKREEF, B., MUTIUS, E., RIEDLER, J., SCHEYNIUS, A.; PERSHAGEN, G. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle—the PARSIFAL study. **Allergy**, v. 61, n. 4, p. 414-421, 2006.

ALVAREZ, R.; SETTE, C.; YANG, D.; EGLIN, R. M.; WILHELM, R.; SHELTON, E. R.; CONTI, M. Activation and selective inhibition of a cyclic AMP-specific phosphodiesterase, PDE-4D3. **Molecular pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 616-622, 1995.

ARENA, R. Lifestyle modification interventions and cardiovascular health: global perspectives on worksite health and wellness and cardiac rehabilitation. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 56, n. 5, p. 473-475, 2014.

BAILLIE, G. S.; HOUSLAY, M. D. Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes. **Current opinion in cell biology**, v. 17, n. 2, p. 129-134, 2005.

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

BARNES, A. P.; LIVERA, G., HUANG, P.; SUN, C.; O'NEAL, W. K.; CONTI, M.; STUTTS, M. J.; MILGRAM, S. L. Phosphodiesterase 4D forms a cAMP diffusion barrier at the apical membrane of the airway epithelium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7997-8003, 2005.

BARNES, P. J. Novel signal transduction modulators for the treatment of airway diseases. **Pharmacology & therapeutics**, v. 109, n. 1, p. 238-245, 2006.

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

BARNES, P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews/Immunology**, v. 8, p. 183-192, 2008.

BARNES, P.J. Modulation of neurotransmission in airways. **Physiological Reviews**, v. 72, p. 699-729, 1992.

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

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. A química medicinal de N-acildrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e antitrombóticos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 129-148, 2002.

BARREIRO, E. J.; MANSSOUR, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Art Med Editora Ltda: Porto Alegre, p. 83-122, 2001.

BASTOS, V. P.; BRITO, T. S.; LIMA, F. J.; PINHO, J. P.; LAHLOU, S.; ABREU MATOS, F. J.; SANTOS, A.A.; CALDAS MAGALHÃES, P. J. Inhibitory effect of 1, 8-cineole on guinea-pig airway challenged with ovalbumin involves a preferential action on electromechanical coupling. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 11, p. 1120-1126, 2009.

BÄUMER, W.; GORR, G.; HOPPMANN, J.; EHINGER, A. M.; RUNDFELDT, C.; KIETZMANN, M. AWD 12–281, a highly selective phosphodiesterase 4 inhibitor, is effective in the prevention and treatment of inflammatory reactions in a model of allergic dermatitis. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1107-1114, 2003.

BAX, H. J.; KEEBLE, A. H.; GOULD, H. J. Cytokinergic IgE action in mast cell activation. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. 229, p. 1-16, 2012.

BAZÁN-PERKINS, B.; SÁNCHEZ-GUERRERO, E.; VARGAS, M. H.; MARTÍNEZ-CORDERO, E.; RAMOS-RAMÍREZ, P.; ÁLVAREZ-SANTOS, M.; HIRIAT, G.; GAXIOLA, M.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.  $\beta$ 1-integrins shedding in a guinea-pig model of chronic asthma with remodelled airways. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 5, p. 740-751, 2009.

BEAGLEHOLE R. **Preventing chronic diseases: a vital investment**. Geneva, World Health Organization, 2005.

BEARD, M. B.; OLSEN, A. E.; JONES, R. E.; ERDOGAN, S., HOUSLAY, M. D.; BOLGER, G. B. UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10349-10358, 2000.

BEASLEY, R.; PAGE, C.; LICHTENSTEIN, L. Airway remodelling in asthma. **Clinical & Experimental Allergy Reviews**, v. 2, n. 4, p. 109-116, 2002.

BECKETT, P. A.; HOWARTH, P. H. Pharmacotherapy and airway remodelling in asthma?. **Thorax**, v. 58, n. 2, p. 163-174, 2003.

BEL, E. H. Clinical phenotypes of asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.10, p. 44 –50, 2004.

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

BERGERON, C.; AL-RAMLII, W.; HAMID, Q. Remodeling in asthma. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 6, n. 3, p. 301-305, 2009.

BILLINGTON, C. K., HALL, I. P., MUNDELL, S. J., PARENT, J. L., PANETTIERI JR, R. A., BENOVIC, J. L.; PENN, R. B. Inflammatory and contractile agents sensitize specific adenylyl cyclase isoforms in human airway smooth muscle. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 21, n. 5, p. 597-606, 1999.

BILLINGTON, C. K.; HALL, I. P. Novel cAMP signalling paradigms: therapeutic implications for airway disease. **British journal of pharmacology**, v. 166, n. 2, p. 401-410, 2012.

BILLINGTON, C. K; OLUWASEUN O. O.; PENN R.B.; ITO S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 112-120, 2013.

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

BINGHAM, J.; SUDARSANAM, S.; SRINIVASAN, S. Profiling human phosphodiesterase genes and splice isoforms. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 350, n. 1, p. 25-32, 2006.

BLACK, J.; ARMOUR, C.; JOHNSON, P.; VINCENC, K. The calcium dependence of histamine, carbachol and potassium chloride-induced contraction in human airways in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 159-168, 1986.

BOLGER, G.; MICHAELI T, MARTINS T, ST JOHN T, STEINER B, RODGERS L, RIGGS M, WIGLER M, FERGUSON K. A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 10, p. 6558-6571, 1993.

BOULET, L. P.; LAVIOLETTE, M.; TURCOTTE, H.; CARTIER, A.; DUGAS, M.; MALO, J. L.; BOUTET, M. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. **CHEST Journal**, v. 112, n. 1, p. 45-52, 1997.

BOUSQUET J. Relating inflammatory changes in asthma to clinical status. **Respiratory Medicine**, v. 94, p. S32–S33, 2000.

BOUSQUET, J.; KHALTAEV, N. **Vigilância global, prevenção e controlo das doenças respiratórias crônicas: uma abordagem integradora**. Organização Mundial da Saúde, Portugal, 2007.

BRADDING P.; WALLS A.F.; HOLGATE S.T. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117,p. 1277–1284, 2006.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Doenças respiratórias crônicas** - Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação Hospitalar. Disponível em < [www2.datasus.gov.br/SIHD](http://www2.datasus.gov.br/SIHD)>. Acessado em: 29/08/2015 às 13:45'.

BRAUNSTEIN, G.; LABAT, C.; BRUNELLESCHI, S.; BENVENISTE, J.; MARSAC, J.; BRINK, C. Evidence that the histamine sensitivity and responsiveness of guinea-pig isolated trachea are modulated by epithelial prostaglandin E2 production. **British Journal of Pharmacology**, v.95, 300-308, 1988.

BRIGHTLING C.E.; BRADDING P.; SYMON F.A.; HOLGATE S.T.; WARDLAW A.J.; PAVORD I.D. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma 541. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 1699–1705, 2002.

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

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

BURKA, J. F.; PATERSON, N. A. M. A comparison of antigen-induced and calcium ionophore A23187 induced contraction of isolated guinea pig trachea. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 59, n. 10, p. 1031-1038, 1981.

BURKA, John F.; PATERSON, N. A. M. Evidence for lipoxygenase pathway involvement in allergic tracheal contraction. **Prostaglandins**, v. 19, n. 4, p. 499-515, 1980.

BUSH, A.; ZAR, H.J. WHO universal definition of severe asthma. **Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology**, v. 11, p. 115–121, 2011.

BUXTON, I. L.; BRUNTON, L. L. Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 17, p. 10233-10239, 1983.

CARAFOLI, E.; BRINI, M. **Calcium signalling and disease: molecular pathology of calcium**. [S.l.]: Springer, 2007.

CARD, G. L.; ENGLAND, B. P.; SUZUKI, Y.; FONG, D.; POWELL, B.; LEE, B.; LUU, C.; TABRIZIZAD, M.; GILLETTE, S.; IBRAHIM, P. N.; ARTIS, D. R.; BOLLAG, G.; MILBURN, M. V.; KIM, S. H.; SCHLESSINGER, J.; ZHANG, K. Y. Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases. **Structure**, v. 12, n. 12, p. 2233-2247, 2004.

CARDOZO, S. V. S. **Triagem e avaliação das propriedades antiasmáticas de novos derivados sulfonamídicos análogos do rolipram**. 2010. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal) - Instituto de Ciências Biomédicas; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CARROLL, N. J. A. A. et al. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v. 147, n. 2, p. 405-410, 1993.

CARROLL, N. J. A. A; ELLIOT, J.; MORTON, A.; JAMES, A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v. 147, n. 2, p. 405-410, 1993.

CARSTAIRS, J. R.; NIMMO, A. J.; BARNES, P. J. Autoradiographic Visualization of Beta-Adrenoceptor Subtypes in Human Lung 1–3. **American Review of Respiratory Disease**, v. 132, n. 3, p. 541-547, 1985.

CEDERVALL, P.; AULABAUGH, A.; GEOGHEGAN, K.F.; MCLELLAN, T.J.; PANDIT, J. Engineered stabilization and structural analysis of the autoinhibited conformation of PDE4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 12, p. 1414-1422, 2015.

CHAN, S. C.; REIFSNYDER, D.; BEAVO, J. A.; HANIFIN, J. M. Immunochemical characterization of the distinct monocyte cyclic AMP-phosphodiesterase from patients with atopic dermatitis. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 91, n. 6, p. 1179-1188, 1993.

CHAND, N.; EYRE, P. The Schultz-Dale reaction: a review. **Agents and actions**, v. 8, n. 3, p. 171-184, 1978.

CHENG, Y. F.; WANG, C.; LIN, H. B.; LI, Y. F.; HUANG, Y.; XU, J. P.; ZHANG, H. T. Inhibition of phosphodiesterase-4 reverses memory deficits produced by A $\beta$ 25–35 or A $\beta$ 1–40 peptide in rats. **Psychopharmacology**, v. 212, n. 2, p. 181-191, 2010.

