

Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Daniella Ramos Martins

**Avaliação do relaxamento vascular induzido por um novo
derivado pirazólico protótipo a fármaco (LQFM 021), possível
inibidor de fosfodiesterase**

Goiânia

2012

Daniella Ramos Martins

Avaliação do relaxamento vascular induzido por um novo derivado pirazólico protótipo a fármaco (LQFM 021), possível inibidor de fosfodiesterase

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFG para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha

Goiânia

2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

M386a Martins, Daniella Ramos.
Avaliação do relaxamento vascular induzido por um novo derivado pirazólico protótipo a fármaco (LQFM 021), possível inibidor de fosfodiesterase [manuscrito] / Daniella Ramos Martins. - 2012.

xv, 89 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Relaxamento vascular. 2. Fosfodiesterase. I. Título.

CDU: 615.014

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Faculdade de Farmácia
Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: DANIELLA RAMOS MARTINS

Orientador: Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha

MEMBROS:

- 1. Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha**
- 2. Prof. Dr. Carlos Henrique Castro**
- 3. Prof. Dra. Carolina Horta Andrade**

Data: 28 / 02 / 2012.

*“A chave de todas as ciências é inegavelmente o ponto de
interrogação.”*

Honoré de Balzac.

Aos meus pais,

Pela dedicação e amor incondicional.

Agradecimentos

A Deus, que está sempre do meu lado me abençoando e me permitindo mais essa conquista;

Aos meus pais, Luciene e Sinfrônio, pelo amor e amparo incondicional;

Ao Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha por ter me dado a oportunidade de ingressar no mestrado e desde então se empenhado em me ajudar para que eu pudesse alcançar esse título tão sonhado;

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Patrícia Ferreira Castro e Milton Junio que se dispuseram sempre com muita simpatia a me auxiliar;

Ao Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico de Medicamentos e à Faculdade de Farmácia pela parceria e por proporcionar as condições de trabalho;

Aos Professores Doutores Ricardo Menegatti, Carolina Horta Andrade e Marize Campos Valadares Bozini pelas contribuições fundamentais à minha pesquisa;

A todos os professores que ministraram as disciplinas do programa que tanto contribuíram para minha aprendizagem;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) Pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de estudos;

Ao Pubmed pelo suporte técnico-científico;

À banca de qualificação e defesa por ter contribuído com o aprimoramento do meu trabalho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS.....	17
1.2 FOSFODISTERASES.....	19
1.3 ENVOLVIMENTO DO GMP _c , DOS CANAIS DE K ⁺ E DOS CANAIS DE Ca ²⁺ NO RELAXAMENTO VASCULAR.....	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3 METODOLOGIA.....	34
3.1 EXPERIMENTOS EM ANEÍS DE AORTA.....	34
4. RESULTADOS	41
ARTIGO: SÍNTESE, ATIVIDADE VASODILATADORA E TOXICIDADE DE UM NOVO DERIVADO PIRAZÓLICO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE.....	42
5. CONCLUSÕES.....	65
6. PERSPECTIVAS.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de ativação dos nucleotídeos cíclicos.....	21
Figura 2: Registro de tensão isométrica.....	35
Figura 3: Rota sintética do LQFM 021: 5-(3-(fluorofenil)-1H-pirazol-4-il)-2H-tetrazol....	51
Figura 4: Configurações de menor energia do acoplamento de LQFM021 no sítio ativo da PDE-3.....	52
Figura 5: Efeito relaxante do LQFM 021 em aortas isoladas de ratos.....	53
Figura 6: Efeito de MDL-12.330A e ODQ sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas.....	54
Figura 7: Efeito máximo de relaxamento para LQFM 21 em aortas (E ⁻) pré-contraídas com fenilefrina (Fenil, 0,1 µM), com solução de KCl 45mM ou fenilefrina na presença (20 min) do bloqueador de canais de K ⁺ , TEA (5 mM).....	55
Figura 8: Efeito máximo de relaxamento para LQFM 21 em aortas (E ⁻) na ausência ou presença (20 min) do inibidor da Ca ²⁺ -ATPase reticular CPA (10 µM).....	56
Figura 9: Efeito contrátil estimulado com agonista adrenérgico fenilefrina (A) ou CaCl ₂ (B, em meio zero-cálcio + estímulo com fenilefrina EC ₅₀) na ausência ou presença (20 min) do LQFM 021.....	57
Figura 10: Efeito relaxante do LQFM 021 e do seu diluente DMSO em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina.....	75
Figura 11: Efeito relaxante do LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com KCl 20 mM e KCl 45 mM.....	76
Figura 12: Efeito de L-NAME sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina.....	77
Figura 13: Efeito da indometacina sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina..	78
Figura 14: Efeito da indometacina e L-NAME, associados, sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina.....	79
Figura 15: E _{máx} do LQFM 021 quando incubado com L-NAME, INDOMETACINA e L-NAME + INDOMETACINA.....	80

Figura 16: Efeito do TEA sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina.....	81
Figura 17: Efeito do BaCl ₂ sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina.....	82
Figura 18: Efeito da glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina.....	83
Figura 19: Efeito da 4-aminopiridina (4-AP) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina.....	84
Figura 20: Efeito do clotrimazol sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina.....	85
Figura 21: Efeito máximo de relaxamento para LQFM 21 na presença (20 min) dos inibidores glibenclamida, clotrimazol, TEA, 4-AP, cloreto de bário em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina.....	86
Figura 22: Efeito da associação dos antagonistas: propranolol (P), escopolamina (E), saralazina (S) e hidroxizina (H) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com fenilefrina.....	87
Figura 23: Efeito máximo de contração para fenilefrina em três momentos do experimento de curva de relaxamento para LQFM 021 (E-) em aortas isoladas de ratos.....	88
Figura 24: Balb / c 3T3 NRU ensaio de citotoxicidade após 48h de exposição ao LQFM 021.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características bioquímicas das fosfodiesterases.....	24
Tabela 2.: Parâmetros da acoplagem e análise do acoplamento relativo à PDE-3.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de Ca ²⁺
4-AP	4-Aminopiridina
AC	Adenilato ciclase
AMPC	3' : 5'-monofosfato cíclico de adenosina
Ang II	Angiotensina-II
BaCl ₂	Cloreto de bário
CI ₅₀	Concentração inibitória do crescimento de 50% das células
COX	Ciclooxigenase
CPA	Ácido ciclopiazônico
DL ₅₀	Dose letal em 50% ds células
E ⁺	Com endotélio
E ⁻	Sem endotélio
EC ₅₀	Concentração que promove 50% da resposta máxima
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado de endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado de endotélio
E _{máx}	Efeito máximo
EPM	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina-1
GCs	Guanilato ciclase solúvel

GMPc	3' : 5'-monofosfato cíclico de guanosina
K _{ATP}	Canais de potássio dependentes de ATP
K _{Ca}	Canais de potássio ativados por Ca ²⁺
KCl	Cloreto de potássio
K _{ir}	Canais de potássio tipo retificador
K _v	Canais de potássio dependentes de voltagem
LQFM 021	5-(1-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-4)-2H-tetrazol
MDL-12.330A	<i>cis</i> -N-(2-Phenilciclopentil)-azaciclotridec-1-en-2-amina hidrócloride
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
ODQ	1H-[1,2,4]oxidazol[4,3-a]quinoxaline1-ona
PDE	Fosfodiesterase
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
RS	Retículo sarcoplasmático
TEA	Tetraetilamônio

RESUMO

A inibição das fosfodiesterases (PDEs) aumenta os níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos 3' : 5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e 3' : 5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), os quais tem muitos efeitos fisiológicos e bioquímicos, sobretudo no sistema cardiovascular. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos farmacológicos de um novo composto derivado do pirazol, LQFM 021, o qual foi apontado por estudos de modelagem molecular como possível inibidor de PDE-3. Para tanto, artérias aortas de ratos foram isoladas e montadas em banhos de órgão para registro da tensão isométrica do efeito relaxante do LQFM 021, em preparações pré-contraídas com fenilefrina. Foi analisada a participação do endotélio vascular, da guanilato ciclase solúvel (GCs) e da adenilato ciclase (AC), o papel dos canais de K^+ e de Ca^{2+} , além da contribuição da captação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático. Como resultado, foi demonstrado que o LQFM 021 induz relaxamento vascular (E_{max} : $54.9 \pm 6.0\%$), sendo este relaxamento potencializado pelo endotélio (E_{max} : $88.1 \pm 2.1\%$). A inibição da AC com MDL-12.330A ($10 \mu M$) ou da GCs com ODQ ($1 \mu M$), reduziram o relaxamento de $88,1 \pm 2,1\%$, para $48,35 \pm 3,01\%$ e $19,95 \pm 2,32\%$, respectivamente. A pré-contracção com KCl 45 mM ou o tratamento das preparações com TEA (5 mM), reduziram quase que por completo o efeito relaxante do composto. A inibição da Ca^{2+} /ATPase reticular com CPA ($10 \mu M$), reduziu o relaxamento estimulado pelo LQFM 021 em aproximadamente $66,5\%$. Curva concentração-resposta contrátil induzida pela fenilefrina ($0,1 \text{ nM}$ a $1 \mu M$) ou pelo $CaCl_2$ (0 a 3 mM , em meio zero-cálcio + fenilefrina) foram reduzidas pelo pré-tratamento das preparações com LQFM 021 (EC_{50}). Em conclusão, este estudo mostrou que o novo derivado sintético de pirazol LQFM 021 é um possível inibidor de PDE-3 e possui atividade vasorelaxante. O endotélio participa e potencializa o relaxamento estimulado pelo composto. A via da GCs e AC estão envolvidas no mecanismo de ação do LQFM 021. Também foi evidenciada a participação do retículo sarcoplasmático, bem como o fluxo de K^+ e de Ca^{2+} através da membrana celular.

ABSTRACT

The inhibition of phosphodiesterases (PDEs) increases intracellular levels of cyclic nucleotides 3':5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and 3':5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP), which has many physiological and biochemical effects, especially in cardiovascular system. The objective of this study was to analyze the pharmacological effects of a new compound derived from pyrazole, LQFM 021, which was indicated by molecular modeling studies as a possible inhibitor of PDE-3. For this purpose, aortas were isolated of rats and mounted in organ baths for isometric tension recording of the relaxing effect of LQFM 021, in preparations pre-contracted with phenylephrine. We analyzed the involvement of the vascular endothelium, soluble guanylate cyclase (sGC) and adenylate cyclase (AC), the role of K⁺ channels and Ca²⁺, besides the contribution of Ca²⁺ uptake by the sarcoplasmic reticulum. As a result, was demonstrated that the LQFM 021 induces vascular relaxation (E_{max}: 54.9 ± 6.0%), being this relaxation potentiated by endothelium (E_{max}: 88.1 ± 2.1%). The inhibition of AC with MDL-12.330A (10 μM) or of the sGC with ODQ (1 μM) reduced the relaxation of 88.1 ± 2.1%, to 48.35 ± 3.01% and 19.95 ± 2.32%, respectively. The pre-contraction with KCl 45 mM or treatment of preparations with TEA (5 mM), reduced almost completely the relaxing effect of the compound. Inhibition of Ca²⁺ / ATPase reticular with CPA (10 mM) reduced the relaxation stimulated by 021 LQFM approximately 66.5%. Concentration-response curve contractile induced by phenylephrine (0.1 nM to 1 μM) or by CaCl₂ (0-3 mM, zero-calcium + phenylephrine) were reduced by pretreatment of preparations with LQFM 021 (EC₅₀). In conclusion, this study showed that the new synthetic derivative of pyrazole LQFM 021 is a potential inhibitor of PDE-3 and has vasorelaxant activity. The endothelium potentiates the relaxation stimulated by the compound. The route of sGC and AC are involved in the mechanism of action of LQFM 021. Was also evidenced by participation from sarcoplasmatic reticulum, well as the flow of K⁺ and Ca²⁺ through the cell membrane.

1. Introdução

Os compostos pirazolínicos, ou pirazóis, são substâncias de origem sintética que possuem em sua estrutura um anel pirazolínico, que é um heterociclo de cinco membros com dois átomos de nitrogênio adjacentes e três de carbono. Seus derivados podem apresentar atividade antiinflamatória, analgésica, antipirética, antiarrítmica e tranquilizante (Borne, 1995; Gursoy et al., 2000). Sua atividade como vasodilatador ainda não foi descrita.

O relaxamento do músculo liso vascular é a base para o tratamento da hipertensão (Stokes, 2004). Vários agentes farmacológicos vasodilatadores têm sido sintetizados, mas nenhum deles teve uma ação específica, livre de efeitos colaterais. É importante encontrar vasodilatadores novos, com potencial para uso clínico e não associado a efeitos colaterais.

Estudos de química farmacêutica medicinal levaram a síntese de um novo protótipo a fármaco, o LQFM 21 concebido como possível inibidor de fosfodiesterases (PDEs).

1.1 Nucleotídeos cíclicos e relaxamento vascular

Os segundos mensageiros nucleotídeos cíclicos 3' : 5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e 3' : 5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), têm sido mostrados por regularem uma ampla variedade de processos bioquímicos e fisiológicos em diferentes tecidos do corpo. Na verdade, eles têm sido propostos por modular tantos processos diferentes que, até recentemente, tem sido difícil de entender como essas simples e pequenas moléculas de segundos mensageiros poderiam fornecer tanta especificidade de ação e diversidade de funções necessárias para essa regulação. Particularmente problemático tem sido o entendimento sobre como processos muito rápidos e muito lentos poderiam ser modulados pelos mesmos mecanismos (Beavo & Brunton, 2002).

