

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JESSYKA CAROLINA GALVÃO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO VASORRELAXANTE DE AAL 195,  
UM INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE 4, EM ARTÉRIA MESENTÉRICA  
SUPERIOR DE RATOS**

MACEIÓ - AL

2017

JESSYKA CAROLINA GALVÃO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO VASORRELAXANTE DE AAL 195,  
UM INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE 4, EM ARTÉRIA MESENTÉRICA  
SUPERIOR DE RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade  
Federal de Alagoas, como requisito  
parcial para a obtenção do grau em  
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Êurica Adélia  
Nogueira Ribeiro

MACEIÓ - AL  
2017

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

S586i	<p>Silva, Jessyka Carolina Galvão da. Investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante de AAL 195, um inibidor de Fosfodiesterase 4, em artéria mesentérica superior de ratos / Jessyka Carolina Galvão da Silva. – 2017. 78 f. ; il.</p> <p>Orientadora: Êurica Adélia Nogueira Ribeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2017.</p> <p>Bibliografia: f. 66-77. Anexos: f. 78.</p> <p>1. AMP cíclico. 2. Canais de cálcio. 3. Canais de potássio. 4. Inibidores de Fosfodiesterase 4. 5. Músculo liso. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 615.224</p>
-------	---



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, S/N  
Cidade Universitária – Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: ppgcs9@gmail.com  
Fone: 82 3214 1850

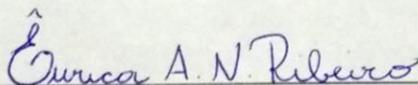
## Folha de Aprovação

Jessyka Carolina Galvão da Silva

Investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante de AAL 195, um inibidor de fosfodiesterase 4, em artéria mesentérica superior de ratos

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 23 de março de 2017.

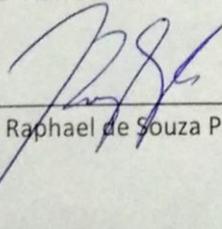
### Banca Examinadora



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Éurica Adélia Nogueira Ribeiro (Orientador)



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Adriana Ximenes da Silva – (UFAL)



Prof. Dr. Raphael de Souza Pinto - (CESMAC)

Aos meus pais **James** e **Edselma**, pelo amor, carinho, dedicação, apoio e por nunca medir esforços para minha educação e formação.

Aos meus irmãos **César** e **Thamires**, pelo amor, carinho e companheirismo, todos os dias da minha vida.

À minha orientadora **Êurica**, por todo ensinamento, paciência e incentivo em todos esses anos em que estive em seu laboratório, que me fizeram crescer científica e profissionalmente.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, primeiramente, por permitir minhas conquistas e me fazer capaz de chegar até aqui.

Aos meus avós **Enemiro** e **Edneuza**, por sempre se fazerem presentes em minha vida.

Ao meu namorado **Wendell**, pela paciência e pelo constante incentivo e apoio em minhas decisões.

À **Edla** e **Cintia**, que me ajudaram desde o primeiro momento em que entrei no laboratório, ainda na iniciação científica, contribuindo bastante para minha formação como pesquisadora. Amigas especiais, no qual tenho grande carinho e admiração.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: **Alberto**, **Alessandro**, **Amanda**, **Emanuel**, **Tatiane** e alguns outros que passaram pelo laboratório, por dividir momentos de descontração, tensão, estudos, experiências e experimentos e por tornar a caminhada até aqui menos árdua.

Aos colegas e amigos da turma de mestrado de 2015 do PPGCS, pelos momentos e experiências compartilhadas.

Aos professores e a todo programa de pós-graduação em ciências da saúde da UFAL, pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. **João Xavier** e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. **Martine Schmitt**, pelo fornecimento do composto AAL 195.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Adriana Ximenes** e ao Prof. Dr. **Raphael Souza**, por aceitarem avaliar meu trabalho.

À FAPEAL, pelo apoio financeiro.