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

CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. (Ed.). **Pharmacology and Therapeutics of Airway Disease**. CRC Press, Londres - UK, 2009.

COLLINS, D. M.; MURDOCH, H.; DUNLOP, A. J.; CHARYCH, E.; BAILLIE, G. S.; WANG, Q.; HERBERG, N.; BRANDON, N.; PRINZ, A.; HOUSLAY, M. D. NDEL1 alters its conformation by sequestering cAMP-specific phosphodiesterase-4D3 (PDE4D3) in a manner that is dynamically regulated through Protein Kinase A (PKA). **Cellular signalling**, v. 20, n. 12, p. 2356-2369, 2008.

CORREIA, A. C. C. **Estudo Comparativo da Atividade Espasmolítica de Óleos Essenciais de Espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopia frutescens* Aubl.** 2013. Tese

(Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

CREIGHTON, J.; ZHU, B.; ALEXEYEV, M.; STEVENS, T. Spectrin-anchored phosphodiesterase 4D4 restricts cAMP from disrupting microtubules and inducing endothelial cell gap formation. **Journal of cell science**, v. 121, n. 1, p. 110-119, 2008.

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

DALE, H. H. The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea-pig. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 4, n. 3, p. 167-223, 1913.

DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 521-525, 2004.

DAVIES, D. E. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 6, n. 8, p. 678-682, 2009.

DAVIES, S.; REDDY, H.; CAIVANO, M.; COHEN, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 351, p. 95-105, 2000.

DE AZEVEDO, L. L.; KÜMMERLE, A. E. Inibidores da PDE4: da Descoberta e Fracasso Anunciado ao seu Ressurgimento. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 465-494, 2014.

DE, S.; ZELAZNY, E. T.; SOUHRADA, J. F.; SOUHRADA, M. IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells. **Journal of Applied Physiology**, v. 78, n. 4, p. 1555-1563, 1995.

DENT, G.; GIEMBYCZ, M. A.; EVANS, P. M.; RABE, K. F.; BARNES, P. J. Suppression of human eosinophil respiratory burst and cyclic AMP hydrolysis by inhibitors of type IV phosphodiesterase: interaction with the beta adrenoceptor agonist albuterol. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 271, n. 3, p. 1167-1174, 1994.

DO AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A. Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 39-44, 2002.

DODGE, K. L.; KHOUANGSATHIENE S, KAPILOFF MS, MOUTON R, HILL EV, HOUSLAY MD, LANGEBERG LK, SCOTT JD. mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. **The EMBO journal**, v. 20, n. 8, p. 1921-1930, 2001.

DONATO, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1450, n. 3, p.191-231, 1999.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 7, p. 637-668, 2001.

DREWS A.C.; PIZZICHINI M.M.; PIZZICHINI E.; PEREIRA M.U.; PITREZ P.M.; JONES M.H.; SLY P.D.; STEIN R.T.. Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children. **Allergy**, v. 64, n. 11, p. 1597-1601, 2009.

DUNNILL, M. S. The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. **Journal of clinical pathology**, v. 13, n. 1, p. 27-33, 1960.

EBINA, M.; TAKAHASHI, T.; CHIBA, T.; MOTOMIYA, M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of ASM underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. **American Review of Respiratory Disease**, v. 148, p. 720-726, 1993.

DUTTA, K.; CARMODY, M. W.; CALA, S. E.; DAVIDOFF, A. J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p. 985-996, 2002.

EBINA, M.; YAEGASHI, H.; CHIBA, R.; TAKAHASHI, T.; MOTOMIYA, M.; TANEMURA, M. Hyperreactive site in the airway tree of asthmatic patients revealed by thickening of bronchial muscles: a morphometric study. **American Review of Respiratory Disease**, v. 141, n. 5, p. 1327-1332, 1990.

EIDELMAN, D. H.; BELLOFIORE, S.; MARTIN, J. G. Late airway responses to antigen challenge in sensitized inbred rats. **American Review of Respiratory Disease**, v. 137, n. 5, p. 1033-1037, 1988.

ELIAS, J. A.; ZHU, Z.; CHUPP, G.; HOMER, R. J. Airway remodeling in asthma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 8, p. 1001, 1999.

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

ESPINOZA, J.; MONTAÑO L. M.; PERUSQUÍA, M. Nongenomic bronchodilating action elicited by dehydroepiandrosterone (DHEA) in a guinea pig asthma model. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 138, p. 174-182, 2013.

EVANS, R.; NIALS, A.T.; KNOWLES, R.G.; KIDD, E.J.; FORD, W.R.; BROADLEY, K.J. A comparison of antiasthma drugs between acute and chronic ovalbumin-challenged guinea-pig models of asthma. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 453-464, 2012.

FAHLY, J. V. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 6, n. 3, p. 256-59, 2009.

FAHY J.V.; KIM K.W.; LIU J.; BOUSHEY H.A. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 95, n. 4, p. 843-852, 1995.

FAHY, J. V. Remodeling of the airway epithelium in asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 2, p. S46-S51, 2001.

FALCONE, F. H.; HAAS, H.; GIBBS, B. F. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4028-4038, 2000.

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

FORSBERG, K.; SÖRENBY, L. The guinea-pig lung strip: A study of the mediators of the Schultz-Dale reaction. **Agents and actions**, v. 9, n. 4, p. 364-368, 1979.

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.

FRIGAS, E.; GLEICH, G. J. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 77, n. 4, p. 527-537, 1986.

GANGUR V.; Birmingham N.P.; Thanavorakul S.; Joseph S. CCR3 and CXCR3 as drug targets for allergy: principles and potential. **Current Drug Targets-Inflammation & Allergy**, v. 2, n. 1, p. 53-62, 2003.

GANTNER, F.; GÖTZ, C.; GEKELER, V.; SCHUDT, C.; WENDEL, A.; HATZELMANN, A. Phosphodiesterase profile of human B lymphocytes from normal and atopic donors and the effects of PDE inhibition on B cell proliferation. **British journal of pharmacology**, v. 123, n. 6, p. 1031-1038, 1998.

GEHA R.S.; JABARA H.H.; BRODEUR S.R. The regulation of immunoglobulin E class switch recombination. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 721–732, 2003.

GIEMBYCZ, M. A.; CORRIGAN, C. J.; SEYBOLD, J.; NEWTON, R.; BARNES, P. J. Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4+ and CD8+ T-lymphocytes: role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2. **British journal of pharmacology**, v. 118, n. 8, p. 1945-1958, 1996.

GINA - Global Initiative For Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Disponível em < [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org) >. Acessado em: 29/08/2015 às 15:32'.

GOULD H.J.; SUTTON B.J.; BEAVIL A.J.; BEAVIL R.L.; McCLOSKEY N.; COKER H.A.; FEAR D.; SMURTHWAITE L. The biology of IGE and the basis of allergic disease. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 579–628, 2003.

GRAINGE, C.; LAU, L.C.K.; WARD J. A.; DULAY, V.; LAHIFF, G.; WILSON, S.; HOLGATE, S.; DAVIES, D.E.; HOWARTH, P.H. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 21, p. 2006-2015, 2011.

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

HAMMAD, H.; CHIEPPA, M.; PERROS, F.; WILLART, M. A.; GERMAIN, R. N.; LAMBRECHT, B. N. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. **Nature medicine**, v. 15, n. 4, p. 410-416, 2009.

HAND, J. M.; SCHWALM, S. F.; LEWIS, A. J. Antagonism of antigen-induced contraction of isolated guinea-pig trachea by 5-lipoxygenase inhibitors. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 79, n. 1, p. 8-13, 1986.

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

HARAGUCHI, M.; SHIMURA, S.; SHIRATO, K. Morphometric analysis of bronchial cartilage in chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 159, n. 3, p. 1005-1013, 1999.

HARKNESS, L. M.; KANABAR, V.; SHARMA H.S.; WESTEREGREN-THORSSON, G.; LARSSON-CALLERFELT A.K. Pulmonary vascular changes in asthma and COPD. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, p. 144-155, 2014.

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

HASHIMOTO, M.; TANAKA, H.; ABE, S. Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD. **CHEST Journal**, v. 127, n. 3, p. 965-972, 2005.

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

HEARD, B.E.; HOSSAIN, S. Hyperplasia of bronchial muscle in asthma. **The Journal of Pathology**, v. 110, n. 4, p. 319-331, 1973.

HEIJINK, I. H.; NAWIJN, M. C.; HACKETT, T.-L. Airway epithelial barrier function regulates the pathogenesis of allergic asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 44, n. 5, p. 620-630, 2014.

HEIZMANN, C.W. **Novel Calcium-Binding Proteins**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 65–99, 1991

HOFFMANN, R.; WILKINSON, I.; MCCALLUM, J.; ENGELS, P.; HOUSLAY, M. cAMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 mutants which mimic activation and changes in rolipram inhibition triggered by protein kinase A phosphorylation of Ser-54: generation of a molecular model. **Biochem. J**, v. 333, p. 139-149, 1998.

HOLGATE S.T.; DAVIES D.E.; POWELL R.M.; HOWARTH P.H.; HAITCHI H.M.; HOLLOWAY J.W. Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. **European Respiratory Journal**, v. 29, p. 793–803, 2007.

HOLGATE, S. T. Epithelium dysfunction in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 6, p. 1233-1244, 2007.

HOLGATE, S.T. Pathogenesis of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, p. 872–897, 2008.

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

HOMER, R.J.; ELIAS, J.A. Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms. **Physiology**, v. 20, n. 1, p. 28-35, 2005.