Muitas funções celulares, incluindo eventos mecânicos e metabólicas, são regulados pelos nucleotídeos cíclicos. Eles atuam como segundos mensageiros e são responsáveis pela resposta a curto prazo e a longo prazo nas células musculares lisas. No músculo liso vascular, um número de processos são controlados pelo AMPc e pelo GMPc. Eles incluem eventos mecânicos e metabólicos que são regulados numa escala de tempo relativamente rápida. O tônus contrátil do músculo talvez seja o melhor exemplo disso. Mudanças mais lentas que são reguladas por nucleotídeos cíclicos incluem proliferação alterada em resposta a ferimentos ou mesmo a dessensibilização a longo prazo para estimulação crônica por drogas ou hormônios (Hofmann et al., 2000). Um aumento na concentração intracelular dos nucleotídeos AMPc e GMPc produz relaxamento do músculo liso vascular, por reduzir as concentrações intracelulares de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Giachini et al., 2011).

Em relação ao músculo cardíaco, AMPc/proteína quinase A (PKA) é um regulador primário de excitação-contração associado a fosforilação de canais de cálcio voltagem-dependentes, receptores de rianodina e proteínas do sarcômero, que aumenta e acelera a saída de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e estimula a contração do músculo estriado cardíaco. Pelo contrário, GMPc/proteína quinase G (PKG) é considerado um freio do miocárdio, contrariando a estimulação do AMPc e promovendo alguns efeitos estimulando vias alternativas para neutralizar a contração (Tsai & Kass, 2009).

Para manter o débito cardíaco, o coração humano bate mais de 100.000 vezes por dia a fim de cumprir o seu papel de fornecer nutrientes e oxigênio para os tecidos periféricos. Isto requer a capacidade de responder rapidamente a mudanças na demanda e adaptação a estresses crônicos decorrentes de estímulos fisiológicos ou patológicos. Central a este regulamento são os nucleotídeos cíclicos AMPc, GMPc, e suas respectivas enzimas efetoras, PKA e PKG (Kass et al., 2007; Kukreja et al., 2005).

O papel central do AMPc e GMPc na regulação celular tem feito esses alvos atraentes para intervenção terapêutica na insuficiência cardíaca. Até o momento, a ativação de AMPc tem sido difícil. Embora de forma aguda melhore a função cardíaca, a estimulação crônica de AMPc pode agravar o resultado e aumentar a mortalidade. Novas abordagens baseiam-se na proteína G acoplada a receptores, como o receptor

de quinase ou de cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) que podem oferecer alternativas benéficas, embora os testes clínicos estejam em seus estágios iniciais ou ainda não iniciados (Rengo et al., 2009). O GMPc também tem sido alvo, principalmente através do aumento da sua síntese por ação do óxido nítrico (NO) ou peptídeo natriurético atrial (ANP). O NO ativa a GCs, induzindo vasodilatação, e o efeito primário cardíaco observado é a modesta melhora da função diastólica. No entanto, taquifilaxia e outros efeitos indesejados e tóxicos tem limitado seu uso sustentado (Micheletti et al., 2007; Kawase & Hajjar, 2008).

1.2 Fosfodiesterases

No sistema cardiovascular, a pressão sanguínea é regulada por contração e relaxamento do músculo liso vascular e associação com funções do endotélio vascular. A contração de miócitos cardíacos é controlada com precisão para bombear o sangue para fora do coração para outras partes do corpo de acordo com as condições ambientais. Estes eventos na hemodinâmica são engenhosamente regulados por estimulação extracelular através da alteração dos níveis de nucleotídeos cíclicos citoplasmáticos, os quais são determinados por um balanço entre sua produção e sua degradação (figura 1) através das PDEs (Bender & Beavo, 2006; Cote, 2004; Giachini et al., 2011) .

Algumas substância como: acetilcolina, bradicinina, histamina, substância P e adenosina promovem liberação de NO do endotélio que ativa GCs no músculo liso vascular (MLV). Esta enzima converte GTP em GMPc que ativa a PKG levando ao relaxamento do MLV. PDEs hidrolisam GMPc inibindo o relaxamento do MLV. A ativação de alguns receptores no MLV, como por exemplo β -adrenoceptores ativa adenilato ciclase (AC) que converte ATP em AMPc que ativa PKA levando ao relaxamento do MLV. Tal efeito relaxante é cessado quando as PDEs hidrolisam AMPc. (Beavo & Reifsnyder, 1990).

Estudos recentes sobre nucleotídeos cíclicos mediando sinalização revelaram que o sinal para cada evento fisiológico é regulado por compartimentação

independentemente de certas moléculas de sinalização. Tal como acontece com todos os mensageiros de regulação, a amplitude e a duração dos sinais de nucleotídeos cíclicos são regidos por suas taxas de síntese e as taxas de degradação. As PDEs estão intimamente relacionadas com a regulação de transdução de sinal específico e, portanto, múltiplas PDEs desempenham papéis importantes na função de cada modulação celular (McConnachie et al., 2006).

Na maioria dos tecidos, a concentração e as ações dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc são regulados por PDEs. Múltiplas isoformas de PDEs foram isoladas de vários tecidos e elas têm sido caracterizadas pela sua especificidade de substrato, sua modulação por calmodulina ou por GMPc, as suas respostas farmacológicas aos fármacos e sua seqüência primária (Omori & Kotera, 2007; Beavo & Reifsnyder, 1990).

Teofilina e papaverina são dois fármacos com efeitos profundos sobre músculo liso que estavam entre os primeiros agentes em que seus efeitos farmacológicos foram atribuídos à sua capacidade de inibir o metabolismo de AMPc muscular. No entanto, inicialmente, múltiplas isoenzimas de PDEs não eram conhecidas e esses fármacos foram demonstrados mais tarde, em estudos subseqüentes, serem inibidores inespecíficos da enzima. A natureza ubíqua do sistema de enzimas de PDEs e as concentrações mais elevadas de fármacos muitas vezes necessárias para inibir o metabolismo de nucleotídeos cíclicos nos tecidos e órgãos sugeriram a alguns que esta abordagem não fornecia uma base racional para o uso de inibidores de PDEs para aumentar conteúdo de nucleotídeos cíclicos nos tecidos-alvo específico ou órgãos *in vivo* (Chasin & Harris, 1976).

Melhoria significativa nas pesquisas sobre PDEs nos últimos anos tem levado ao conhecimento de distintas famílias de isoenzimas de PDEs, à presença de diferentes concentrações dessas isoenzimas em tecidos e o interesse renovado no desenvolvimento de inibidores de PDEs como agentes terapêuticos. Uma abordagem integrativa que combina as técnicas de biologia molecular, química medicinal, enzimologia e farmacologia tem mostrado que essas isoenzimas são expressas em diferentes tipos de células, que são diferencialmente reguladas, e que elas são especializadas para servir funções distintas nas células em que são expressas. No caso de músculo liso vascular, drogas agindo sobre PDEs podem oferecer valor terapêutico

em patologias da artéria coronária, hipertensão, doenças vasculares periféricas e disfunção sexual masculina. O desenvolvimento de inibidores seletivos das PDEs célula-específicos deve levar a uma melhor orientação de tais agentes em tecidos-alvo específicos e órgãos (Polson & Strada, 1996).

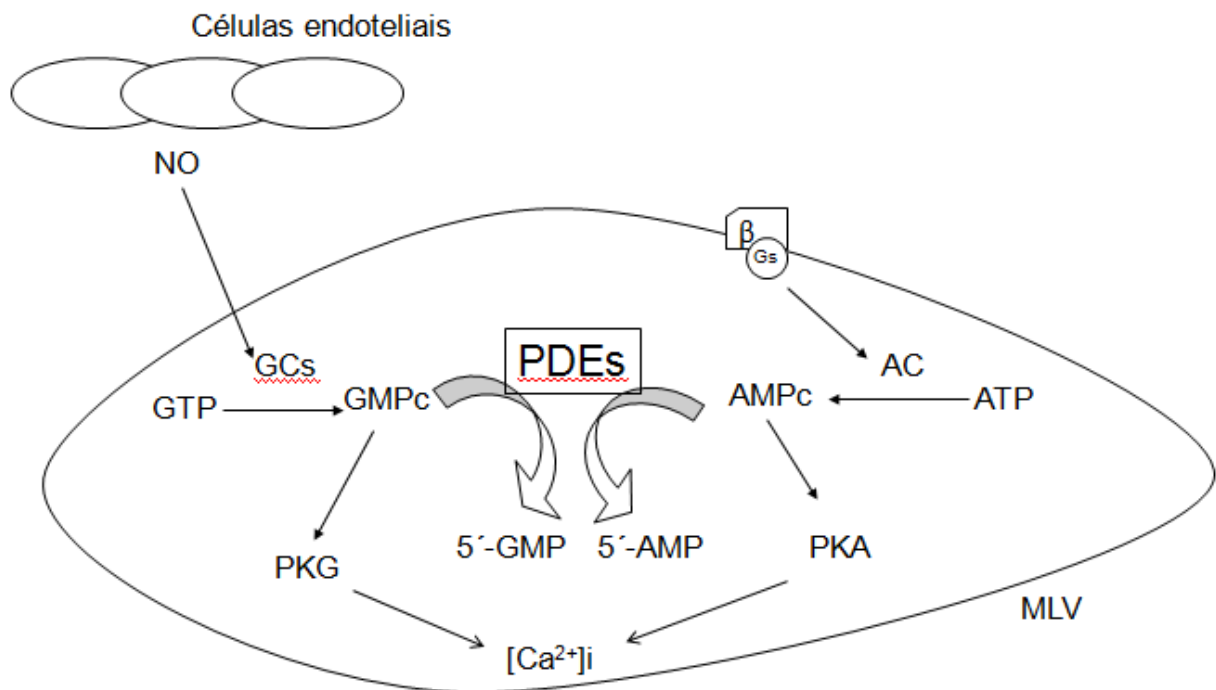


Figura 1. Esquema ilustrativo da ativação dos nucleotídeos cíclicos e sua degradação pelas PDEs. Acetilcolina, bradicinina, histamina, substância P e adenosina promovem liberação de NO do endotélio que ativa GCs no músculo liso vascular (MLV). Esta enzima converte GTP em GMPc que ativa a PKG levando ao relaxamento do MLV. PDEs hidrolisam GMPc inibindo o relaxamento do MLV. A ativação de alguns receptores no MLV, como por exemplo β -adrenoceptores ativa adenilato ciclase (AC) que converte ATP em AMPc que ativa PKA levando ao relaxamento do MLV. Tal efeito relaxante é cessado quando as PDEs hidrolisam AMPc. Adaptado de Beavo & Reifsnnyder (1990).

Em anos subseqüentes, muitos fármacos têm sido desenvolvidos, que prometem ser capazes de limitar os efeitos colaterais tóxicos da geração anterior. Participação adicional nesta área de desenvolvimento de medicamentos tem sido mais desencadeada pela promessa de que diferentes isoenzimas de PDEs tendo seqüências distintas de regulação e de sítios catalíticos devem permitir o desenvolvimento de agentes terapêuticos seletivos que podem ter como alvo alguns tipos específicos de nucleotídeos cíclicos em um número muito limitado de tipos celulares (Beavo et al., 1994).

Mais de três décadas se passaram desde que os nucleotídeos cíclicos e as PDEs se mostraram como principais representantes do mecanismo que células eucarióticas usam para concluir as ações do AMPc e do GMPc. Os primeiros agentes terapêuticos desenvolvidos cujas ações como fármacos eram baseadas na sua capacidade de inibir PDEs eram limitados pela natureza ubíqua da enzima em tecidos e pelas altas concentrações de drogas usualmente requeridas para inibir a atividade tanto *in vivo* como *in vitro* (Polson & Strada, 1996).

O uso de uma ampla variedade de abordagens genéticas sofisticadas para investigar as estruturas envolvidas na ligação do substrato e na regulação da enzima identificou metas específicas para projetos farmacológicos. Muitos dos novos fármacos que afetam as PDEs vasculares demonstraram ação vasodilatadora, cardiotônica, na anti-agregação plaquetária e na inibição da proliferação vascular, sugerindo valioso uso clínico em doenças cardiovasculares como terapia primária ou adjuvante (Conti et al., 1995).

PDEs são classificadas em classes I, II e III. Vinte e um genes classificados na classe I de PDEs têm sido identificados em humanos e ratos. Elas são categorizadas em 11 famílias diferentes baseado na similaridade das estruturas tal como homologia, os domínios de proteína e propriedades enzimáticas, incluindo especificidade do substrato, propriedades cinéticas e sensibilidade para os reguladores e inibidores endógenos como mostra a tabela 1 (Omori & Kotera, 2007).

Dependendo da espécie, as principais PDEs presentes na musculatura lisa arterial são PDE-1A, PDE-1B, PDE-1C, PDE-3A, PDE-3B e PDE-5. Em algumas espécies uma quantidade substancial de atividade de PDE-4 também é expressa no

músculo liso. Em condições basais (ou seja, pobre em níveis de cálcio), pensa-se que a PDE mais ativa para hidrolisar GMPc no músculo liso é a PDE-5 (PDE de ligação específica para GMPc). Em condições com níveis mais altos de cálcio (por exemplo, durante contração muscular e, possivelmente, em células que estão sendo estimulados para a divisão), uma ou mais das PDE-1 variantes podem se tornar predominantes. Embora a PDE-3 não tenha uma grande capacidade catalítica total como as outras duas, ela ainda pode desempenhar um papel no controle de AMPc e GMPc em compartimentos específicos da célula (Rybalkin et al., 2003).