HORVAT, S. J.; DESHPANDE, D. A.; YAN, H.; PANETTIERI, R. A.; CODINA, J.; DUBOSE, T. D.; WENKUAN, X.; RICH, T. C.; PENN, R. B. A-kinase anchoring proteins regulate compartmentalized cAMP signaling in airway smooth muscle. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 9, p. 3670-3679, 2012.

HOUSLAY, M. D.; BAILLIE, G. S.; MAURICE, D. H. cAMP-Specific Phosphodiesterase-4 Enzymes in the Cardiovascular System A Molecular Toolbox for Generating Compartmentalized cAMP Signaling. **Circulation research**, v. 100, n. 7, p. 950-966, 2007.

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

HOUSLAY, M. D.; SCHAFER, P.; ZHANG, K. Y. J. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. **Drug discovery today**, v. 10, n. 22, p. 1503-1519, 2005.

HOUSLAY, M.; ADAMS, D. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 1-18, 2003.

HOUSLAY, M.D. PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 69, p. 249-315, 2001.

HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. 2a ed. **Histological Techniques for Marine Bivalve Molluscs and Crustaceans**. p. 218, 2004.

HUAI, Q.; COLICELLI, J.; KE, H. The crystal structure of AMP-bound PDE4 suggests a mechanism for phosphodiesterase catalysis. **Biochemistry**, v. 42, n. 45, p. 13220-13226, 2003.

HUAI, Q.; WANG, H.; SUN, Y.; KIM, H. Y.; LIU, Y.; KE, H. Three-dimensional structures of PDE4D in complex with roliprams and implication on inhibitor selectivity. **Structure**, v. 11, n. 7, p. 865-873, 2003.

HUMBERT, M.; KAY, A. B. Chronic inflammation in asthma. **EUROPEAN RESPIRATORY MONOGRAPH**, v. 8, p. 126-137, 2003.

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

ITO, Y.; TAKAGI, K.; TOMITA, T. Relaxant actions of isoprenaline on guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v.116, 2738-2742, 1995.

JAMES, A.L.; BAI, T.R.; MAUAD, T.; ABRAMSON, M.J.; DOLHNIKOFF, M.; MCKAY K.O.; MAXWELL P.S.; ELLIOT, J.G.; GREEN, F.H. Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. **European Respiratory Journal**, v. 34, n. 5, p. 1040-1045, 2009.

JAMES, A.L.; ELLIOT, J. G.; JONES, R. L.; CARROLL, M. L.; MAUAD, T.; BAI, T. R.; ABRAMSON, M. J.; MCKAY, K. O.; GREEN, F. H. Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 185, n. 10, p. 1058-1064, 2012.

JAMES, A. L.; MAXWELL, P. S.; PEARCE-PINTO, G.; ELLIOT, J. G.; CARROLL, N. G. The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 166, n. 12, p. 1590-1595, 2002.

JANSSEN, L. J; KILLIAN, K., 2006. Airway smooth muscle as a target of asthma therapy: history and new directions. **Respiratory Research**, v. 7, p. 123, 2006.

LOTVALL J.; CEZMI A. A.; LEONARD B. B.; LEIF B.; THOMAS B. C.; ADNAN C.; ROBERT F. L.; ANDREW J. W.; SALLY E. W.; PAUL A. Greenberger. Asthma

endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, p. 355 – 360, 2011.

JATAKANON, A. N. O. N.; LIM, S. A. M.; BARNES, P. J. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 161, n. 1, p. 64-72, 2000.

JEFFERY, P .K.; WARDLAW, A. J.; NELSON, F. C.; COLLINS, J. V.; KAY, A. B. Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. **American Review of Respiratory Disease**, v. 140, n. 6, p. 1745-1753, 1989.

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

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

JUREVICIUS, J.; FISCHMEISTER, R. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels by beta-adrenergic agonists. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 1, p. 295-299, 1996.

KARJALAINEN J.; Hulkkonen J.; NIEMINEN M.M.; HUHTALA H.; AROMAA A.; KIAUKKA T.; HURME M. Interleukin-10 gene promoter region polymorphism is associated with eosinophil count and circulating immunoglobulin E in adult asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 33, p. 78–83, 2003.

KARPOVA, A. Y.; ABE, M. K.; LI J.; LIU, P. T.; RHEE, J. M.; KUO, W. L.; HERSHENSON, M. B. MEK1 is required for PDGF-induced ERK activation and DNA synthesis in tracheal myocytes. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 272, n. 3, p. L558-L565, 1997.

KAY A.B. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. ***Trends in Molecular Medicine***, v. 11, p. 148–152, 2005.

KAZI, A. S.; LOTFI, S.; GONCHAROVA, E. A.; TLIBA, O.; AMRANI, Y.; KRYMSKAYA, V. P.; LAZAAR, A. L. Vascular endothelial growth factor-induced secretion of fibronectin is ERK dependent. ***American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology***, v. 286, n. 3, p. L539-L545, 2004.

KE, H. Implications of PDE4 structure on inhibitor selectivity across PDE families. ***International journal of impotence research***, v. 16, p. S24-S27, 2004.

KELLY, M. P.; BRANDON, N. J. Differential function of phosphodiesterase families in the brain: gaining insights through the use of genetically modified animals. ***Progress in brain research***, v. 179, p. 67-73, 2009.

KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. ***British journal of pharmacology***, v. 165, n. 5, p. 1288-1305, 2012.

KNOX, A. J. et al. Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up-regulation by bradykinin via a protein kinase C and prostanoid-dependent mechanism. ***The FASEB Journal***, v. 15, n. 13, p. 2480-2488, 2001.

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.

KROEGEL, C.; VIRCHOW, J. C.; LUTTMANN, W.; WALKER, C.; WARNER, J. A. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). ***European Respiratory Journal***, v. 7, n. 3, p. 519-543, 1994.

KRYMSKAYA, V. P.; ORSINI, M. J.; ESZTERHAS, A.J.; BRODBECK, K. C.; BENOVIC, J. L.; PANETTIERI, R. A. JR.; PENN, R. B. Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor activation in human airway smooth muscle. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 546-554, 2000.

KRYMSKAYA, V. P.; PENN, R. B.; ORSINI, M. J.; SCOTT, P. H.; PLEVIN, R. J.; WALKER, T. R.; ESZTERHAS, A.J.; AMRANI, Y.; CHILVERS, E. R.; PANETTIERI, R. A. JR. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates mitogen-induced human airway smooth muscle cell proliferation. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 277, n. 1, p. L65-L78, 1999.

KUDO, M.; ISHIGATSUBO, Y.; AOKI, I. Pathology of asthma. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-16, 2013.

LAITINEN, L. A.; HEINO, M.; LAITINEN, A.; KAVA, T.; HAAHTELA, T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with Asthma 1–3. **American Review of Respiratory Disease**, v. 131, n. 4, p. 599-606, 1985.

LAMBRECHT B.N.; HAMMAD H. Lung dendritic cells: targets for therapy in allergic disease. **The Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 188, p. 99–114, 2009.

LAMBRECHT B.N.; SALOMON B.; KLATZMANN D.; PAUWELS R.A. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 4090–4097, 1998.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The airway epithelium in asthma. **Nature medicine**, v. 18, n. 5, p. 684-692, 2012.

LAMBRECHT, B.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature**, v. 16, p. 45-56, 2015.

LANDELLS, L. J.; SZILAGY, C. M.; JONES, N. A.; BANNER, K. H.; ALLEN, J. M.; DOHERTY, A.; PAGE, C. P. Identification and quantification of phosphodiesterase 4 subtypes in CD4 and CD8 lymphocytes from healthy and asthmatic subjects. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 5, p. 722-729, 2001.

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

LAW, M.; MORRIS, J. K.; WALD, N.; LUCZYNSKA, C.; BURNEY, P. L. Changes in atopy over a quarter of a century, based on cross sectional data at three time periods. **British Medical Journal**, v. 330, p. 1187-1188, 2005.

LAZAAR, A. L.; PANETTIERI, R. A. Jr. Airway smooth muscle: a modulator of airway remodeling in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 3, p. 488-495, 2005.

LAZARENO, S.; POPHAM, A.; BIRDSALL, Nigel JM. Allosteric Interactions of Staurosporine and Other Indolocarbazoles with N-[methyl-3H] Scopolamine and Acetylcholine at Muscarinic Receptor Subtypes: Identification of a Second Allosteric Site. **Molecular pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 194-207, 2000.

LE GROS, G.; BEN-SASSON, S. Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F. D.; PAUL, W. E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 172, n. 3, p. 921-929, 1990.

LEE, H. J.; JEONG, H. S.; KIM, D. J.; NOH, Y. H.; YUK, D. Y. ; HONG, J. T. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-kappa B activation in RAW264.7 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v.31, p.342-349, 2008.

LI, X. U. N.; WILSON, J. W. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 1, p. 229-233, 1997.

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

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

LIU, X.S.; XU, Y.J.; ZHANG, Z.X.; LI, C.Q.; YANG, D.L.; ZHANG, N. ; NI, W. Isoprenaline and aminophylline relax bronchial smooth muscle by cAMP-induced stimulation of large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24(5), p.408-414, 2003.

LOCHNER, A.; MOOLMAN, J. A. The many faces of H89: a review. **Cardiovascular drug reviews**, v. 24, n. 3-4, p. 261-274, 2006.

LORDAN, J. L.; BUCCHIERI, F.; RICHTER, A.; KONSTANTINIDIS, A.; HOLLOWAY, J. W.; THORNER, M.; PUDDICOMBE, S. H.; BUCHANAN, D., WILSON, S. J.; DJUKANOVIĆ, R.; HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. Cooperative effects of Th2 cytokines and allergen on normal and asthmatic bronchial epithelial cells. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 1, p. 407-414, 2002.

LOUKIDES, S.; BARTZIOKAS, K.; VESTBO, J.; SINGH, D. Novel anti-inflammatory agents in COPD: targeting lung and systemic inflammation. **Current drug targets**, v. 14, n. 2, p. 235-245, 2013.

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.

MA, J.; PAN, Z. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 375-384, 2003.

MACFARLANE A.J.; KON O.M.; SMITH S.J.; ZEIBECOGLOU K.; KHAN L.N.; BARATA L.T.; McEUEEN A.R.; BUCKLEY M.G.; WALLS A.F.; MENG Q.; HUMBERT M.; BARNES N.C.; ROBINSON D.S.; YING S.; KAY A.B. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 105, p. 99–107, 2000.

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

MARCHMONT, R. J.; HOUSLAY, M. D. Insulin triggers cyclic AMP-dependent activation and phosphorylation of a plasma membrane cyclic AMP phosphodiesterase. **Nature**, v. 286, p.904 – 906, 1980.

MARSICO, S. A.; PELAIA, G.; GREMBIALE, R.D.; PUGLIESE, C.; CELLAMARE, P. Calcium ions and airway smooth muscle contraction. In: Olivieri D, Bianco S, editors. Airway obstruction and inflammation. **Progress in respiration research**, v. 24, p. 26-34, 1990.

MASOLI M et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. **Allergy**, v. 59, p. 469-478, 2004.

MATSUKURA, S.; STELLATO, C.; GEORAS, S. N.; CASOLARO, V.; PLITT, J. R.; MIURA, K.; KUROSAWA, S.; SCHINDLER, U.; SCHLEIMER, R. P. Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24, n. 6, p. 755-761, 2001.

MAUBAN, J. R. H.; O'DONNELL, M.; WARRIER, S.; MANNI, S.; BOND, M. AKAP-scaffolding proteins and regulation of cardiac physiology. **Physiology**, v. 24, n. 2, p. 78-87, 2009.

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.

McCAHILL, A. C.; HUSTON, E.; LI, X.; HOUSLAY, M.D. PDE4 associates with different scaffolding proteins: modulating interactions as treatment for certain diseases. In: **Protein-Protein Interactions as New Drug Targets**. Springer Berlin Heidelberg, p. 125-166, 2008.

McKAY, S.; JONGSTE, J. C.; SAXENA, P. R.; SHARMA, H. S. Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cells: expression of transcription factors and transforming growth factor- $\beta$ 1. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 18, n. 6, p. 823-833, 1998.

MCPARLAND, B.E.; MACKLEM, P.T.; PARÉ, P.D. Airway wall remodeling: friend or foe? **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 1, p. 426-434, 2003.

MEDEIROS, M. M. **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) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MÉHATS, C.; JIN, S. L. C.; WAHLSTROM, J.; LAW, E.; UMETSU, D. T.; CONTI, M. PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 13, p. 1831-1841, 2003.

MONTANA, J. G.; BUCKLEY, G. M.; COOPER, N.; DYKE, H. J.; GOWERS, L.; GREGORY, J. P.; HELLEWELL, P. G.; KENDALL, H. J.; LOWE, C.; MAXEY, R.;

MIOTLA, J.; NAYLOR, R. J.; RUNCIE, K. A.; TULADHAR, B.; WARNECK, J. B. H., Aryl sulfonamides as selective PDE4 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 2635-2640, 1998.

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

MONTEFORT, S.; ROBERTS, J. A.; BEASLEY, R.; HOLGATE, S. T.; ROCHE, W. R. The site of disruption of the bronchial epithelium in asthmatic and non-asthmatic subjects. **Thorax**, v. 47, n. 7, p. 499-503, 1992.

MONTEIRO, F.S. **Ação relaxante da fração de alcaloides totais obtida de *Solanum paludosum* Moric. envolve modulação positiva da via do óxido nítrico e dos canais de  $K^+$  em íleo de cobaia e aorta de rato**. 2013. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MOORE W. C.; BLEECKER E. R.; CURRAN-EVERETT D.; ERZURUM S. C.; AMEREDES B. T.; BACHARIER L.; CALHOUN W. J.; CASTRO M.; CHUNG K. F.; CLARK M. P.; et. al. National Heart, Lung, Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v.119, p. 405–413, 2007.

MORENO, R.H.; HOGG, J.C.; PARÉ, P.D. Mechanics of Airway Narrowing. **American Review of Respiratory Disease**, v. 133, n. 6, p. 1171-1180, 1986.

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

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MOTOJIMA S.; FRIGAS E.; LOEGERING D. A.; GLEICH G. J. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. **American Review of Respiratory Disease**, v. 139, n. 3, p. 801-805, 1989.

MURDOCH J.R.; LLOYD C.M. Chronic inflammation and asthma. **Mutation Research**, v.690, p.24–39, 2010.

MURRAY, R. K.; FLEISCHMANN, B. K.; KOTLIKOFF, M. I. Receptor-activated Ca influx in human airway smooth muscle: use of Ca imaging and perforated patch-clamp techniques. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 264, n. 2, p. C485-C490, 1993.

MURRAY, R. K.; KOTLIKOFF, M. I. Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells. **The Journal of Physiology**, v. 435, n. 1, p. 123-144, 1991.

MURTHY, K. S.; ZHOU, H.; MAKHLOUF, G. M. PKA-dependent activation of PDE3A and PDE4 and inhibition of adenylyl cyclase V/VI in smooth muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 282, n. 3, p. C508-C517, 2002.

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

NAYLOR, B. The shedding of the mucosa of the bronchial tree in asthma. **Thorax**, v. 17, n. 1, p. 69-72, 1962.

NATHAN, A. T.; PETERSON, E. A.; CHAKIR, J.; WILLS-KARP, M. Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through  $\beta$ -glucan-dependent pathways. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 3, p. 612-618, 2009.

NAWIJN, M. C.; HACKETT, T. L.; POSTMA, D. S.; VAN OOSTERHOUT, A. J.; HEIJINK, I. H. E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization. **Trends in immunology**, v. 32, n. 6, p. 248-255, 2011.

NELSON, H.S. The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms. **Disease-a-Month Journal**, v. 47, p. 5–15, 2001.

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.

NIELSON, C. P.; VESTAL, R. E.; STURM, R. J. Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 86, n. 5, p. 801-808, 1990.

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

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

OBBER C.; HOFFJAN S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. **Genes & Immunity**, v. 7, p. 95-100, 2006.

OLIVEIRA M.A, MUNIZ MT, SANTOS LA, FARESIN SM, FERNANDES AL. Custo-efetividade de programa de educação para adultos asmáticos atendidos em hospital-escola de instituição pública. **Journal of Pneumology** v.28: p. 71-6, 2002.

ORDONEZ, 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.

ORSINI, M. J.; KRYMSKAYA, V. P.; ESZTERHAS, A. J.; BENOVIC, J. L.; PANETTIERI, R. A. JR.; PENN, R. B. MAPK superfamily activation in human airway smooth muscle: mitogenesis requires prolonged p42/p44 activation. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 277, n. 3, p. L479-L488, 1999.

OUEDRAOGO, N.; ROUX, E. Physiology of Airway Smooth Muscle Contraction: An Overview. **Journal of Pulmonary and Respiratory Medicine**, v. 4, n. 221, p. 1-6, 2014.

PAGE, C. P. Phosphodiesterase Inhibitors for the Treatment of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **International archives of allergy and immunology**, v. 165, n. 3, p. 152-164, 2014.

PEACHELL, P. T.; UNDEM, B. J.; SCHLEIMER, R. P.; MACGLASHAN, D. W.; LICHTENSTEIN, L. M.; CIESLINSKI, L. B.; TORPHY, T. J. Preliminary identification and role of phosphodiesterase isozymes in human basophils. **The Journal of Immunology**, v. 148, n. 8, p. 2503-2510, 1992.

PEARCE N.; PEKKANEN J.; BEASLEY R. How much asthma is really attributable to atopy? **Thorax**, v. 54, p. 268–272, 1999.

PELAIA, G.; RENDA T.; GALLELLI L.; et al. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: implications for asthma. **Respiratory medicine**, v. 102, n. 8, p. 1173-1181, 2008.

PERRY, S. J. Targeting of cyclic AMP degradation to  $\beta$ 2-adrenergic receptors by  $\beta$ -arrestins. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 834-836, 2002.

PREMONT, R. T. Identification of adenylyl cyclases by amplification using degenerate primers. **Methods in enzymology**, v. 238, p. 116-127, 1994.

QUEIROGA, F.R. **Aspectos imunológicos e histopatológicos das ostras *Crassostrea gasar* cultivadas no estuário do Rio Mamanguape, PB: Ênfase na Perkinsiose**. 2013. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

REID, D. J.; PHAM, N. T. Roflumilast: a novel treatment for chronic obstructive pulmonary disease. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, n. 4, p. 521-529, 2012.

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.

RICCIARDOLO, F. L. M.; et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiological reviews**, v. 84, n. 3, p. 731-765, 2004.

RICCIARDOLO, F.L.M.; NIJKAMP, F.; ROSE, V.D.; FOLKERTS, G. The guinea pig as an animal model for asthma. **Current drug targets**, v. 9, n. 6, p. 452-465, 2008.

RICH, T. C.; XIN, W., MEHATS, C., HASSELL, K. A., PIGGOTT, L. A., LE, X.; KARPEN, J. W.; CONTI, M. Cellular mechanisms underlying prostaglandin-induced transient cAMP signals near the plasma membrane of HEK-293 cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C319-C331, 2007.

RICH, T.; FAGAN, K. A.; NAKATA, H.; SCHAACK, J.; COOPER, D. M.; KARPEN, J. W. Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. **The Journal of general physiology**, v. 116, n. 2, p. 147-162, 2000.

ROCHE, W.; WILLIAMS, J.; BEASLEY, R.; HOLGATE, S. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. **The Lancet**, v. 333, n. 8637, p. 520-524, 1989.