A maioria dos estudos da atividade de PDEs são baseados no uso de inibidores farmacológicos *in vitro*. O papel preciso desempenhado por cada PDE pode variar entre as espécies de mamíferos (Zhang & Kass, 2011).

A PDE-1 é uma PDE estimulada pelo complexo cálcio/calmodulina e constitui uma grande família de enzimas, codificadas por três genes, PDE-1A, PDE-1B e PDE-1C. PDE-1 é capaz de hidrolisar tanto GMPc como AMPc, mas a especificidade pelo substrato difere entre os diferentes genes. PDE-1A e PDE-1B compartilham a mesma alta afinidade para GMPc, mas têm afinidades diferentes e inferiores para AMPc. A afinidade da PDE-1B pelo AMPc é maior do que a de PDE-1A. PDE-1C difere de ambos PDE-1A e PDE-1B pela sua capacidade de hidrolisar GMPc e AMPc igualmente bem (Sonnenburg, 1998).

A atividade da enzima PDE-1 tem sido previamente mostrada por ser importante para a regulação dos níveis vasculares de GMPc (Hagiwara et al., 1984). Muitos vasoconstritores como norepinefrina (NE), angiotensina II (Ang II), e endotelina-1 (ET-1) aumentam o cálcio intracelular, que é pensado por ser o principal mecanismo de contração do músculo liso vascular. Assim, a PDE-1 é a principal enzima responsável pela hidrólise do GMPc na aorta de coelho estimuladas com vasoconstritores tais como a noradrenalina (NE) (Chiu et al., 1988). Aumentos na concentração de Ca^{2+} por PDE-1A tem sido demonstrado em culturas de células musculares lisas de aorta de ratos. Por exemplo, verificou-se que a Ang II estimula a atividade da PDE-1A em células musculares lisas de aorta de ratos, provavelmente através de um aumento na concentração de cálcio mediado por Ang II. A inibição da PDE-1A bloqueou a ação da Angiotensina II gerando acúmulo de GMPc (Kim et al., 2001)

Tabela 1. Características bioquímicas das famílias de PDEs (Modificado Omori & Kotera, 2007).

Família	Gene	Substrato	Relação	Tecidos de maior expressão
PDE1	PDE1A	AMPc GMPc	regulação por cálcio/calmodulina	cérebro, coração, músculo liso e testículos
	PDE1B	AMPc		
	PDE1C	GMPc AMPc		
PDE2	PDE2A	GMPc AMPc	estimulada por GMPc	córtex da adrenal, cérebro e coração
	PDE3A	GMPc AMPc	inibida por GMPc	coração, músculo liso, tecido adiposo e plaquetas
PDE4	PDE3B	GMPc		
	PDE4A	AMPc	AMPc específica	ubíquo
	PDE4B			
	PDE4C PDE4D			
PDE5	PDE5A	GMPc	ligação à GMPc fotoreceptora	músculo liso, plaquetas, cerebelo retina
PDE6	PDE6A	GMPc		
	PDE6B			
	PDE6C			
PDE7	PDE7A	AMPc	insensível a rolipram	músculo esquelético, células do sistema imune e cérebro
	PDE7B			
PDE8	PDE8A	AMPc	AMPc específica	rins, testículos, fígado, tireóide, células do sistema imune
	PDE8B			
PDE9	PDE9A	GMPc	GMPc específica	cérebro e rins
PDE10	PDE10A	AMPc	inibida por AMPc, duplo substrato	cérebro, testículo
		GMPc		
		AMPc		
PDE11	PDE11A	GMPc	duplo substrato	próstata, testículo, músculo esquelético

A compreensão do papel da PDE-1 no coração intacto permanece limitada; um estudo testou apenas um inibidor seletivo (IC86340, que já não está disponível), mostrando redução na hipertrofia induzida por isoproterenol em ratos. O efeito dependente de GMPc/PKG contra a hipertrofia foi observado em cultura de células após o silenciamento de RNAm. Inibição de PDE-1A e PDE-5A teve um importante

efeito nesses estudos, apoiando a sugestão de que eles regulam diretamente a concentração de GMPc (Miller et al., 2009).

A vinpocetina (TCV-3B) é o principal inibidor seletivo de PDE-1. A vinpocetina parece inibir PDE-1 diretamente, em contraste com inibidores tais como calmidazolium e as fenotiazinas, que inibem a atividade PDE-1 ligando-se a calmodulina (Hagiwara et al., 1984; Hidaka & Endo, 1984). Foi demonstrado que vinpocetina inibiu PDE-1B com mais potência do que o tipo PDE-1A da PDE-1 (Weishaar et al., 1990). Além disso, a vinpocetina produz relaxamento dependente da concentração em aorta e a artéria pulmonar de coelhos e ratos (Souness et al., 1989; Weishaar et al., 1990). A PDE-1 pode ser mais importante na hidrólise de GMPc na aorta contraída do que em aorta não contraída, devido aos maiores níveis de Ca^{2+} citosólicos. (Ahn et al., 1989) Os efeitos relaxantes da vinpocetina em tiras de aorta de ratos foram bem reduzidos pelo azul de metileno, um inibidor da GCs, sugerindo que o relaxamento é dependente de fator relaxante derivado de endotélio (EDRF) estimulador da formação de GMPc (Souness et al., 1989).

PDE-2 pode hidrolisar GMPc in vitro, mas a sua hidrólise de AMPc aumenta também quando é estimulada pelo GMPc, comportamento observado na presença de estimulação dos receptores adrenérgicos (Mongillo et al., 2006). PDE-2 não foi detectada na maioria dos estudos sobre isoenzimas no músculo liso vascular. Foi relatado que há a presença de pequenas quantidades de PDE-2 em extratos solúveis de aorta porcina. Tendo em vista as pequenas quantidades que foram relatadas de PDE-2 no músculo liso vascular, parece improvável que esta família de isoenzima desempenhe um papel proeminente na regulação de nucleotídeos cíclicos neste tecido. No entanto, a falta de inibidores farmacológicos seletivos para PDE-2 tem dificultado os estudos para determinar se essa presunção é verdadeira (Saeki & Saito, 1993).

A família de PDE-3 contém dois genes, PDE-3A e PDE-3B. As duas isoformas de PDE-3 são diferencialmente expressas. PDE-3A é expressa no músculo liso vascular, plaquetas e cardiomiócitos. Em ratos e músculo liso vascular humano, tanto PDE-3A e PDE-3B são expressos, mas eles têm localizações subcelulares distintas (Liu & Maurice, 1998; Palmer & Maurice, 2000) PDE-3 é geralmente pensada por regular a maioria dos processos mediados pelo AMPc, como a contratilidade cardíaca, agregação

plaquetária, relaxamento da musculatura lisa, e regulação hormonal. PDE-3A e PDE-3B são expressas em muitos leitos de músculo liso vascular. Embora possam não ser os contribuintes principais para a hidrólise do GMPc nos leitos vasculares ou nos cardiócitos, as PDE-3 provavelmente são reguladas pelo GMPc *in vivo*. No entanto, a PDE-3 tem sítios catalíticos com alta afinidade e semelhança para AMPc e GMPc, mas a velocidade máxima de degradação do AMPc é muito maior (4 a 10 vezes) do que para GMPc. Portanto, o mecanismo pelo qual o GMPc inibe a atividade catalítica da PDE-3 é através da competição com o sítio catalítico do AMPc. Assim, GMPc atua como um interruptor transitório causando inibição da atividade hidrolítica do AMPc pela PDE-3 até que ele mesmo seja hidrolisado (Shakur et al., 2001).

Pouco se sabe sobre o envolvimento da PDE-3 na regulação da via de sinalização do GMPc. Alguns estudos têm mostrado que agentes que elevam os níveis de GMPc podem produzir um aumento nos níveis de AMPc por inibição da atividade da PDE-3 (Maurice & Haslam, 1990). PDE-3 também tem sido sugerida como um importante determinante dos efeitos do NO sobre a vasculatura renal (Sandner et al., 1999)

Inibidores da PDE-3 são potentes agentes relaxante na aorta. Amrinona e milrinona são inibidores da PDE-3 e portanto previne a quebra do AMPc. Os mecanismos de vasodilatação pelo aumento de AMPc nas células do músculo liso vascular são pensados por serem os seguinte: (1) estimulação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) a qual ativa a bomba de cálcio sarcolemal, (2) estimulação da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ a qual resulta na hiperpolarização e remoção de sódio e cálcio intracelular ou (3) aumento da desfosforilação das cadeias leves de miosina (Honerjager, 1989; Meisheri et al., 1980). Amrinona é um agente inotrópico positivo o qual altera favoravelmente a hemodinâmica em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (Mancini et al., 1985; Benotti et al., 1978). Juntamente com a sua ação inotrópica, a propriedade vasodilatadora da amrinona pode contribuir para o aumento do débito cardíaco nesses pacientes (Le Jemtel et al., 1979). Embora o mecanismo da ação inotrópica do agente tenha sido amplamente discutida (Endoh et al., 1982; Farah & Alousi, 1978), os fatores relacionados com as propriedades de vasodilatação são mal compreendidos.

Milrinona e amrinona são mais potentes relaxantes de coronárias do que de anéis de artérias cerebral e renal (Harris et al., 1989). Embora os efeitos relaxantes dos inibidores de PDE-3 sejam praticamente os mesmos em artérias mesentéricas humanas e veias mesentéricas pré-contraídas com norepinefrina (Lindgren et al., 1989), as artérias foram mais sensíveis do que as veias para a prevenção de contrações induzidas pela noradrenalina em tratamento prévio com inibidores da PDE-3. Tendo em conta as sensibilidades diferenciais dos vasos sanguíneos, os efeitos de inibidores de PDE-3 *in vivo* dependem dos efeitos combinados em vários leitos vasculares, bem como a interação com estimuladores da GCs endógenos e dependência da atividade da AC basal. Além de seus conhecidos efeitos inotrópico positivo sobre o coração, os inibidores da PDE-3 *in vivo* reduzem a resistência periférica total, aumentam o fluxo sanguíneo coronariano, reduzem a resistência vascular pulmonar e reduzem a pressão atrial direita. (Komas et al., 1991).

A PDE-4 tem atividade específica para AMPc. Tem sido demonstrada em um grande número de tecidos de músculo liso vascular, dentre eles: bovinos (Ivorra et al., 1992), suínos (Saeki & Saito, 1993) aorta, mesentério de ratos e tecido pulmonar humano (Komas et al., 1991). Em contraste com os inibidores de PDE-3, os inibidores de PDE-4 usados sozinhos são geralmente pobres relaxantes de vasos sanguíneos isolados.

Atividade de PDE-5 específica para GMPc tem sido demonstrada em aortas de humanos (Lugnier et al., 1986) , bovinos (Weishaar et al., 1990), ratos (Harris et al., 1989), suínos (Beavo et al., 1994), cobaias (Harris et al., 1989), cães, e coelhos (Weishaar et al., 1990); mesentério de ratos (Komas et al., 1991), humanos (Rabe et al., 1994) e coelhos (Weishaar et al., 1990) Artéria pulmonar; e veia safena humana (Komas et al., 1991). Esses investigadores especularam que a PDE-5 é a isoenzima predominante envolvida na hidrólise de GMPc na aorta.

PDE-5 tem sido encontrada em todos os tipos de células musculares lisas vasculares e viscerais (útero, intestino). A importância fisiológica da PDE-5 na regulação do tônus do músculo liso tem sido mais efetivamente demonstrado pelo sucesso no uso clínico do inibidor específico, sildenafil (Viagra[®], Pfizer Pharmaceuticals), no tratamento da disfunção erétil (Boolell et al., 1996).

PDE-5A foi a primeira PDE seletiva para GMPc a ser descoberta e também é ativada pelo GMPc, que se liga ao seu domínio regulatório GAF (Kybalkin et al., 2003). É expresso em músculo liso vascular, endotélio e fibroblastos. Muitos laboratórios têm também relatado sua expressão em miócitos cardíacos, embora a níveis muito mais baixos do que no pulmão (Takimoto et al., 2005). O aumento da expressão e da atividade da PDE-5 no homem e no camundongo causa hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca (Pokreisz et al., 2009), a redução da atividade de GMPc e PKG contribui para a fisiopatologia. Tal regulação aumentada talvez esteja associada ao estresse oxidativo do miocárdio (Lu et al., 2010). PDE-5A é regulada por um ciclo de feedback negativo pelo qual aumento dos níveis de GMPc e atividade PKG estimulam a atividade hidrolítica para reduzir os níveis de GMPc.

PDE-6, PDE-7 e PDE-8 são insensíveis ao IBMX (inibidor das PDEs não seletivo) e têm pouca ou nenhuma importância em leitos vasculares (Gamanuma et al., 2003; Omori & Kotera, 2007). Descobriu-se recentemente que PDE-9 tem alta afinidade para GMPc e é uma PDE-seletiva para GMPc. É expressa em testículos, cérebro, músculo esquelético e coração. A maioria dos estudos têm centrado sobre o efeito da PDE-9 nas síndromes neurais, tais como transtornos afetivos e perda de memória. Pesquisas sobre o seu papel cardíaco esta em estágio inicial. PDE-10 e PDE-11 hidrolizam tanto AMPc como GMPc, porém, também apresentam pouco ou nenhuma importância em músculos lisos vasculares (Fujishige et al., 1999; Omori & Kotera, 2007).

1.3 Envolvimento do GMPc, dos canais de K⁺ e dos canais de Ca²⁺ no relaxamento vascular

Elevação do GMP cíclico no músculo liso vascular também pode estar relacionado à presença do endotélio, que libera NO (Furchgott & Zawadzki, 1980). NO pode rapidamente interagir com músculo liso subjacente para ativar a guanilato ciclase citosólica e aumentar o conteúdo de GMPc (Komas & colaboradores, 1991; Bucci et al., 2010), estudaram o efeito relaxante em aorta de ratos dos inibidores da PDE-3 e PDE-

4. Estas duas PDEs são de particular interesse, uma vez que preferencialmente catalisam a hidrólise de AMPc. Estes pesquisadores verificaram que os inibidores específicos da PDE-3 produziram um relaxamento independente de endotélio, mas o efeito relaxante dos inibidores de PDE-4 foram dependentes da presença de um endotélio funcional e realçado por agentes que elevam GMPc ou por um inibidor da PDE-3. No total, esses resultados sugerem que na aorta de ratos, GMPc exerce uma potencialização do efeito sobre a ação mediada por AMPc relaxante. O mecanismo proposto é que GMPc aumente o AMPc através da inibição da PDE-3 em plaquetas (Maurice & Haslam, 1990) e em preparações vasculares (Komas et al, 1991).

Está bem estabelecido que o NO, o ANP, e vários outros vasodilatadores endógenos regulam o tônus da musculatura lisa através da ativação da GCs, elevação do GMPc e ativação de PKG. Os efeitos do NO/GMPc no relaxamento do músculo liso parece ser mediada especificamente por PKG e não pela PKA, porque em camundongos com deficiência de PKG-1, o relaxamento do músculo liso de aortas induzido por GMPc é completamente abolido, enquanto o relaxamento dependente de AMPc não é afetado (Hofmann et al., 2000). Existem muitos substratos fisiológicos específicos para PKG no músculo liso, incluindo a subunidade de ligação a miosina regulatória da miosina fosfatase (Surks et al., 1999), canais de K^+ ativados por cálcio (Fukao et al., 1999) e receptor de IP3 (Schlossmann et al., 2000). A fosforilação de todos esses alvos contribui para redução das $[Ca^{2+}]_i$ ou redução na sensibilidade ao Ca^{2+} e assim diminui o tônus do músculo liso (Schlossmann et al., 2003).

O relaxamento da musculatura lisa vascular pelo NO envolve a estimulação da enzima GCs com o conseqüente aumento na produção de GMPc (Fleming & Busse, 1999). Este, por sua vez, estimula a PKG que por diversos mecanismos promove um relaxamento da musculatura lisa vascular. A PKG pode ativar canais de K^+ induzindo hiperpolarização ou estimular a saída de Ca^{2+} do citoplasma da célula, o que leva à vasodilatação (Rapoport & Murad, 1983). A PKG pode, igualmente, diminuir a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} , diminuindo a contração muscular (Rapoport & Murad, 1983). A ativação de canais de K^+ diretamente pelo NO sem envolver a participação do GMPc também já foi descrita (Bolotina et al., 1994).

A estimulação dos receptores da prostaciclina leva a uma estimulação da AC produzindo um aumento de AMP cíclico e estimulação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) no músculo liso vascular. A PKA tem um efeito semelhante a PKG, podendo ativar canais de K^+ sensíveis ao ATP induzindo hiperpolarização e estimula a saída de Ca^{2+} do citosol inibindo a maquinaria contrátil. Além do NO e da prostaciclina, o endotélio vascular produz um terceiro fator relaxante que produz hiperpolarização no músculo liso vascular, resistente a inibidores da ciclooxygenase (COX) e da óxido nítrico sintase (NOS) (Mombouli & Vanhoutte, 1999). Esse tipo de relaxamento dependente do endotélio é observado sem nenhum aumento nos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) nas células musculares lisas (Mombouli & Vanhoutte, 1997).

Em condições fisiológicas a prostaciclina, prostaglandina vasodilatadora, é o principal metabólito endotelial derivado do ácido araquidônico gerado pela via da COX (Vanhoutte, 1999). No entanto, também existe a formação de pequenas quantidades de prostanóides vasoconstritores como a prostaglandina H_2 (PGH_2) e o tromboxano A_2 (Moncada & Vane, 1979). Em circunstâncias normais, o efeito vasoconstritor da PGH_2 e do tromboxano A_2 é mascarado pelo efeito vasorrelaxante da prostaciclina, do NO e do EDHF (Mombouli & Vanhoutte, 1999).

A ativação de canais de potássio nas células musculares lisas vasculares pode causar vasodilatação e aumentar o fluxo sanguíneo e causar diminuição da pressão sanguínea. A inibição destes canais causa vasoconstrição. Vários tipos de canais de potássio foram identificados (canais K_v , K_{Ca} , K_{ir} e K_{ATP}) como reguladores do potencial de membrana das células musculares lisas vasculares. Os canais K_v , regulam o potencial de membrana em resposta à despolarização da membrana; os canais K_{Ca} , respondem a alterações dos níveis de Ca^{2+} intracelular para regularem o potencial de membrana. Os canais K_{Ca} , parecem ter um papel fundamental na regulação do tônus das artérias de maior resistência. Estes canais auxiliam na regulação da resposta arterial à pressão e vasoconstritores. Os canais K_{ir} , parecem mediar a vasodilatação induzida pelo K^+ extracelular. Os canais de K_{ATP} constituem o alvo de numerosos estímulos vasodilatadores, incluindo a hipóxia e adenosina (Sobey, 2001).

O potencial de membrana das células musculares lisas regula primariamente a contratilidade muscular mediante alterações da entrada de íons Ca^{2+} para o citosol através de canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem. O potencial de membrana pode também regular a concentração de Ca^{2+} citosólico através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ assim como através da libertação de Ca^{2+} intracelular resultante da produção de trifosfato de inositol (IP_3) dependente da voltagem (o IP_3 fixa-se a canais específicos ligando dependentes, no reticulo endoplasmático promovendo deste modo a libertação de íons Ca^{2+} para o citosol aumentando desse modo a sua concentração). A relação existente entre o influxo de Ca^{2+} através de canais dependentes da voltagem e o potencial de membrana pode ser tal que variações de 3mv (despolarização ou hiperpolarização) podem aumentar ou diminuir o influxo. Pode-se deste modo concluir que a hiperpolarização da membrana através da abertura de canais iônicos, como os de potássio constitui um mecanismo poderoso na diminuição da pressão arterial, mediante vasodilatação provocada e o relaxamento produzido por nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc envolve os canais de K^+ (Nelson & Quayle, 1995).

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Foram realizados estudos farmacológicos para verificar a possível atividade biológica pela ocorrência do relaxamento induzido pelo LQFM 021 em anéis de aortas isoladas de ratos.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudar o efeito relaxante do LQFM 021 em aortas isoladas e verificar a participação do endotélio vascular
2. Verificar o envolvimento das enzimas COX (ciclooxigenases) e NOS (óxido nítrico sintase) no efeito de relaxamento induzido pelo LQFM 021.
3. Analisar o efeito do LQFM 021 sobre a captação de Ca^{2+} pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático.
4. Estudar o efeito dos canais de potássio da membrana das células do músculo liso após o bloqueio farmacológico ou despolarização com KCl.
5. Avaliar a influência das vias NO/GCs/GMPc e AC/AMPC no relaxamento induzido pelo LQFM 021.
6. Analisar a influência do LQFM 021 sobre a contração mediada pelo influxo de Ca^{2+} estimulado por fenilefrina.
7. Avaliar a influência dos receptores β , muscarínicos, histamínicos e de angiotensina sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021.

3. Metodologia

3.1 Experimentos em anéis de aortas isoladas de ratos

Foram utilizados ratos Wistar machos (200-230g) provenientes do Biotério Central da UFG. Estes protocolos foram submetidos à análise e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFG.

Os ratos foram sacrificados por exanguinação pela artéria aorta abdominal após anestesia superficial com éter etílico. A aorta foi isolada e os tecidos conjuntivos e gordurosos foram removidos. As aortas isoladas foram seccionadas em anéis de aproximadamente 4mm, montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles conectado a um transdutor de força para registro da tensão isométrica e o outro fixo à cuba para órgão isolado como no esquema abaixo. As respostas contráteis foram registradas num polígrafo multi-miógrafo (Narco Biosystems Inc., Houston, Texas-USA), acoplado a um programa computadorizado (WinDaq, DATAQ Instruments, OH, USA) para registro da tensão isométrica. Os anéis foram colocados em câmaras para órgãos isolados contendo solução de Krebs modificada com a seguinte composição em mM: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; CaCl_2 1,6; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 14,9; glicose 5,5; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para realização dos protocolos experimentais, as preparações foram submetidas à tensão basal de 1g determinada de acordo com a padronização do nosso laboratório com os ensaios de curva de tensão isométrica como apresentado na figura 3. Após a montagem das preparações na cuba de banho experimental, as preparações permaneceram estabilizando na tensão basal por um período mínimo de 40 min antes do início dos protocolos experimentais.

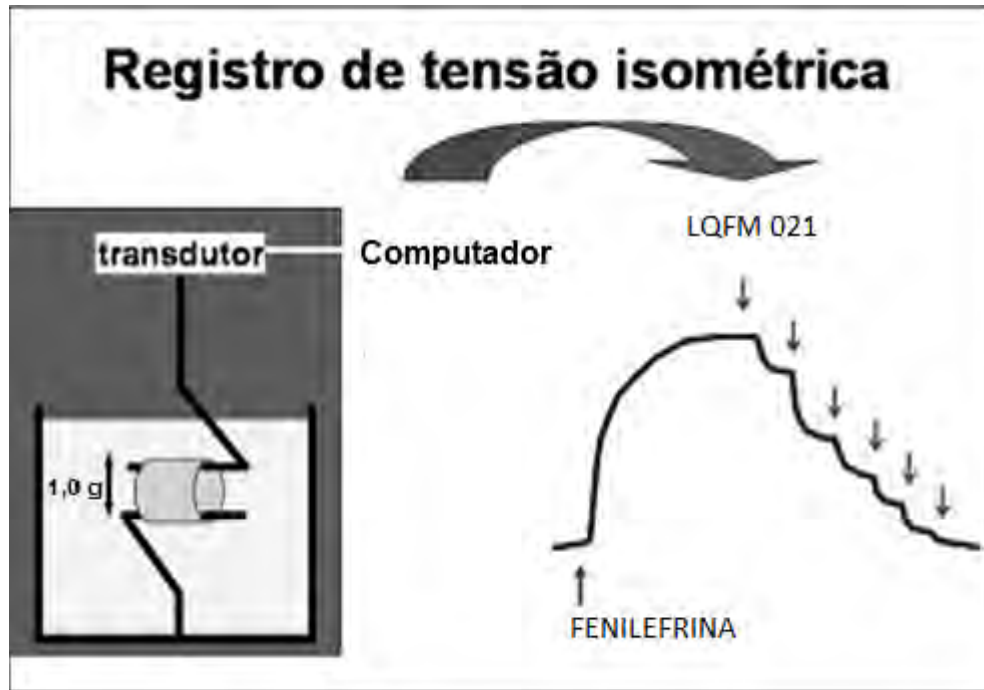


Figura 2. Esquema ilustrativo das preparações isoladas e do registro da tensão isométrica, contração com fenilefrina e relaxamento com concentrações crescentes e cumulativas do composto LQFM 021.

Em algumas preparações o endotélio foi removido mecanicamente. A retirada do endotélio se deu por ação mecânica, friccionando o lúmen do anel da aorta contra uma haste de metal e a efetividade de remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina ($1 \mu\text{M}$) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina ($0.1 \mu\text{M}$). Para estudos em preparações com endotélio, os anéis foram descartados quando o relaxamento à acetilcolina foi menor que 80%.

3.1.1 Efeito relaxante do LQFM 21 em anéis de aorta com endotélio (E^+) e sem endotélio (E^-) pré-contraídos com fenilefrina

Curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas foram realizadas em preparações E⁺ e E⁻ pré-contraídos com fenilefrina. Quando a resposta contrátil atingiu o platô, foram adicionadas concentrações crescentes do LQFM 021 (1 µM a 300 µM) e as respostas relaxantes foram registradas. Em outros experimentos, o mesmo protocolo foi repetido somente com o veículo (DMSO) nas mesmas concentrações.

3.1.2 Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase e da adenilato ciclase sobre o relaxamento desencadeado pelo LQFM 021

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto sobre a pré-contracção induzida com a EC₅₀ da fenilefrina (0,1 µM) na ausência e na presença (20 min) do inibidor seletivo da GCs, o (1*H*)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-*a*)quinoxalin-1-one (ODQ, 1µM) ou do inibidor seletivo da AC (MDL-12.330A, 10 µM), com o objetivo de verificar a participação das enzimas no relaxamento vascular induzido pelo composto LQFM 021.