ROSADO-PINTO J.; MORAIS-ALMEIDA M. Asthma in the developing world. **Pediatric Pulmonology**, v. 26, p. 66-68, 2004.

ROUX, E. Temporal aspects of calcium signaling in airways smooth muscle cells. In *Calcium Signaling In Airway Smooth Muscle Cells*. Edited by Wang YX. New York: Springer, 2013.

SAETTA, M.; DI STEFANO .; ROSINA C.; THIENE G.; FABBRI L. M. Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v. 143, n. 1, p. 138-143, 1991.

SANDERSON, J. L.; DELL'ACQUA, M. L. AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity. **The Neuroscientist**, v. 17, n. 3, p. 321-336, 2011.

SCHULTZ, W. H. Physiological studies in anaphylaxis. II. Reaction of smooth muscle from guinea-pigs rendered tolerant to large doses of serum. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 221-229, 1910.

SCOPES, K. R. Enzyme Activity and Assays, **Nature**, 2002.

SELDON, P. M.; BARNES, P. J.; MEJA, K.; GIEMBYCZ, M. A.. Suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha generation from human peripheral blood monocytes by inhibitors of phosphodiesterase 4: interaction with

stimulants of adenylyl cyclase. **Molecular pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 747-757, 1995.

SELDON, P. M.; MEJA, K. K.; GIEMBYCZ, M. A. Rolipram, salbutamol and prostaglandin E2 suppress TNFalpha release from human monocytes by activating Type II cAMP-dependent protein kinase. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 18, p. 277-284, 2005.

SHIFREN, A.; WITT, C.; CHRISTIE, C.; CASTRO, M. Mechanisms of Remodeling in Asthmatic Airways. **Journal of Allergy**. v. 2012, p. 1-12, 2012.

SHIROLE, R. L.; SHIROLE, N. L.; KSHATRIYA, A. A.; KULKARNI, R.; SARAF, M. N. Investigation into the mechanism of action of essential oil of Pistacia integerrima for its antiasthmatic activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 153, n. 3, p. 541-551, 2014.

SMITH, N.; BROADLEY, K. J. Optimisation of the sensitisation conditions for an ovalbumin challenge model of asthma. **International immunopharmacology**, v. 7, n. 2, p. 183-190, 2007.

SOKOL C. L.; CHU N. Q.; YU S.; NISH S.A.; LAUFER T. M.; MEDZHITOV R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. **Nature immunology**, v. 10, n. 7, p. 713-720, 2009.

SOMLYO, A P; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SPICUZZA, L.; BELVISI, M. G.; BIRRELL, M. A.; BARNES, P. J.; HELE, D. J.; GIEMBYCZ, M. A. Evidence that the anti-spasmogenic effect of the  $\beta$ -adrenoceptor agonist, isoprenaline, on guinea-pig trachealis is not mediated by cyclic AMP-dependent protein kinase. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 8, p. 1201-1212, 2001.

SPINA, D., The potential of PDE4 inhibitors in asthma or COPD. **Current opinion in investigational drugs**, v. 1, p. 204-213, 2000.

SPINA, D. PDE4 inhibitors: current status. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 308-315, 2008.

SRIVANI, P.; USHARANI, D.; JEMMIS, E. D.; SASTRY, G. N. Subtype selectivity in phosphodiesterase 4 (PDE4): a bottleneck in rational drug design. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 36, p. 3854-3872, 2008.

STANGHERLIN, A.; ZACCOLO, M. Local Termination of 3'-5'-Cyclic Adenosine Monophosphate Signals: The Role of A Kinase Anchoring Protein–Tethered Phosphodiesterases. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 345-353, 2011.

TANAKA, H.; YAMADA, G.; SAIKAI, T.; HASHIMOTO, M.; TANAKA, S.; SUZUKI, K.; FUJII, M.; TAKAHASHI, H.; ABE, S. Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 168, n. 12, p. 1495-1499, 2003.

TANAKA, H.; YAMADA, G.; SAIKAI, T.; HASHIMOTO, M.; TANAKA, S.; SUZUKI, K.; FUJI, M.; TAKAHASHI, H.; ABE, S. Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 168, n. 12, p. 1495-1499, 2003.

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

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

TANG, H. SONG, Y. H.; CHEN, J. C.; CHEN, J. Q.; WANG, P. Upregulation of phosphodiesterase-4 in the lung of allergic rats. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 171, n. 8, p. 823-828, 2005.

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

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

TASKÉN, K. A.; COLLAS, P.; KEMMNER, W. A.; WITCZAK, O.; CONTI, M. Phosphodiesterase 4D and protein kinase a type II constitute a signaling unit in the centrosomal area. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 21999-22002, 2001.

TASKÉN, K.; RUPPELT, A. Negative regulation of T-cell receptor activation by the cAMP-PKA-Csk signalling pathway in T-cell lipid rafts. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2929–2939, 2006.

TAUSSIG, R.; ZIMMERMANN, G. Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways. **Advances in second messenger and phosphoprotein research**, v. 32, p. 81-98, 1998.

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.

TO, T.; STANOJEVIC, S.; MOORES, G.; GERSHON, A. S.; BATEMAN, E. D., CRUZ, A. A.; BOULET, L. P. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC public health**, v. 12, n. 1, p. 204, 2012.

TORPHY, T. J. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, n. 2, p. 351-370, 1998.

TRALAU-STEWART, C. J.; WILLIAMSON, R. A.; NIALS, A. T.; GASCOIGNE, M.; DAWSON, J.; HART, G. J.; KNOWLES, R. G. GSK256066, an exceptionally high-affinity and selective inhibitor of phosphodiesterase 4 suitable for administration by inhalation: in vitro, kinetic, and in vivo characterization. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 337, n. 1, p. 145-154, 2011.

TRIAN, T.; BURGESS, J. K.; NIIMI, K.; MOIR, L. M.; GE, Q.; BERGER, P.; LIGGETT, S. B.; BLACK, J. L.; OLIVER, B. G.  $\beta_2$ -Agonist Induced cAMP Is Decreased in Asthmatic Airway Smooth Muscle Due to Increased PDE4D. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e20000, 2011.

TRIPURANENI, N. S.; AZAM, M. A. Pharmacophore modeling, 3D-QSAR, and docking study of pyrozolo [1, 5-a] pyridine/4, 4-dimethylpyrazolone analogues as PDE4 selective inhibitors. **Journal of molecular modeling**, v. 21, n. 11, p. 1-12, 2015.

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

TSURIKISAWA, N; OSHIKATA, C.; TSUBURAI, T.; SAITO, H.; SEKIYA, H.; TANIMOTO, H.; TAKEICHI, S.; MITOMI, H.; AKIYAMA, K. Bronchial hyperresponsiveness to histamine correlates with airway remodelling in adults with asthma. **Respiratory Medicine**, v.104, p. 1271-1277, 2010.

UZUNOV, P.; WEISS, B. Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel

electrophoresis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 284, n. 1, p. 220-226, 1972.

VAN DER VELDEN, V. H. J.; HULSMANN, A. R. Autonomic innervation of human airways: structure, function, and pathophysiology in asthma. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, n. 3, p. 145-159, 1999.

VERDE, I.; PAHLKE, G.; SALANOVA, M.; ZHANG, G.; WANG, S.; COLETTI, D.; ONUFFER, J.; JIN, C.; CONTI, M. Myomegalin is a novel protein of the golgi/centrosome that interacts with a cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11189-11198, 2001.

VILLANOVE, X.; MARTHAN, R.; TUNON-DE-LARA, J.M.; JOHNSON, P.R.; SAVINEAU, J.P.; MCKAY, K.O.; ALOUAN, L.A.; ARMOUR, C.L.; BLACK, J.L. Sensitization decreases relaxation in human isolated airways. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 148, p. 107-112, 1993.

VOGALIS, F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 20, p. 207-219, 2000.

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

WANG, H.; PENG, M. S.; CHEN, Y.; GENG, J.; ROBINSON, H.; HOUSLAY, M. D.; CAI, J.; KE, H. Structures of the four subfamilies of phosphodiesterase-4 provide insight into the selectivity of their inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 408, p. 193-201, 2007.

WEI-XU, H.; QIN, X.; ZHU, W.; YUAN-YI, C.; LI-FENG, Z.; ZHI-YONG, L.; DAN, H.; XIAO-MU, W.; GUO-ZHU, H. Therapeutic potential of anti-IL-1 $\beta$  IgY in guinea pigs with allergic asthma induced by ovalbumin. **Molecular immunology**, v. 58, n. 1, p. 139-149, 2014.

WEN, F. Q.; LIU, X.; MANDA, W.; TERASAKI, Y.; KOBAYASHI, T.; ABE, S.; et al. T<sub>H</sub>2 cytokine-enhanced and TGF- $\beta$ -enhanced vascular endothelial growth factor production by cultured human airway smooth muscle cells is attenuated by IFN- $\gamma$  and corticosteroids. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 111, n. 6, p. 1307-1318, 2003.

WENZEL, S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 716-725, 2012.

WENZEL, S.E.; SZEFLER, S.J.; LEUNG, D.Y.; SLOAN, S.I.; REX, M.D.; MARTIN, R.J. Bronchoscopic evaluation of severe asthma: persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 156, n. 3, p. 737-743, 1997.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry, 2nd ed., Academic Press: London**, p. 29, 2003.

WILLIAMS C.M.; GALLI S.J. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, p. 847–859, 2000.

WILLOUGHBY, D.; WONG, W.; SCHAACK, J.; SCOTT, J. D.; COOPER, D. M. An anchored PKA and PDE4 complex regulates subplasmalemmal cAMP dynamics. **The EMBO journal**, v. 25, n. 10, p. 2051-2061, 2006.

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.