3.1.3 Efeito relaxante do composto teste frente à pré-contracção dos anéis de aortas com KCl

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o LQFM 021 em preparações de anéis de aortas pré-contraídas com KCl 20 mM e KCl 45 mM, com o objetivo de avaliar o efeito relaxante do LQFM 021 frente a despolarização da membrana. A solução de KCl foi colocada no banho de órgãos no lugar da solução de Krebs. A osmolaridade da solução nutritora foi mantida com a redução da concentração de NaCl.

3.1.4 Efeito do bloqueador dos canais para K⁺ sobre o relaxamento

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto em aortas pré-contraídas com a EC₅₀ do agonista, na ausência e na presença (20 min) do bloqueador não seletivo dos canais para K⁺, tetraetilamônio (TEA 5 mM). Após análise dos resultados, inibidores mais seletivos foram utilizados como a 4-aminopiridina (1 mM, bloqueador de canais K_v); cloreto de bário (30 μM, bloqueador de canais K_{ir}); glibenclamida (3 μM, bloqueador de canais K_{ATP}) e clotrimazol (5 Mm, bloqueador de canais K_{Ca}), para verificar a participação dos canais para K⁺ no relaxamento induzido pelo LQFM 021.

3.1.5 Efeito da captação de Ca²⁺ intracelular pelo retículo sarcoplasmático e pela mitocôndria.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o LQFM 021 em aorta na ausência ou na presença (20 min) do inibidor da bomba Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático, Ácido ciclopiazônico (CPA, 10 μM).

3.1.6 Curva concentração-efeito para o agonista contrátil (fenilefrina) na ausência e presença do LQFM 021

Foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas em aortas isoladas de ratos para fenilefrina (0,1 nM a 1μM), na ausência e na presença da EC₁₀₀ (25 μM)

do LQFM 021 com o objetivo de analisar a influência do composto teste sobre a atividade contrátil da fenilefrina.

3.1.7 Efeito de incrementos na concentração extracelular de Ca^{2+} sobre a resposta contrátil estimulada com fenilefrina

Após estabilização, as preparações de aortas foram estimuladas com fenilefrina, até que as amplitudes das contrações se reproduziram. As preparações foram estimuladas com EC_{50} do agonista ($0,1 \mu\text{M}$), em solução de Krebs zero- Ca^{2+} até o desaparecimento da resposta, ou seja, a depleção dos estoques de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático sensíveis ao agonista. A seguir, as preparações foram mantidas em solução de Krebs zero- Ca^{2+} na presença (20 min) ou ausência da EC_{100} ($25 \mu\text{M}$) do LQFM 021 e foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para CaCl_2 (0 a 3 mM).

3.1.8 Efeito do inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) e da ciclooxigenase (COX) sobre o relaxamento induzido pelo composto LQFM 021

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o composto teste em aortas após a pré-contracção induzida com a EC_{50} do respectivo agonista ($0,1 \text{ nM}$) na ausência e na presença (20 min) do inibidor da NOS, L-NAME ($100 \mu\text{M}$) ou do inibidor da COX, indometacina ($10 \mu\text{M}$), com o objetivo de verificar o envolvimento da NOS e da COX no relaxamento induzido pelo LQFM 021.

3.1.9 Efeito de antagonistas de receptores β -adrenérgicos, muscarínico, histamínico e de angiotensina II sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021

Foram colocados na cuba para órgão isolado: propranolol, (10 μ M) escopolamina (10 μ M), hidroxizina (10 μ M) e saralazina (3 μ M), que são antagonistas não seletivo de receptores β -adrenérgicos, muscarínicos, histamínico do tipo H₁ e de angiotensina II (AT₁ e AT₂), respectivamente. Após 20 min de incubação com esses antagonistas a preparação foi contraída com fenilefrina e foi feita a curva de relaxamento para LQFM 021.

3.1.10 Contrações com fenilefrina ao final do experimento da curva de relaxamento do composto LQFM 021 (E⁻) em aortas isoladas de ratos, para avaliação da viabilidade das preparações

Verificar o efeito máximo de contração com fenilefrina dos anéis de aorta em três momentos: no primeiro momento ao testar as preparações, no segundo momento antes de iniciar a curva de relaxamento com o composto LQFM 021 (E⁻) e no terceiro momento para testar se as preparações permaneciam viáveis.

3.2 Análise estatística

Os resultados de tensão isométrica foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) de pelo menos quatro experimentos (n=4-6), obtidos de diferentes

animais. Os gráficos foram realizados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation) na versão 3.02 de 2001.

A análise estatística que foi utilizada para comparação entre os grupos foi a análise de variância variada (ANOVA) one-way, seguido do pós-teste de Newman-Keuls pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.02, 2001). Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para que as diferenças sejam consideradas estatisticamente significativas.

5. Conclusão

Esse estudo mostrou que o novo derivado sintético de pirazol LQFM 021 é um possível inibidor de PDE-3, como evidenciado por estudos de modelagem molecular, e possui atividade vasorelaxante. O endotélio participa e potencializa o relaxamento estimulado pelo composto, possivelmente devido à formação de NO e prostaciclina. As vias da GCs e AC estão envolvidas no mecanismo de ação do composto, bem como o fluxo K^+ e de Ca^{2+} através da membrana celular. Os receptores: β -adrenérgicos, muscarínicos, de angiotensina II e histamínicos H1 não estão envolvidos no mecanismo relaxante do composto. Em relação à segurança, o LQFM 021 teve alguns sinais de toxicidade quando administradas doses de 2000mg/kg; apenas sinais clínicos de apatia e parestesia na parte posterior das pernas foram observados, indicando que o LQFM 021 é bem tolerado na toxicidade aguda oral.

6. Perspectivas

O novo derivado pirazólico LQFM 021 é um protótipo a fármaco com efeito vasodilatador em aortas de ratos. Seu efeito deve ser testado *in vivo* em ratos hipertensos, bem como seu efeito *ex vivo* em coração isolado ainda deve ser avaliado. Será de grande relevância também experimentos em aortas isoladas para inibição enzimática da PDE e quantificação de AMPc e GMPc, para que se possa obter a certeza do efeito inibidor sobre a PDE. Os resultados obtidos com esse trabalho contribuem muito para a pesquisa cardiovascular pois o conhecimento de novos compostos vasodilatadores trazem esperanças de tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais para os pacientes hipertensos.

7. Referências Bibliográficas

AHN, H.S; CRIM, W.; ROMANO, M. Effects of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rabbit aorta. **Biochem. Pharmacol.** 38, 3331-39, 1989.

BARNES, P.J.; ADCOCK, I.M. Transcription factors and asthma. **Eur Respir J** 12, 221-34, 1998.

BEAVO, J.A; BRNTON, L.L. Cyclic nucleotide research: still expanding after half a century. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 3, 710–718, 2002.

BEAVO, J.A; REIFSNYDER, D.H. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. **Trends Pharmacol. Sci.** 11, 150-155, 1990.

BEAVO, J.A; CONTI, M.; HEASLIP, R.J. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Mol. Pharmacol.** 46, 399-405, 1994.

BENDER A. T, BEAVO J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacol Rev.** 58, 488–520, 2006.

BENOTTI, J.R.; GROSSMANN, W.; BRAUNWALD, E.; et al. Hemodynamic assessment of amrinone. **N. Engl. J. Med.** 299, 1373-1377, 1978.

BOLOTINA, B.M; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nat** 368, 850-3, 1994.

BOOLELL, M.; ALLEN, M.J.; BALLARD, S. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **Int J Impot Res.** 8, 47–52, 1996.

BORNE, R.F. Nonsteroidal anti - inflammatory drugs. **Med Chem** 535-580, 1995.

BOSWELL-SMITH, V.; SPINA, D.; CLIVE, P. Phosphodiesterase inhibitors. **Page Brit J of Pharmacol** 147, S252–S257, 2006.

BUCCI, M.; PAPAPETROPOULOS, A.; VELLECO, V.; ZHOU, Z.; PYRIOCHOU, A.; ROUSSOS, C.; ROVIEZZO, F.; BRANCALEONE, V.; CIRINO, G. Hydrogen Sulfide Is an Endogenous Inhibitor of Phosphodiesterase Activity. **Art, Thr, and Vas Biol** 2010.

CARDILLO, C.; KILCOYNE, C.M. Decreased vasodilation response to isoproterenol during nitric oxide inhibition in humans. **Hypertens** 30, 918–921, 1997.

CHASIN, M.; HARRIS, D.N. Inhibitors and activators of cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Adv. Cycl. Nucl. Res.** 7, 225-64, 1976.

CHIU, P.J; TETZLOFF, G.; AHN, H.S. Comparative effects of vinpocetine and 8-Br-cyclic GMP on the contraction and ⁴⁵Ca-fluxes in the rabbit aorta. **Am J Hypertens.** 1, 262–268, 1988.

CONTI M, NEMOZ G, SETTE C, VICINI E. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **Endocr. Rev.** 16, 370-89, 1995.

COTE, R.H. Characteristics of photoreceptor PDE (PDE6): similarities and differences to PDE5. **Int J Impot Res.** 16, S28 –S33, 2004.

ENDO, M.; YAMASHITA, S.; TAIRA, N. Positive inotropic effect of amrinone in relation to cyclic nucleotide metabolism in the canine ventricular muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 221, 775-783, 1982.

FARAH, A.E.; ALOUSI, A.A. New cardiogenic agents: a search for digitalis substitute. **Life Sci.** 22, 1139-1148, 1978.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc Res** 43, 532-41, 1999.

FUJISHIGE, K.; KOTERA, J.; MICHIBATA, H. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). **J Biol Chem.** 274, 18438 –18445, 1999.

FUKÃO, M.; MASON, H.S.; BRITTON, F.C. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. **J Biol Chem.** 274, 10927–10935, 1999.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nat** 288, 373–376, 1980.

GAMANUMA, M.; YUASA, K.; SASAKI, T. Comparison of enzymatic characterization and gene organization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family in humans. **Cell Signal.** 15, 565–574, 2003.

GIACHINI, F. R.; LIMA, V. V. ; CARNEIRO, F. S.; TOSTES, R. C. Decreased cGMP Level Contributes to Increased Contraction in Arteries From Hypertensive Rats Role of Phosphodiesterase 1. **Hipertens** 2011.

GURSOY, A.; DEMIRAYAK, S. Synthesis and Preliminary evaluation of new 5-pyrazolinone derivatives as analgesics agents. **Eur. J. Med. Chem.** 35, 359-364, 2000.

HAGIWARA, M.; ENDO, T.; HIDAKA, H. Effects of vinpocetine on cyclic nucleotide metabolism in vascular smooth muscle. **Biochem Pharmacol.** 33, 453–457, 1984.

HARRIS, A.L.; LEMP, B.M.; BENTLEY, R.G. Phosphodiesterase isozyme inhibition and the potentiation by zaprinast of endothelium-derived relaxing factor and guanylate cyclase stimulating agents in vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 249, 39, 1989.

HIDAK, H.; ENDO, T. Selective inhibitors of three forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase-basic and potential clinical applications. **Adv. Cycl. Nucleotide Protein Phosphorylation. Res.** 16, 245-76, 1984.

HIRATA, S.; ENOKI, T.; KITAMURA, R. Effects of isoflurane on receptor-operated Ca^{2+} channels in rat aortic smooth muscle. **Br. J. Anaesth.** 81, 578–583, 1998.

HYSLOP, S.; NUCCI, G. The mechanisms and significance of the coupled release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and prostacyclin (PGI₂) from endothelial cells. **Wien Klin Wochenschr.** 103, 422–434, 1991.

HOFMANN, F.; AMMENDOLA, A.; SCHLOSSMANN, J. Rising behind NO: cGMPdependent protein kinases. **J Cell Sci.** 113, 1671–1676, 2000.

HONERJAGER, P. Pharmacology of positive inotropic phosphodiesterase III inhibitors. **Eur Heart J** 10, 25-31, 1989.

ITOH, H.; SATO, Y.; TANIGUTHI, K. Differences between vasorelaxant responses of the canine and human mesenteric arteries and veins to amrinone. **Eur. J. Pharmacol.** 218, 347-349, 1992.

IVORRA, M.D.; LE BEC, A.; LUGNIER, C. Characterization of membrane-bound cyclic nucleotide phosphodiesterases from bovine aortic smooth muscle. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 19, 532-4, 1992.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORRI, M. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol. Rev.** 49, 157–230, 1997.

KASS, D.A. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. **Cardiovasc. Res.** 75, 303–314, 2007.

KAWASE, Y.; HAJJAR, R.J. The cardiac sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases. **Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.** 5, 554–565, 2008.

KIM, D.; RYBALKIN, S.D.P.X.; WANG, Y. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. **Circ.** 104, 2338–2343, 2001.

KOMALAVILAS, P.; LINCOLN, T.M. Phosphorylation of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. **J.Biol. Chem.** 271, 21933-21938, 1996.

KOMAS, N.; LUGNIER, C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases from rat mesenteric artery. **Eur. J. Pharmacol.** 208, 85-87, 1991.

KUKREJA, R.C. Pharmacological preconditioning with sildenafil: basic mechanisms and clinical implications. **Vascul. Pharmacol.** 42, 219–232, 2005.

LEE, C.H.; POBURKO, D.; SAHOTA, P. The mechanism of phenylephrine-mediated $[Ca^{2+}]_i$ oscillations underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava. **J. Physiol.** 534, 641–650, 2001.

LEE, T.S.; HOU, X. Comparative vasoactive effects of amrinone on systemic and pulmonary arteries in rabbits. **Chest** 108, 1364-1367, 1995.

LE JENTEL, T.H.; KEUNG, E.; SONNENBLICK, E.H. Amrinone: A new non-glycosidic, non-adrenergic cardiotoxic agent effective in the treatment of intractable myocardial failure in man. **Circ** 59, 1098-1104, 1979.

LINCOLN, T.M. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{2+} by cyclic AMP in vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.** 258, C399-C407, 1990.

LINDGREN, S.; ANDERSSON, K.E. Comparison of the effects of milrinone and OPC 3911 with those of isoprenaline, forskolin and dibutyrylcAMP in rat aorta. **Gen. Pharmacol.** 22, 617± 624, 1991.

LIU, H.; MAURICE, D.H. Expression of cyclic GMP-inhibited phosphodiesterases 3A and 3B (PDE3A and PDE3B) in rat tissues: differential subcellular localization and regulated expression by cyclic AMP. **Br J Pharmacol.** 125, 1501–1510, 1998.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacol Ther.** 109, 366-98, 2006.

LU, Z. Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. **Circ** 121, 1474–1483, 2010.

LUGNIER, C.; SCHOEFFER, P.; LE BEC, A. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. **Biochem. Pharmacol.** 35, 1743-1751, 1986.

MANCINI, D.; LE JENTEL, T.; SONNENBLICK, E. Intravenous use of amrinone for the treatment of the failing heart. **Am. J. Cardiol.** 56, 8B-15B, 1985.

MANGANIELLO, V.C.; TAIRA, M.; DEGERMAN, E. Type III cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE3 gene family). **Cell Signal**. 7, 445–455, 1995.

MAURICE, D.H.; HASLAM, R.J. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. **Mol. Pharmacol**. 37, 671-681, 1990.

MC CONNACHIE, G.; LANGEBERG, LK.; SCOTT, J.D. AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. **Trends Mol Med**. 12, 317–323, 2006.

MEISHERI, K.D.; PALMER, R.F.; BREEMAN, C.V. The effects of amrinone on contractility, Ca²⁺ uptake and cAMP in smooth muscle. **Eur J Pharmacol**. 61, 159-65, 1980.

MICHAELI, T.; BLOOM, T.J.; MARTINS, T. Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**. 268, 12925–12932, 1993.

MICHELETTI, R. Istaroxime, a stimulator of sarcoplasmic reticulum calcium adenosine triphosphatase isoform 2a activity, as a novel therapeutic approach to heart failure. **Am. J. Cardiol**. 99, 24A–32A, 2007.

MILLER, C.L. Role of Ca²⁺/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. **Circ. Res**. 105, 956–964, 2009.

MINAMI, K.; FUKUZAWA, K.; NAKAYA, Y. Mechanism of activation of the Ca²⁺-activated K⁺ channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. **Life Sci**. 53, 1129-1135, 1993.

MIYOSHI, H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K⁺ channel of vascular smooth muscle cells. **Febs Letters** 345, 47-49, 1994.

MORI, K.; TAKEUCHI, H.; MORIOTOKI, K. Endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta by amrinone-induced nitric oxide release. **Eur Heart J** 17, 308-316, 1996.

MOMBOULI, J.M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends Pharmacol Sci** 18, 252-6, 1997.

MOMBOULI, J.M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol** 31, 61-74, 1999.

MONCADA, S.; VANE, J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacol Rev** 30, 293- 331, 1979.

MONGILLO, M. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. **Circ. Res.** 98, 226–234, 2006.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.** 268, C799-C822, 1995.

NISHIKAWA, M.; DE LANEROLE, P.; LINCOLN, T.M. Phosphorylation of mammalian myosin light chain kinases by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and by cyclic GMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.** 259, 8429-8436, 1984.

OMORI, K. KOTERA, J. Overview of PDEs and Their Regulation. **Am Heart Ass.** 100, 309-327, 2007.

PALMER, D.; MAURICE, D.H. Dual expression and differential regulation of phosphodiesterase 3A and phosphodiesterase 3B in human vascular smooth muscle: implications for phosphodiesterase 3 inhibition in human cardiovascular tissues. **Mol Pharmacol.** 58, 247–252, 2000.

POKREISZ, P. Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. **Circ** 119, 408–416, 2009.

POLSON, J.B.; STRADA, S.J. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. **Rev. Pharmacol. Toxicol.** 36, 403-27, 1996.

RABE, K.F.; TENOR, H.; DENT, G. Identification of PDE isozymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE. 1994.

RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circ Res** 52, 352-7, 1983.

RENGO, G. Future G protein-coupled receptor targets for treatment of heart failure. **Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.** 11, 328–338, 2009.

RARYMAEKERS, L.; HOFMANN, F.; CASTEELS, R. Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. **Biochem. J.** 252, 269-273, 1988.

RYBALKIN, S.D.; CHEN YAN; BORNFELDT, K.E. Cyclic GMP Phosphodiesterases and Regulation of Smooth Muscle Function. **Am Heart Association.** 93, 280-291, 2003.

SAEKI T, SAITO I. Isolation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes from pig aorta. **Biochem. Pharmacol.** 46: 833-39, 1993.

SANDNER, P.; KORNFELD, M.; RUAN, X. Nitric oxide/cAMP interactions in the control of rat renal vascular resistance. **Circ Res.** 84, 186–192, 1999.

SCHLOSSMANN, J.; AMMENDOLA, A.; ASHMAN, K. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I_β. **Nat.** 404, 197–201, 2000.

SCHLOSSMANN, J.; Feili, R.; HOFMANN, F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. **Ann Med.** 35, 21–27, 2003.

SHAKUR, Y.; HOLST, L.S.; LANDSTROM, T.R. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.** 66, 241–277, 2001.

SNNENBURG, W.K.; WAYMAN, G.A.; STORM, D.R. Nucleotide regulation by calmodulin. In: Van Eldik L, Watterson DM, eds. Calmodulin and Signal Transduction. **Academic Press** 237–286, 1998.

SOUNESS, J.E.; BRADIL, R.; DIOCEE, B.K. Role of selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibition in the myorelaxant actions of M&B 22,948, MY-5445, vinpocetine and 1- methyl-3-isobutyl-8-(methylamino)xanthine. **Br. J. Pharmacol.** 98, 725-34, 1989.

SOBEY, C.G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 21, 28-38, 2001.

STOKES, G.S. Systolic hypertension in the elderly: pushing the frontiers of therapy--a suggested new approach. **J. Clin. Hypertens.** 6, 192-198, 2004.

SURKS, H.K.; MOCHIZUKI, N.; KASAI, Y. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I_β. **Science.** 286, 1583–1587, 1999.

TAKIMOTO, E. cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism. **Circ. Res.** 96, 100–109, 2005.

TAKUWA, Y. Regulation of vascular smooth muscle contraction. The roles of Ca²⁺, protein kinase C and myosin light chain phosphatase. **Jpn. Heart J.** 37, 793-813, 1996.

TEJERINA, T.; SESIN, J.; DELGADO, C. Effect of milrinone on contractility and ⁴⁵Ca movements in the isolated rabbit aorta. **Eur. J. Pharmacol.** 148, 239- 246, 1988.

TSAI, E.J.; KASS, D.A. CyclicGMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. **Pharmacol. Ther.** 122, 216–238, 2009.

VANHOUTE, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Netherlands, Harwood Acad Pub** 1-305, 1999.

WANG, Y.X.; POON, K.S. Endothelium-derived nitric oxide partially mediates salbutamol induced vasodilations. **Brit. J. Pharmacol.** 250, 335–340, 1993.

WEISHAAR, R.E.; KOBYARZ-SINGER, D.C.; KEISER, J. Subclasses of cyclic GMP-specific phosphodiesterase and their role in regulating the effects of atrial natriuretic factor. **Hypertens** 15, 528-40, 1990.

ZHANG, M.; KASS, D.A. Phosphodiesterases and cardiac cGMP: evolving roles and controversies. **Trends in Pharmacol Sciences** 32, 2011.

ZYPP, A.; RECHTMAN, M.; MAJEWSKI, H. The role of cyclic nucleotides and calcium in the relaxation produced by amrinone in rat aorta **Gen Pharmacol** 34, 245-253, 2000.

ANEXO

A- Efeito do veículo (DMSO) e do LQFM 021 em anéis de aortas isoladas de ratos

A figura 11 mostra o relaxamento causado pelo veículo DMSO por meio do qual foi possível avaliar o nível de significância do efeito vasorrelaxante do DMSO sobre a ação do LQFM 021. O valor de $E_{m\acute{a}x}$ para DMSO em aortas com endotélio foi $19,75 \pm 2,32\%$, $n=5$ e em aortas sem endotélio foi $9,01 \pm 2,49\%$, $n=5$. Os valores de $E_{m\acute{a}x}$ para DMSO E^+ e E^- foram estatisticamente significativos ($P<0,001$), quando comparados aos valores de relaxamento do composto E^+ e E^- (figura 1).

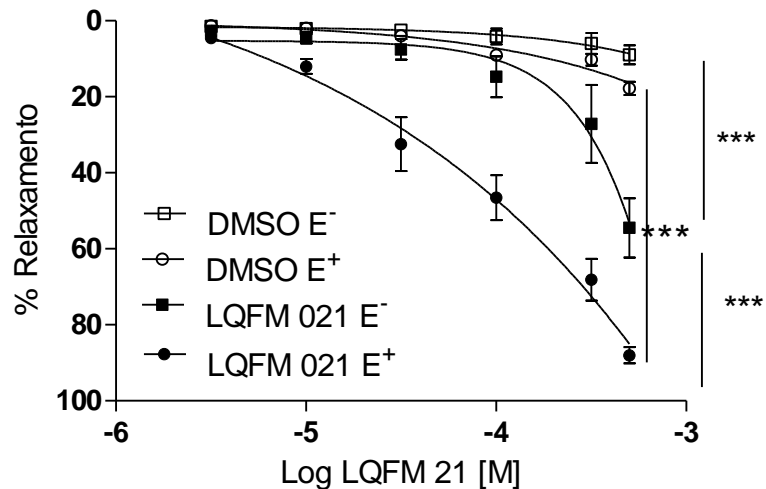


Figura 11: Efeito relaxante do LQFM 021 e do seu diluente DMSO em aortas isoladas de ratos. Curva concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 e DMSO em aortas com endotélio E^+ e sem endotélio E^- de preparações pré-contraídas com fenilefrina (EC_{50}). Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. . Diferença estatística *** $P<0,001$.

B- Efeito relaxante do LQFM 021 em anéis de aortas isoladas de ratos pré-contraídas com KCl 20 mM e KCl 45 mM

A figura 12 mostra o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em preparações pré-contraídas com 20 mM, 45 mM de KCl e preparações controle pré-contraídas com fenilefrina. Os valores de $E_{m\acute{a}x}$ são $54,9 \pm 6,0\%$, $n=5$ para aorta controle e $27,59 \pm 4,73\%$, $n=5$ para aorta pré-contraída com KCl 20 mM. Os valores de $E_{m\acute{a}x}$ em presença de KCl 45 mM foram $7,75 \pm 3,18\%$ e em presença de fenilefrina foram $54,9 \pm 6,02\%$.

As diferenças no $E_{m\acute{a}x}$ foram estatisticamente significativas $P < 0,01$, $P < 0,001$.

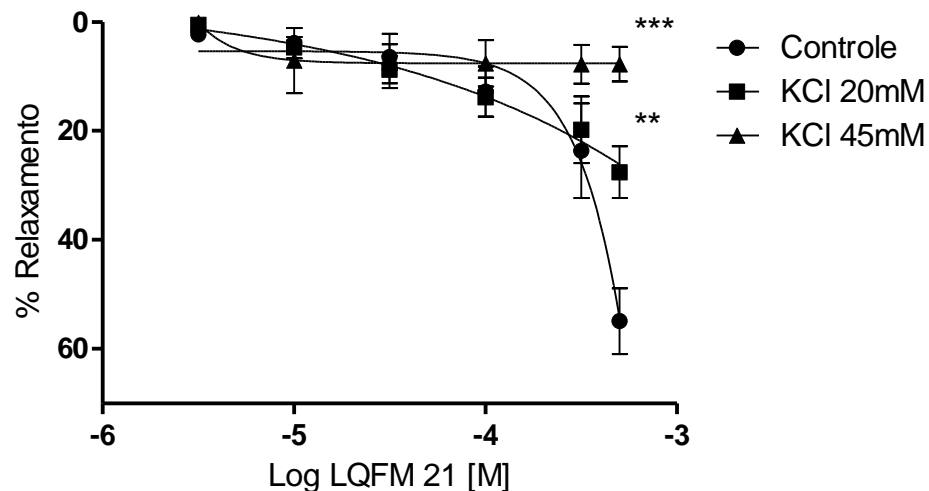


Figura 12: Efeito relaxante do LQFM 021 em aortas isoladas de ratos pré-contraídas com KCl 20 mM e KCl 45 mM. Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 em aortas E⁻ isoladas de ratos, pré-contraídas com KCl. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. . Diferença estatística *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$.

C- Efeito do inibidor da NOS (L-NAME) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas de ratos.

O percentual de relaxamento produzido pelo LQFM 021 na ausência e na presença (20 min) do inibidor da NOS (L-NAME) 100 μ M esta apresentado na figura 13.