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

WRIGHT, D.; SHARMA, P.; RYU, M. H.; RISSÉ, P. A.; NGO, M.; MAARSINGH, H.; KOZIOL-WHITE, C.; JHA, A.; HALAYKO, A. J. WEST, A.R. Models to study airway

smooth muscle contraction in vivo, ex vivo and in vitro: implications in understanding asthma. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 24-36, 2013.

XIN, W.; TRAN, T. M.; RICHTER, W.; CLARK, R. B.; RICH, T. C. Roles of GRK and PDE4 activities in the regulation of  $\beta$ 2 adrenergic signaling. **The Journal of general physiology**, v. 131, n. 4, p. 349-364, 2008.

XU, D.; ISAACS, C.; HALL, I. P.; EMALA, C. W. Human airway smooth muscle expresses 7 isoforms of adenylyl cyclase: a dominant role for isoform V. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 281, n. 4, p. L832-L843, 2001.

XU, R. X.; HASSELL, A. M.; VANDERWALL, D.; LAMBERT, M. H.; HOLMES, W. D.; LUTHER, M. A.; ROCQUE, W. J.; MILBURN, M. V.; ZHAO, Y.; KE, H.; NOLTE, R. T. Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism and specificity. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1822-1825, 2000.

XUEFEI, M. A; CHENG, Z.; KONG, H.; WANG, Y.; UNRUH, H.; STEPHENS, N. L.; LAVIOLETTE, M. Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 6, p. L1181-L1189, 2002.

YARWOOD, S. J.; STEELE, M. R.; SCOTLAND, G.; HOUSLAY, M. D.; BOLGER, G. B. The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14909-14917, 1999.

YOSHIMOTO T.; TSUTSUIH.; TOMINAGA K.; HOSHINO K.; OKAMURA H.; AKIRA S.; PAUL W.E.; NAKANISHI K. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 13962-13966, 1999.

ZACCOLO, M.; POZZAN, T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. **Science**, v. 295, n. 5560, p. 1711-1715, 2002.

ZDANOWICZ, Martin M. Pharmacotherapy of asthma. **American journal of pharmaceutical education**, v. 71, n. 5, 2007.

ZHU, J.; MIX, E.; WINBLAD, B. The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. **CNS drug reviews**, v. 7, n. 4, p. 387-398, 2001.

# ***Apêndices***

---

APÊNDICE A – Artigo publicado na revista *Journal of Ethnopharmacology* (2012).

Journal of Ethnopharmacology 141 (2012) 895–900



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Vasorelaxant action of the total alkaloid fraction obtained from *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae) involves NO/cGMP/PKG pathway and potassium channels

Fabio S. Monteiro<sup>a</sup>, Ana C.L. Silva<sup>a</sup>, Italo R.R. Martins<sup>a</sup>, Ana C.C. Correia<sup>a</sup>, Ionaldo J.L.D. Basílio<sup>a</sup>, Maria F. Agra<sup>a,c</sup>, Jnanabrata Bhattacharyya<sup>b</sup>, Bagnólia A. Silva<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba, Brazil

<sup>b</sup> University of Georgia, Department of Chemistry, Athens, United States

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 December 2011

Received in revised form 13 February 2012

Accepted 17 March 2012

Available online 26 March 2012

## Keywords:

*Solanum paludosum*

Total alkaloids

Rat aorta

NO/sCG/PKG pathway

Potassium channels

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Solanum paludosum* Moric. (jurubeba-roxa) is commonly used to treat hypertension as a substitute for *Solanum paniculatum* L. (jurubeba verdadeira). The total ethanolic extract from the root bark of *Solanum paludosum* have been found to cause hypotension in rats.

**Aim of the study:** To investigate the mechanism by which the total alkaloid fraction obtained from the root bark of *Solanum paludosum* (FAT-SP) acts as a vasorelaxant agent on rat thoracic aorta.

**Materials and methods:** Rings of rat aorta were suspended in organ bath containing Krebs solution at 37 °C, bubbled with carbogen mixture (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) under a resting tension of 1 g. Isometric contractions were measured using a force transducer coupled to an amplifier and a microcomputer.

**Results:** FAT-SP has been found cause relaxation of the aortic rings pre-contracted with phenylephrine (Phe) in a concentration-dependent manner, in the presence and absence of endothelium. This effect was more potent on the endothelium-intact aorta. In the presence of endothelium, neither indomethacin (non-selective cyclooxygenase inhibitor) nor atropine (non-selective muscarinic receptor antagonist), produced significant changes on the relaxation response. On the other hand, in the presence of calmidazolium (a calmodulin inhibitor), N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, nitric oxide synthase inhibitor), hydroxocobalamin (HDX) (scavenger of free-radical nitric oxide), 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-one (ODQ, selective blocker of soluble guanylate cyclase), Rp-8-bromo-β-phenyl-1,N<sup>2</sup>-ethenoguanosine 3':5'-cyclic monophosphorothioate sodium salt hydrate (Rp-8-Br-PET-cGMPS, competitive inhibitor of cGMP-dependent protein kinase G) or TEA<sup>+</sup> (tetraethylammonium, nonselective potassium channel blocker), the vasorelaxant effect was significantly reduced, suggesting the involvement of NO/sCG/PKG pathway and potassium channel opening in vasorelaxant action of the FAT-SP.

**Conclusion:** The mechanism of vasorelaxant activity of the FAT-SP on rat aorta involves both NO/sCG/PKG pathway and potassium channels.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE B – Artigo publicado na revista *European Journal of Pharmacology* (2012).

European Journal of Pharmacology 678 (2012) 39–47



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejphar](http://www.elsevier.com/locate/ejphar)

## Pulmonary, Gastrointestinal and Urogenital Pharmacology

*Ent-7 $\alpha$ -acetoxytrachyloban-18-oic acid* and *ent-7 $\alpha$ -hydroxytrachyloban-18-oic acid* from *Xylopi* *langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. modulate K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels to reduce cytosolic calcium concentration on guinea pig ileumRosimeire F. Santos<sup>a</sup>, Italo R.R. Martins<sup>b</sup>, Rafael A. Travassos<sup>b</sup>, Josean F. Tavares<sup>b,c</sup>, Marcelo S. Silva<sup>b,c</sup>, Edgar J. Paredes-Gamero<sup>d</sup>, Alice T. Ferreira<sup>d</sup>, Viviane L.A. Nouailhetas<sup>d</sup>, Jeannine Aboulafia<sup>d</sup>, Vera L.S. Rigoni<sup>d</sup>, Bagnólia A. da Silva<sup>b,c,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brazil<sup>b</sup> Laboratório de Tecnologia Farmacêutica "Prof. Delby Fernandes de Medeiros", Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil<sup>c</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil<sup>d</sup> Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, São Paulo, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 September 2011

Received in revised form 15 December 2011

Accepted 17 December 2011

Available online 27 December 2011

## Keywords:

Intestinal smooth muscle

Spasmodic activity

Diterpene

*Xylopi* *langsdorfiana*

Ionic channels

Calcium

## ABSTRACT

In this study we investigated the mechanism underlying the spasmolytic action of *ent-7 $\alpha$ -acetoxytrachyloban-18-oic acid* (trachylobane-360) and *ent-7 $\alpha$ -hydroxytrachyloban-18-oic acid* (trachylobane-318), diterpenes obtained from *Xylopi* *langsdorfiana*, on guinea pig ileum. Both compounds inhibited histamine-induced cumulative contractions (slope = 3.5 ± 0.9 and 4.4 ± 0.7) that suggests a noncompetitive antagonism to histaminergic receptors. CaCl<sub>2</sub>-induced contractions were nonparallelly and concentration-dependently reduced by both diterpenes, indicating blockade of calcium influx through voltage-dependent calcium channels (Ca<sub>v</sub>). The Ca<sub>v</sub> participation was confirmed since both trachylobanes equipotently relaxed ileum precontracted with S-(−)-Bay K8644 (EC<sub>50</sub> = 3.5 ± 0.7 × 10<sup>−5</sup> and 1.1 ± 0.2 × 10<sup>−5</sup> M) and KCl (EC<sub>50</sub> = 5.5 ± 0.3 × 10<sup>−5</sup> and 1.4 ± 0.2 × 10<sup>−5</sup> M). K<sup>+</sup> channels participation was confirmed since diterpene-induced relaxation curves were significantly shifted to right in the presence of 5 mM tetraethylammonium (TEA<sup>+</sup>) (EC<sub>50</sub> = 0.5 ± 0.04 × 10<sup>−4</sup> and 2.0 ± 0.5 × 10<sup>−5</sup> M). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (K<sub>ATP</sub>), voltage activated K<sup>+</sup> channels (K<sub>v</sub>), small conductance calcium-activated K<sub>+</sub> channels (SK<sub>Ca</sub>) or big conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels (BK<sub>Ca</sub>) did not seem to participate of trachylobane-360 spasmolytic action. However trachylobane-318 modulated positively K<sub>ATP</sub>, K<sub>v</sub> and SK<sub>Ca</sub> (EC<sub>50</sub> = 1.1 ± 0.3 × 10<sup>−5</sup>, 0.7 ± 0.2 × 10<sup>−5</sup> and 0.7 ± 0.2 × 10<sup>−5</sup> M), but not BK<sub>Ca</sub>. A fluorescence analysis technique confirmed the decrease of cytosolic calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) induced by both trachylobanes in ileal myocytes. In conclusion, trachylobane-360 and trachylobane-318 induced spasmolytic activity by K<sup>+</sup> channel positive modulation and Ca<sup>2+</sup> channel blockade, which results in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> reduction at cellular level leading to smooth muscle relaxation.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

APÊNDICE C – Artigo publicado na revista *Natural Product Research* (2012).