O inibidor da NOS provocou variação significativa para a resposta máxima de LQFM 021 ($P < 0,001$). Os valores de $E_{m\acute{a}x}$ na ausência de L-NAME foram $88,1 \pm 2,1\%$; $n=5$, e na presença deste $19,95 \pm 1,13\%$, $n=5$.

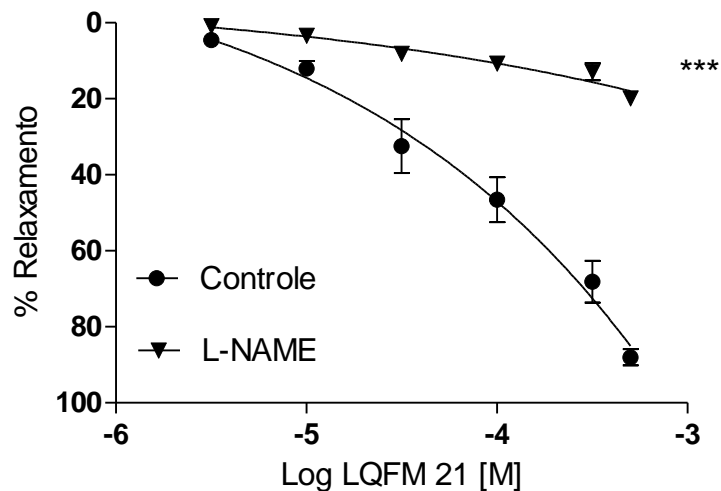


Figura 13: Efeito de L-NAME sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 antes e depois (20 min) da incubação com L-NAME (10 μ M) e pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. . Diferença estatística *** $P < 0,001$.

D- Efeito do inibidor da COX (indometacina) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos

O percentual de relaxamento produzido pelo LQFM 021 na ausência e na presença (20 min) do inibidor da COX (indometacina, 10 μ M) esta apresentado na figura 14.

O inibidor da COX provocou variação significativa ($P < 0,01$) para a resposta máxima de LQFM 021. Os valores de $E_{m\acute{a}x}$ na ausência de indometacina foram $88,1 \pm 2,1\%$, $n=5$, e na presença deste $61,41 \pm 4,9\%$, $n=5$.

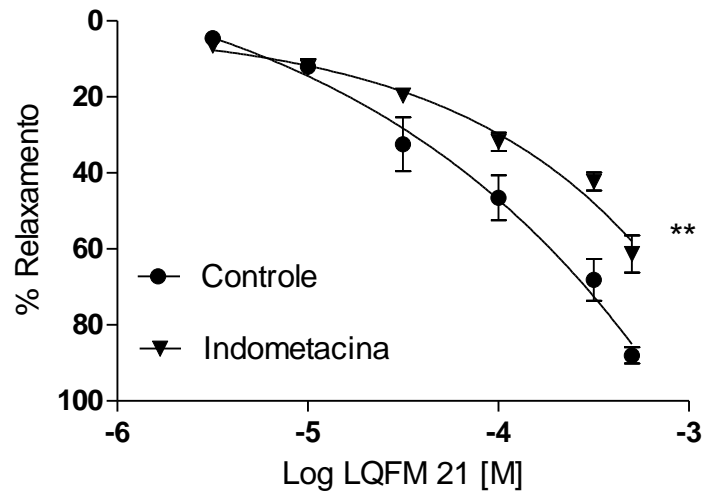


Figura 14: Efeito da indometacina sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas E^+ isoladas de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 antes e depois (20 min) da incubação com indometacina (10 μ M) e pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. . Diferença estatística $**P < 0,01$.

E- Efeito da associação do inibidor da NOS (L-NAME) e do inibidor da COX (indometacina) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas.

O percentual de relaxamento produzido pelo LQFM 021 na ausência e na presença (20 min) da associação dos inibidores da NOS (L-NAME) 100 μ M e do inibidor da COX (indometacina) 10 μ M esta apresentado na figura 15.

Os inibidores juntos provocaram variação significativa para a resposta máxima de LQFM 021 ($P < 0,001$). Os valores de $E_{m\acute{a}x}$ na ausência dos inibidores foram $88,1 \pm 2,1\%$; $n=5$, e na presença destes $32,23 \pm 8,65\%$, $n=5$.

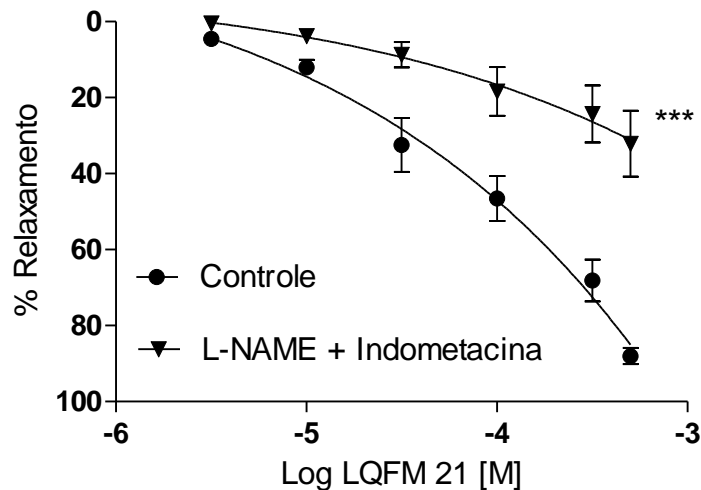


Figura 15: Efeito da indometacina e L-NAME, associados, sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 antes e depois (20 min) da incubação com indometacina (10 μ M) e L-NAME (100 μ M), pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. Diferença estatística *** $P < 0,001$.

F- Efeito da associação do L-NAME, da indometacina e de sua associação sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas.

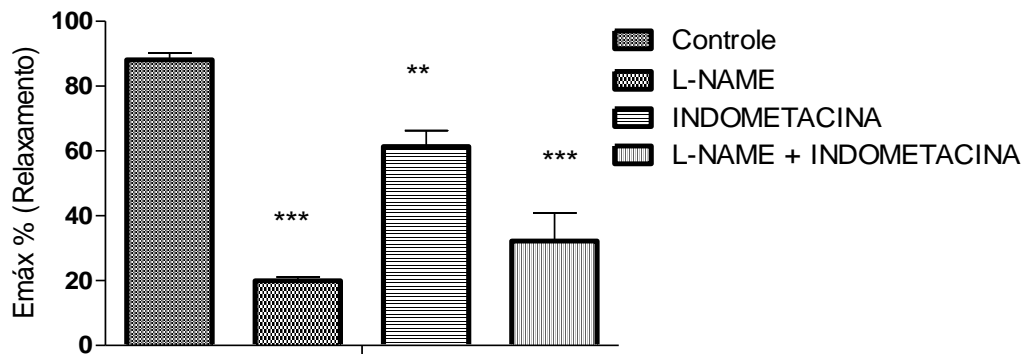


Figura 16: E_{máx} do LQFM 021 quando incubado com L-NAME, INDOMETACINA e L-NAME + INDOMETACINA. Barras verticais representam a média ± EPM dos valores obtidos no E_{máx} provocado pelo LQFM 021 (E⁺) e em presença de L-NAME, INDOMETACINA e L-NAME + INDOMETACINA. Diferença estatística: *** P<0,001, **P<0,01.

G- Efeito do bloqueador não-seletivo de canais de potássio (TEA) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos

O percentual de relaxamento produzido pelo LQFM 021 na ausência e na presença (20 min) do TEA (5 mM) em preparações E⁻ esta apresentado na figura 17.

O TEA provocou diminuição significativa na resposta máxima do LQFM 021, ($P < 0,001$). Os valores de $E_{m\acute{a}x}$ na ausência de TEA foram $54,9 \pm 6,0\%$, $n=5$. Na presença deste $5,08 \pm 1,21\%$, $n=5$.

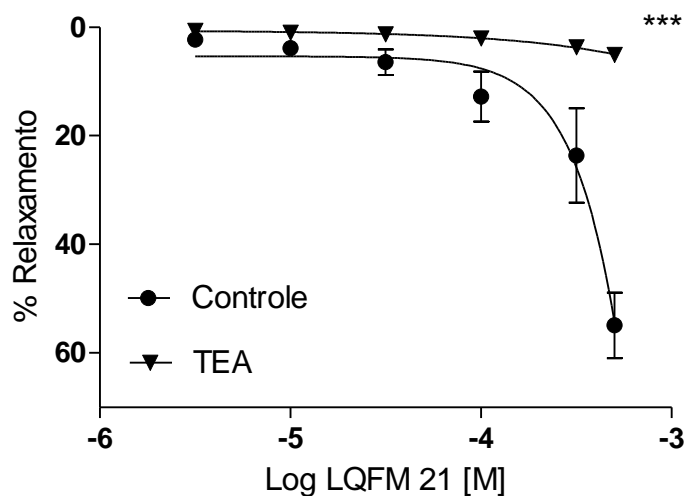


Figura 17: Efeito do TEA sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 na presença (20 min) ou ausência de TEA (5 mM) em preparações E⁻ pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

H- Efeito do bloqueador seletivo dos canais de K⁺ tipo retificador (K_{IR}), BaCl₂ sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos

Os percentuais de relaxamento produzido pelo LQFM 021 na ausência e na presença (20 min) de cloreto de bário (BaCl₂) ,30 μM, em preparações E⁻ estão apresentados na figura 18.

O bloqueador dos canais de potássio do tipo retificador (K_{IR}) apresentou diminuição significativa para o E_{máx} (P<0,001). O E_{máx} na ausência do BaCl₂ apresentou valores de 54,9 ± 6,0%, n=5. Na presença deste: 13,71 ± 1,83%, n=5.

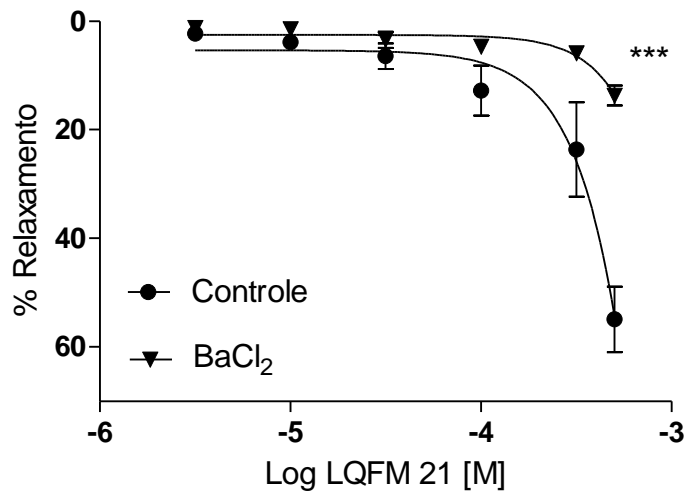


Figura 18: Efeito do BaCl₂ sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 na presença (20 min) ou ausência de BaCl₂ (30 μM) em preparações E⁻ de aortas de ratos e pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos representam médias ± EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. Diferença estatística ***P<0,001.

I- Efeito do bloqueador seletivo dos canais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}), glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos

Os percentuais de relaxamento produzido pelo LQFM 021 na ausência e na presença (20 min) de glibenclamida, 3 μ M, em preparações E^- estão apresentados na figura 19.

O bloqueador dos canais K_{ATP} apresentou diminuição significativa no $E_{m\acute{a}x}$ ($P < 0,001$). O $E_{m\acute{a}x}$ na ausência da glibenclamida apresentou valores de $54,9 \pm 6,0\%$, $n=5$ e na presença $20,38 \pm 2,88\%$, $n=5$.

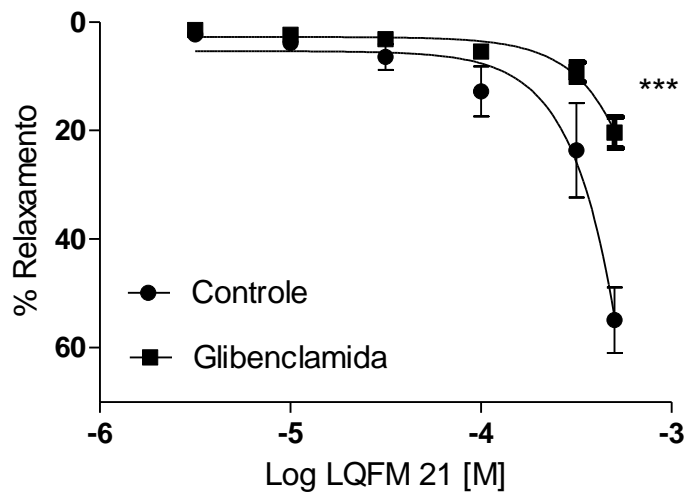


Figura 19: Efeito da glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos (E^-). Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 na presença (20 min) ou ausência de glibenclamida (3 μ M) em aortas de ratos pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. Diferença estatística *** $P < 0,001$.

J- Efeito do bloqueador seletivo dos canais de K^+ dependente de voltagem (K_v), 4-aminopiridina (4-AP) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas de ratos

Os percentuais de relaxamento produzidos pelo LQFM 021 na ausência e na presença (20 min) de 4-AP, 1 mM, em preparações E^- estão apresentados na figura 20.

O 4-AP diminuiu significativamente o $E_{m\acute{a}x}$ que na ausência do 4-AP apresentou valores de $54,9 \pm 6,0\%$; $n=5$ e na presença $20,4 \pm 5,4\%$, $n=5$ ($P<0,001$).

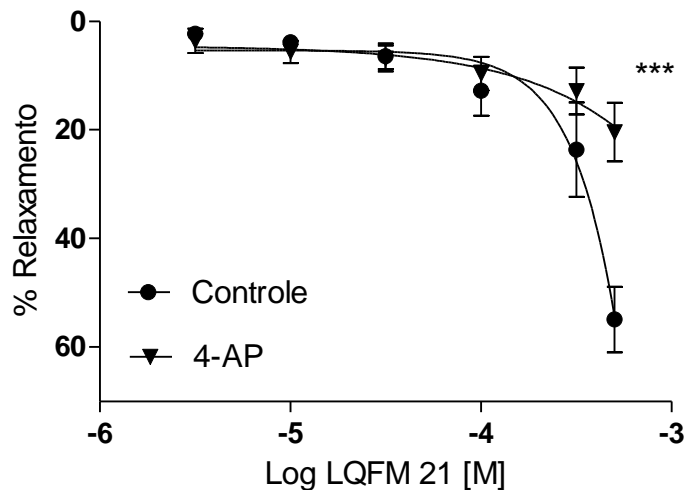


Figura 20: Efeito da 4-aminopiridina (4-AP) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 na presença (20 min) ou ausência de 4-AP (1 mM) em preparações E^- de aortas de ratos pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. Diferença estatística *** $P<0,001$.

K- Efeito do bloqueador seletivo dos canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ de média condutância, clotrimazol, sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos

O percentual de relaxamento produzido pelo LQFM 021 na ausência e na presença (20 min) de clotrimazol, 5 μ M, em preparações E⁻ estão apresentados na figura 21.

O clotrimazol reduziu significativamente o efeito máximo do LQFM 021. O E_{máx} na ausência do bloqueador foi $54,9 \pm 6,0\%$, n=5 e na presença $24,07 \pm 2,24\%$, n=5 (P<0,001).

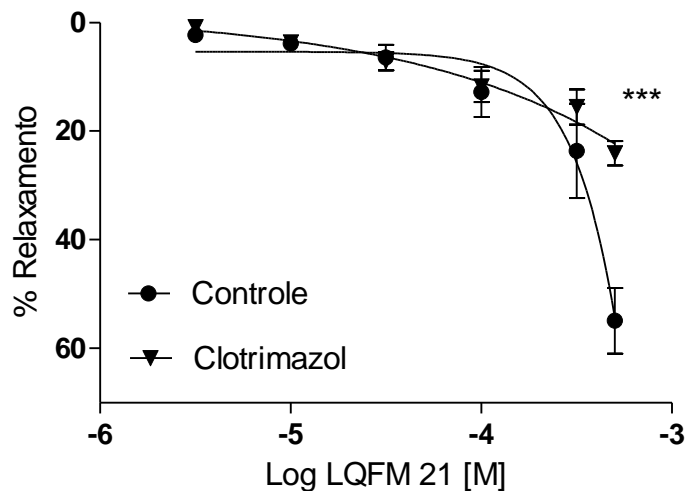


Figura 21: Efeito do clotrimazol sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 na presença (20 min) ou ausência de clotrimazol (5 μ M) em preparações E⁻ de aortas de ratos e pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. Diferença estatística ***P<0,001.

L- Comparação dos efeitos dos bloqueadores seletivos dos canais de K⁺ sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos

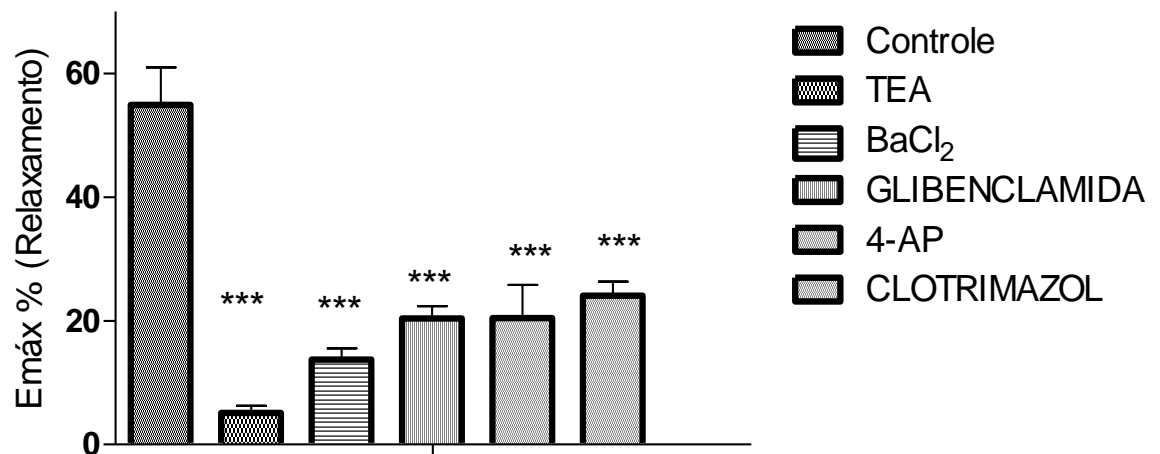


Figura 22: Efeito máximo de relaxamento para LQFM 21 em aortas E⁻ e na presença (20 min) dos inibidores glibenclamida, clotrimazol, TEA, 4-AP, cloreto de bário. Barras verticais representam a média ± E.P.M dos valores obtidos no E_{máx}. Diferença estatística *** P<0,001.

M- Efeito da associação dos antagonistas propranolol (β -bloqueador não seletivo), escopolamina (antagonista muscarínico), hidroxizina (anti-histamínico H1), saralazina (bloqueador de receptor de angiotensina II) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em aortas isoladas de ratos

O percentual de relaxamento produzido pelo LQFM 021 na ausência e na presença (20 min) da associação dos antagonistas propranolol (P), 10 μ M; saralazina (S), 3 μ M ; escopolamina (E), 10 μ M ; hidroxizina (H), 10 μ M; estão apresentados na figura 23.

A associação não reduziu significativamente o efeito máximo do LQFM 021. O $E_{m\acute{a}x}$ na ausência dos antagonistas foi $88,1 \pm 2,1\%$, $n=5$ e na presença $82,42 \pm 4,63\%$, $n=5$.

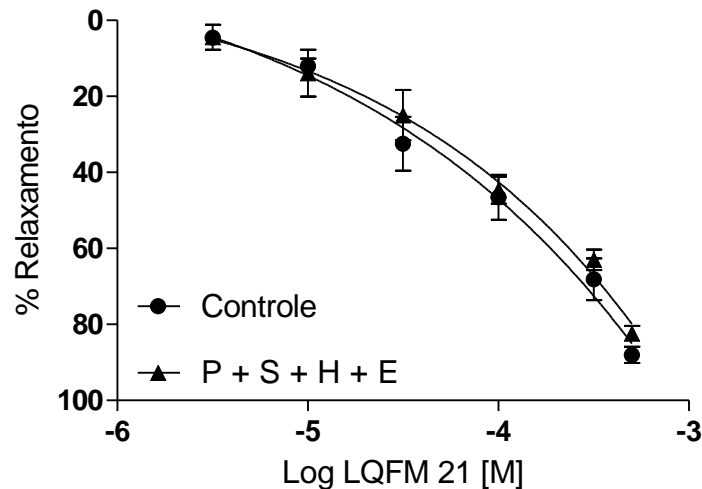


Figura 23: Efeito da associação dos antagonistas: propranolol (P), escopolamina (E), saralazina (S) e hidroxizina (H) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021 em E^+ de aortas isoladas de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 na presença (20 min) ou ausência dos antagonistas em aortas de ratos e pré-contraídas com fenilefrina. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. Não houve diferença estatística.

N- Contrações com fenilefrina ao final do experimento da curva de relaxamento do composto LQFM 021 (E⁻) em aortas isoladas de ratos, para avaliação da viabilidade das preparações

A figura 24 mostra o efeito máximo de contração com fenilefrina dos anéis de aorta em três momentos: no primeiro momento ao testar as preparações, no segundo momento antes de iniciar a curva de relaxamento com o composto LQFM 021 (E⁻) e no terceiro momento para testar se as preparações permaneciam viáveis. A primeira contração com fenilefrina teve seu $E_{máx}$ $1,3 \pm 0,11$; $n=3$, a segunda contração: $E_{máx}$ $1,35 \pm 0,1$; $n=3$ e terceira: $E_{máx}$ $1,21 \pm 0,16$; $n=3$. Não houve diferença estatística significativa $P > 0,05$.

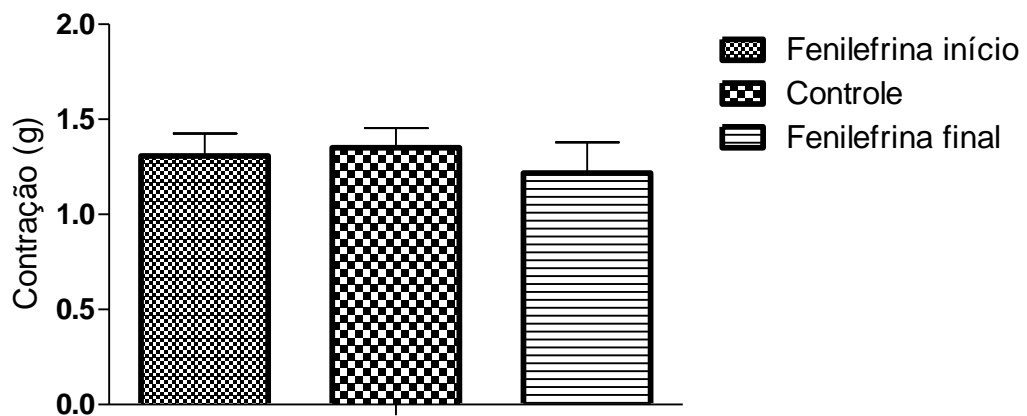


Figura 24: Efeito máximo de contração para fenilefrina em três momentos do experimento de curva de relaxamento para LQFM 021 (E⁻) em aortas isoladas de ratos. Contração com fenilefrina para testar as preparações no início, contração com fenilefrina antes de iniciar a curva de relaxamento para o composto e contração ao final do experimento após lavagem do composto com solução de Krebs e retorna da preparação à linha de base. Barras verticais representam a média \pm E.P.M dos valores obtidos no efeito máximo ($E_{máx}$).

P- Ensaio de citotoxicidade ao LQFM 021

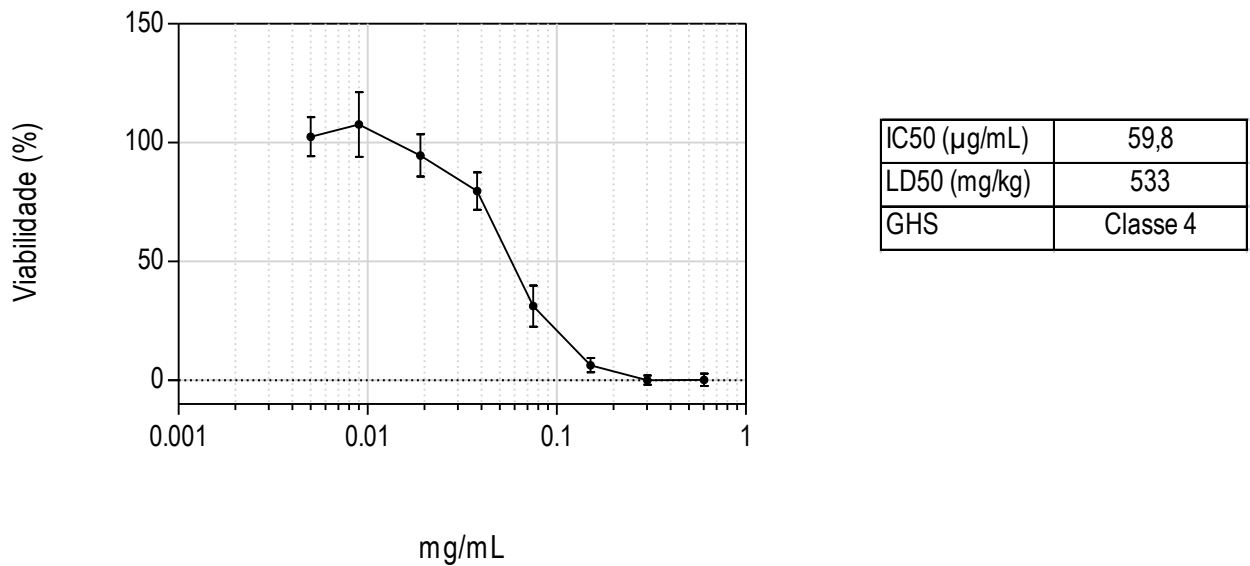


Figura 25: Balb / c 3T3 NRU ensaio de citotoxicidade após 48h de exposição ao LQFM 021, dentro de 12 repetições \pm SD usando oito concentrações (0,005 - 0,602 mg / mL). O teste resultou em um declínio na proliferação celular, forma dependente da concentração. Exposição de células 3T3 para LQFM 021 fornece um valor IC50, que foi usado para estimar a provável LD50 *in vivo*. No momento seguinte, estes dados foram usados para escolher a dose inicial da molécula a ser administrada para avaliação de toxicidade oral aguda (2000 mg/kg). A toxicidade aguda por via oral foi realizada de acordo com o guia recomendado na OCDE 423 "Class Toxicidade Aguda Oral", de 2001.