*Natural Product Research*  
2012, 1–5, iFirst



## SHORT COMMUNICATION

### Spasmolytic activity of trachylobanes *ent-7 $\alpha$ -acetoxytrachyloban-18-oic acid* and *ent-7 $\alpha$ -hydroxytrachyloban-18-oic acid* isolated from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. (Annonaceae)

Rosimeire F. Santos<sup>a</sup>, Italo R.R. Martins<sup>a</sup>, Fabio de S. Monteiro<sup>a</sup>,  
Rafael de A. Travassos<sup>a</sup>, Daniele I. Janebro<sup>a</sup>, Josean F. Tavares<sup>ab</sup>,  
Marcelo S. Silva<sup>ab</sup> and Bagnólia A. da Silva<sup>ab\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica 'Prof. Delby Fernandes de Medeiros',  
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil; <sup>b</sup>Departamento de Ciências  
Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa,  
Paraíba, Brazil

(Received 20 July 2011; final version received 28 September 2011)

We aimed to investigate the possible spasmolytic activity of *ent-7 $\alpha$ -acetoxytrachyloban-18-oic acid* (**1**) and *ent-7 $\alpha$ -hydroxytrachyloban-18-oic acid* (**2**) on smooth muscle models. In male rat aorta and rat uterus, both diterpenes were unable to trigger spasmolytic action. However, **2** relaxed guinea-pig trachea: Compounds **1** and **2** antagonised, significantly and concentration-dependently, carbachol- and histamine-induced phasic contractions in guinea-pig ileum. Moreover, they induced a significant and concentration-dependent relaxation in pre-contracted (KCl, carbachol or histamine) guinea-pig ileum, with **2** being 15 times more potent than **1** in histamine-contracted ileum. These dissimilar results may be due to chemical differences between them. Thus, we demonstrated that **1** and **2** seem to be promising spasmolytic agents, although further studies are required to elucidate the spasmolytic action mechanism.

**Keywords:** diterpene; Annonaceae; smooth muscles; spasmolytic;  
*Xylopia langsdorfiana*

APÊNDICE D – Artigo publicado na revista *Journal of Medicinal Research* (2013).

academicJournals

Vol. 7(33), pp. 2436-2443, 3 September, 2013  
DOI: 10.5897/JMPR2013.4484  
ISSN 1996-0875 ©2013 Academic Journals  
<http://www.academicjournals.org/JMPR>

Journal of Medicinal Plants Research

Full Length Research Paper

## Spasmolytic activity of *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae)

Iara Leão Luna de Souza<sup>1</sup>, Gislaine Alves de Oliveira<sup>1</sup>, Rafael de Almeida Travassos<sup>1</sup>, Luiz Henrique César Vasconcelos<sup>1</sup>, Ana Carolina de Carvalho Correia<sup>1</sup>, Italo Rossi Roseno Martins<sup>1</sup>, Massilon da Silva Moreira dos Santos Júnior<sup>1</sup>, Vicente Carlos de Oliveira Costa<sup>1</sup>, Josean Fachine Tavares<sup>1,2</sup>, Marcelo Sobral da Silva<sup>1,2</sup> and Bagnólia Araújo da Silva<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, 58.051-970, PO Box 5009, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58.051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Accepted 26 August, 2013

*Hyptis* is a worldwide genus cited by its medicinal uses. *Hyptis macrostachys* Benth., a species popularly known in Brazil as “alfavaca-brava” and “hortelã-do-mato”, is used in folk medicine to relief asthma, cough and bronchitis symptoms. Thus, this study investigated a possible spasmolytic effect of the aerial parts ethanol extract from *H. macrostachys* Benth. (HM-EtOH<sub>PA</sub>) on several smooth muscle models. On the rat aorta, the uterus was observed and guinea pig trachea HM-EtOH<sub>PA</sub> did not show relevant spasmolytic action in all tested concentrations (243 to 729 µg/ml). However, on guinea pig ileum, HM-EtOH<sub>PA</sub> (9 to 729 µg/ml) significantly ( $p < 0.001$ ) inhibited in a concentration-dependent manner the contractions induced by carbachol (CCh)  $10^{-6}$  M and histamine  $10^{-6}$  M as well as relaxed this organ in an equipotent and concentration-dependent (1 to 729 µg/ml) manner when pre-contracted with CCh  $10^{-6}$  M, histamine  $10^{-6}$  M and KCl 40 mM, suggesting its actions in the voltage-gated calcium channels (Ca<sub>v</sub>) blockade. Since HM-EtOH<sub>PA</sub> (9 to 729 µg/ml) inhibited Ca<sup>2+</sup>-induced contractions in Ca<sup>2+</sup>-free depolarizing medium and relaxed ileum pre-contracted with S-(-)-Bay K8644 ( $3 \times 10^{-7}$  M) in a concentration-dependent manner, the hypothesis of Ca<sub>v</sub> was confirmed. Thus, *H. macrostachys* Benth. showed a selective spasmolytic action on guinea pig ileum by blocking Ca<sup>2+</sup> entry through Ca<sub>v</sub>.

**Key words:** Lamiaceae, *Hyptis macrostachys* Benth., relaxant, antispasmodic, calcium channel.

APÊNDICE E – Artigo publicado na revista *Journal of Smooth Muscle Research* (2013).J. Smooth Muscle Res. 2013; 49: 15–25  
Published online: July 6, 2013; doi: 10.1540/jsmr.49.15

Original

## Relaxant effect of *Ent-7 $\alpha$ -hydroxytrachyloban-18-oic acid*, a trachylobane diterpene from *Xylopi*a *langsдорfiana* A. St-Hil. & Tul., on tracheal smooth muscle

Italo R. R. Martins<sup>1</sup>, Rosimeire F. dos Santos<sup>2</sup>, Ana C. de C. Correia<sup>1</sup>, Gislaïne A. de Oliveira<sup>1</sup>, Cibério L. Macêdo<sup>1</sup>, Fabio de S. Monteiro<sup>1</sup>, Paula F. dos Santos<sup>1</sup>, Fabiana de A. Cavalcante<sup>3</sup>, Josean F. Tavares<sup>4</sup> and Bagnólia A. da Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil

Submitted December 28, 2012; Accepted in final form April 16, 2013

### Abstract

*Ent-7 $\alpha$ -hydroxytrachyloban-18-oic acid*, a trachylobane diterpene from *Xylopi*a *langsдорfiana*, has previously been shown to relax the guinea-pig trachea in a concentration-dependent manner. In this study we aimed to elucidate the mechanisms underlying this action and so contribute to the discovery of natural products with therapeutic potential. A possible interaction between diterpene and the Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complex was eliminated as chlorpromazine (10<sup>-6</sup> M), a calmodulin inhibitor, did not significantly alter the diterpene-induced relaxation (pD<sub>2</sub> = 4.38 ± 0.07 and 4.25 ± 0.07; mean ± S.E.M., n=5). Trachylobane-318 showed a higher relaxant potency when the trachea was contracted by 18 mM KCl than it did with 60 mM KCl (pD<sub>2</sub> = 4.90 ± 0.25 and 3.88 ± 0.01, n=5), suggesting the possible activation of K<sup>+</sup> channels. This was confirmed, as in the presence of 10 mM TEA<sup>+</sup> (a non-selective K<sup>+</sup> channel blocker), diterpene relaxation potency was significantly reduced (pD<sub>2</sub> = 4.38 ± 0.07 to 4.01 ± 0.06, n=5). Furthermore, K<sup>+</sup> channel subtypes K<sub>ATP</sub>, K<sub>V</sub>, SK<sub>Ca</sub> and BK<sub>Ca</sub> seem to be modulated positively by trachylobane-318 (pD<sub>2</sub> = 3.91 ± 0.003, 4.00 ± 0.06, 3.45 ± 0.14 and 3.80 ± 0.05, n=5) but not the K<sub>ir</sub> subtype channel (pD<sub>2</sub> = 4.15 ± 0.10, n=5). Cyclic nucleotides were not involved as the relaxation due to aminophylline (pD<sub>2</sub> = 4.27 ± 0.09, n=5) was not altered in the presence of 3 × 10<sup>-5</sup> M trachylobane-318 (pD<sub>2</sub> = 4.46 ± 0.08, n=5). Thus, at a functional level, trachylobane-318 seems to relax the guinea-pig trachea by positive modulation of K<sup>+</sup> channels, particularly the K<sub>ATP</sub>, K<sub>V</sub>, SK<sub>Ca</sub> and BK<sub>Ca</sub> subtypes.

**Key words:** trachylobane, *Xylopi*a *langsдорfiana*, airway smooth muscle, potassium channels

APÊNDICE F – Artigo publicado na revista *Molecules* (2014).

*Molecules* **2014**, *19*, 19678-19695; doi:10.3390/molecules191219678

OPEN ACCESS

*molecules*

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

## Mechanisms Underlying Vasorelaxation Induced in Rat Aorta by Galetin 3,6-Dimethyl Ether, a Flavonoid from *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke

Cibério L. Macêdo <sup>1,†</sup>, Luiz H. C. Vasconcelos <sup>1,†</sup>, Ana C. C. Correia <sup>1</sup>, Italo R. R. Martins <sup>1</sup>, Daysianne P. de Lira <sup>2</sup>, Bárbara V. de O. Santos <sup>1,3</sup>, Fabiana de A. Cavalcante <sup>1,4</sup> and Bagnólia A. da Silva <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil; E-Mails: ciberiolandim@hotmail.com (C.L.M.); henrique.luiz89@luf.ufpb.br (L.H.C.V.); anacarolinacc@yahoo.com.br (A.C.C.C.); italo\_rossi\_@hotmail.com (I.R.R.M.)

<sup>2</sup> Departamento de Farmácia, Faculdade Santa Maria (FSM), Cajazeiras, PB 58900-000, Brazil; E-Mail: daysianneplira@luf.ufpb.br

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil; E-Mail: barbara@luf.ufpb.br

<sup>4</sup> Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil; E-Mail: fabianacavalcante@luf.ufpb.br

† These authors contributed equally to this work.

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: bagnoliasilva@yahoo.com or bagnolia@luf.ufpb.br; Tel.: +55-83-3216-7126; Fax: +55-83-3216-7502.

External Editor: Nancy D. Turner

Received: 10 September 2014; in revised form: 17 November 2014 / Accepted: 17 November 2014 / Published: 27 November 2014

APÊNDICE G – Artigo publicado na revista *Natural Product Research* (2014).

*Natural Product Research*, 2014  
<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.964706>



## SHORT COMMUNICATION

### Essential oil from the leaves of *Xylopia langsdorfiana* (Annonaceae) as a possible spasmolytic agent

Ana Carolina de C. Correia<sup>a</sup>, Tamyrís F. Ferreira<sup>a</sup>, Italo Rossi R. Martins<sup>a</sup>, Cibério L. Macêdo<sup>a</sup>, Fabio de S. Monteiro<sup>a</sup>, Vicente Carlos O. Costa<sup>a</sup>, Josean F. Tavares<sup>ab</sup>, Marcelo S. Silva<sup>ab</sup>, Edgar J. Paredes-Gamero<sup>c</sup>, Marcus V. Buri<sup>c</sup>, Vera L.S. Rigoni<sup>d</sup>, Viviane L.A. Nouailhetas<sup>d</sup> and Bagnólia A. Da Silva<sup>ab\*</sup>

<sup>a</sup>Center for Health Sciences (CCS), Federal University of Paraíba (UFPB), Campus I, 58.051-970, PO Box 5009, João Pessoa, Paraíba, Brazil; <sup>b</sup>Department of Pharmaceutical Sciences (DCF)/CCS/UFPB, Campus I, 58.051-970, PO Box 5009, João Pessoa, Paraíba, Brazil; <sup>c</sup>Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil; <sup>d</sup>Department of Biophysics, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

(Received 8 May 2014; final version received 2 September 2014)

*Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae) is popularly known in the northeast of Brazil as 'pimenteira da terra', and an essential oil (XL-OE) was extracted from its leaves. Since *Xylopia* species are cited in folk medicine and diterpenes from *X. langsdorfiana* have spasmolytic activity, this study aimed to investigate a possible spasmolytic action of XL-OE on smooth muscle models. XL-OE (243 and 729  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showed low pharmacologic efficacy on guinea pig trachea and rat aorta and uterus. However, in guinea pig ileum, XL-OE (27–729  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inhibited carbachol or histamine-induced phasic contractions (1  $\mu\text{M}$ ) in a significant and concentration-dependent manner. In addition, XL-OE (81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reduced fluorescence intensity in ileal myocytes stimulated by histamine, indicating a decrease in cytosolic calcium concentration, which could explain the spasmolytic activity. Thus, XL-OE proved to be a promising natural product to be used in gastrointestinal diseases acting by modulating the cytosolic calcium concentration.

**Keywords:** Annonaceae; smooth muscle; antispasmodic; calcium; essential oil

**APÊNDICE H** – Artigo publicado na revista *Zeitschrift fur Naturforschung. C, A Journal of Biosciences* (2015).

### Mechanisms Underlying the Relaxant Effect of Galetin 3,6- Dimethyl Ether, from *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke, on Guinea-Pig Trachea

Cibério Landim Macêdo<sup>1</sup> / Luiz Henrique César Vasconcelos<sup>1</sup> / Ana Carolina de Carvalho Correia<sup>1</sup> / Italo Rossi Roseno Martins<sup>1</sup> / Daysianne Pereira de Lira<sup>1</sup> / Bárbara Viviana de Oliveira Santos<sup>1,2</sup> / Bagnólia Araújo da Silva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Center of Health Sciences, Federal University of Paraíba (UFPB), Campus I, P. O. Box 5009, 58.051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba (UFPB), 58.051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

Citation Information: *Zeitschrift für Naturforschung C*. Volume 69, Issue 11-12, Pages 434–442, ISSN (Online) 1865-7125, ISSN (Print) 0939-5075, DOI: [10.5560/znc.2014-0017](https://doi.org/10.5560/znc.2014-0017), March 2015

#### Publication History

Received: 2014-01-25

Accepted: 2014-12-28

Published Online: 2015-03-19

#### Abstract

Galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL), a flavonoid from the aerial parts of *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke, was found to exert a relaxant effect on carbachol (CCh)-pre-contracted guinea-pig trachea. Based on cumulative concentration-response curves to CCh, FGAL antagonized muscarinic receptors pseudo-irreversibly and noncompetitively, since it inhibited and shifted these curves towards higher concentrations in a nonparallel manner. In addition, FGAL was more potent in relaxing contractions induced by 18 mM as compared to 60 mM KCl ( $pD_2 = 5.50 \pm 0.36$  and  $4.80 \pm 0.07$ , respectively), indicating the participation of  $K^+$  channels. In the presence of 10 mM tetraethylammonium (TEA<sup>+</sup>) chloride, a nonselective  $K^+$  channel blocker, the relaxant potency of FGAL was reduced (from  $pD_2 = 5.12 \pm 0.07$  to  $4.87 \pm 0.02$ ). Among several selective blockers of  $K^+$  channel subtypes, only apamin, an SKCa (small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels) blocker, attenuated the relaxant potency of FGAL ( $pD_2 = 4.85 \pm 0.06$ ), suggesting SKCa activation. FGAL was equipotent in relaxing trachea contracted by 60 mM KCl ( $pD_2 = 4.80 \pm 0.07$ ) or 10<sup>-6</sup> M CCh ( $pD_2 = 5.02 \pm 0.07$ ), suggesting  $Ca^V$  (voltage-gated calcium channel), but not ROCs (receptor-operated calcium channels) participation. Furthermore, aminophylline-induced relaxation ( $pD_2 = 4.12 \pm 0.06$ ) was potentiated around 4-fold ( $pD_2 = 4.80 \pm 0.44$ ) in the presence of FGAL. Moreover, forskolin-induced relaxation ( $pD_2 = 6.51 \pm 0.06$ ) was potentiated around 2.5-fold ( $pD_2 = 6.90 \pm 0.05$ ) by FGAL. Conversely, sodium nitroprusside-induced relaxation was unaffected, indicating that the AC/cAMP/PKA pathway, but not the NO pathway, may be modulated by the flavonoid. These results suggest that, in guinea-pig trachea, FGAL induces relaxation by pseudo-irreversible noncompetitive antagonism on muscarinic receptors, modulation of  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels, as well as activation of the AC/cAMP/PKA pathway.

**Keywords:** Airway Smooth Muscle; Relaxant Action; Ionic Channels; Galetin 3,6-Dimethyl Ether

APÊNDICE I – Artigo publicado na revista *Journal of Smooth Muscle Research* (2015).



J. Smooth Muscle Res. 2015; 51: 70–81  
Published online: October 24, 2015; doi: 10.1540/jsmr.51.70

Original

## Intensity of swimming exercise influences tracheal reactivity in rats

Aline F. Brito<sup>1,2,3</sup>, Alexandre S. Silva<sup>3</sup>, Iara L. L. Souza<sup>1,2</sup>, Joedna C. Pereira<sup>1,2</sup>, Italo R. R. Martins<sup>1,2</sup> and Bagnólia A. Silva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacologia Funcional Professor George Thomas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e saúde, Departamento de Educação Física (DEF), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil

Submitted July 22, 2015; accepted in final form September 4, 2015

### Abstract

Studies that evaluate the mechanisms for increased airway responsiveness are very sparse, although there are reports of exercise-induced bronchospasm. Therefore, we have evaluated the tracheal reactivity and the rate of lipid peroxidation after different intensities of swimming exercise in rats. Thus, male Wistar rats (age 8 weeks; 250–300 g) underwent a forced swimming exercise for 1h whilst carrying attached loads of 3, 4, 5, 6 and 8% of their body weight (groups G3, G4, G5, G6 and G8, respectively;  $n=5$  each). Immediately after the test, the trachea of each rat was removed and suspended in an organ bath to evaluate contractile and relaxant responses. The rate of lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde levels. According to a one-way ANOVA, all trained groups showed a significant decrease in the relaxation induced by aminophylline ( $10^{-12}$ – $10^{-1}$  M) ( $pD_2=3.1, 3.2, 3.3, 3.3$  and  $3.2$ , respectively for G3, G4, G5, G6 and G8) compared to the control group ( $pD_2=4.6$ ) and the  $E_{max}$  values of G5, G6, G8 groups were reduced by 94.2, 88.0 and 77.0%, respectively. Additionally, all trained groups showed a significant increase in contraction induced by carbachol ( $10^{-9}$ – $10^{-3}$  M) ( $pD_2=6.0, 6.5, 6.5, 7.2$  and  $7.3$ , respectively for G3, G4, G5, G6 and G8) compared to the control group ( $pD_2=5.7$ ). Lipid peroxidation levels of G3, G4 and G5 were similar in both the trachea and lung, however G6 and G8 presented an increased peroxidation in the trachea. In conclusion, a single bout of swimming exercise acutely altered tracheal responsiveness in an intensity-related manner and the elevation in lipid peroxidation indicates a degree of oxidative stress involvement.

**Key words:** trachea, aerobic exercise, anaerobic exercise, lipid peroxidation

**Anexo** 

---

**ANEXO A** – Certidão de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB).



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



**CERTIDÃO (2ª VIA)**

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

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

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

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

Atenciosamente,

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

Prof.ª Dr.ª Islania G. A. Gonçalves  
Coordenadora CEUA/UFPB  
SIAPE 3386301

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA  
Universidade Federal da Paraíba  
[www.ufpb.br/ceua/](http://www.ufpb.br/ceua/) - ceua@ufpb.br