**Muito Obrigada.**

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.*

José de Alencar

## RESUMO

As fosfodiesterases (PDEs) são enzimas que promovem a hidrólise do AMPc/GMPc. Inibidores dessas enzimas têm se mostrado úteis na terapia de doenças que estão intrinsecamente relacionadas à desregulações no tônus vascular, por promover a elevação nos níveis dos nucleotídeos cíclicos. Sendo assim, inibidores de PDE podem ser importantes no tratamento de doenças do sistema cardiovascular. AAL 195 é um composto sintetizado a partir de modificações estruturais nas moléculas da zardaverina e do rolipram, dois conhecidos inibidores de PDE4. Ensaio de *binding* e modelagem molecular demonstraram que AAL 195 é um potente e seletivo inibidor dessas enzimas. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito vasorrelaxante de AAL 195 em artéria mesentérica superior de ratos, bem como tentar elucidar os mecanismos que envolvem esse efeito. Ratos machos Wistar (250–300g) foram eutanaziados por ensanguinação sob anestesia e a artéria mesentérica superior foi removida, seccionada em anéis (2–4 mm), e mantidos em um banho para órgãos isolados, contendo solução Tyrode à 37°C e gaseificada com mistura carbogênica. Para o registro da tensão isométrica, cada anel foi fixado num transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição de dados. Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. e a análise feita através do teste *t* de *Student* ou ANOVA “One-way”, seguido do pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). AAL 195 ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M) promoveu vasorrelaxamento em anéis mesentéricos de ratos, pré-contraídos com fenilerina (FEN), de maneira dependente de concentração. Após a remoção do endotélio esse efeito não foi alterado. Em preparações sem endotélio, KCl 20 mM e 5 mM de tetraetilamônio (TEA) atenuaram significativamente a curva concentração-resposta para o AAL 195. Após o bloqueio com glibencamida, a curva concentração-resposta foi deslocada para a direita, sem redução do efeito máximo. No entanto, após bloqueio com 4-aminopiridina ou com 1 mM de TEA, foi reduzida significativamente a eficácia e a potência farmacológica do AAL 195. Em anéis sem endotélio, pré-contraídos com KCl 80 mM, AAL 195 ( $3 \times 10^{-8}$  –  $10^{-2}$  M) promoveu vasorrelaxamento dependente de concentração. Ao comparar os parâmetros farmacológicos entre FEN e KCl 80 mM, AAL 195 mostrou-se mais potente após pré-contracção por FEN, sem alteração do efeito máximo. Em meio despolarizante nominalmente sem cálcio, AAL 195 ( $3 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $3 \times 10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  M) inibiu as contrações cumulativas induzidas por  $\text{CaCl}_2$ . Em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , a pré-incubação com AAL 195 ( $10^{-9}$ ;  $3 \times 10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $3 \times 10^{-6}$ ;  $10^{-5}$  M) atenuou significativamente as contrações transientes induzidas por fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ). Nas mesmas condições experimentais, apenas a concentração de  $10^{-5}$  M de AAL 195 foi capaz de atenuar significativamente as contrações induzidas por 20 mM de cafeína. Diante do exposto, pode-se concluir que AAL 195 promove efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, de maneira independente de endotélio vascular. Além disso esse efeito é inespecífico e parece envolver a ativação de canais para  $\text{K}^+$ , bem como a redução do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular via inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e inibição da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, principalmente pelos receptores de IP3.

**Palavras-chave:** AMP cíclico. Canais de Cálcio. Canais de Potássio. Inibidores de Fosfodiesterase 4. Músculo Liso.

## ABSTRACT

Phosphodiesterases (PDEs) are enzymes that promote hydrolysis of cAMP/cGMP. PDE inhibitors have been useful in the therapy of diseases which are intrinsically related to deregulations in vascular tone by increasing levels of these second messengers. Thus, PDE inhibitors may be important in the treatment of cardiovascular diseases. AAL 195 is a compound synthesized from structural modifications of the molecules of Zardaverina and Rolipram, two PDE4 inhibitors known. Binding assays and molecular modeling showed AAL 195 is a potent and selective inhibitor of these enzymes. Therefore, the aim of this study was to evaluate the vasorelaxant effect of AAL 195 in superior mesenteric artery of rats and elucidate the mechanisms involved in this it. Male Wistar rats (250 – 300g) were euthanized by exsanguination under anesthesia and superior mesenteric artery was removed, cut in rings (2-4 mm), which were mounted in organ baths containing Tyrode's solution at 37°C and gassed with 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. For isometric tension recordings, each ring was fixed in a force transducer connected to an acquisition system. The values were expressed as mean ± S.E.M. Data were analyzed using Student's t test or one-way ANOVA, followed by Bonferroni (p<0,05). AAL 195 (10<sup>-9</sup> – 10<sup>-5</sup> M) induced relaxation rat mesenteric rings pre-contracted with phenylephrine (PHE) in a concentration-dependent manner. After removal of endothelium, the effect wasn't changed. In preparations without endothelium, KCl 20 mM and tetraethylammonium (TEA) (5 mM) significantly attenuated the concentration-response curve for the AAL 195. After blocking with glibenclamide (GLIB) the concentration-response curve was shifted to the right, without reducing the maximum effect. However, after blocking with 4-aminopyridine (4-AP) or with TEA (1mM) was significantly reduced the efficacy and potency of AAL 195. In rings without endothelium, contracted with KCl 80 mM (3x10<sup>-8</sup> – 10<sup>-2</sup> M), AAL 195 promoted vasorelaxation concentration-dependent. When comparing the pharmacological parameters between PHE and KCl 80 mM, AAL 195 was more potent after pre-contraction by PHE, without changing the maximum effect. In depolarizing solution nominally without calcium, AAL 195 (3x10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 3x10<sup>-5</sup>, 10<sup>-3</sup>, 3x10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup> M) inhibited the cumulative contractions induced by CaCl<sub>2</sub>. In Ca<sup>2+</sup> free medium, pre-incubation with AAL 195 (10<sup>-9</sup>; 3x10<sup>-7</sup>; 10<sup>-6</sup>; 3x10<sup>-6</sup>; 10<sup>-5</sup> M) significantly attenuated the transient contractions induced by phenylephrine (10 μM). In the same experimental conditions, only the concentration of 10<sup>-5</sup> M AAL 195 was able to significantly attenuate the contractions induced by 20 mM caffeine. Given the above, it can be concluded AAL 195 promotes vasorelaxant effect in superior mesenteric artery isolated rat, independently of vascular endothelium. Furthermore this effect is non-specific and appear to involve the activation of K<sup>+</sup> channels as well as the reduction in intracellular Ca<sup>2+</sup> via inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx and inhibition of Ca<sup>2+</sup> mobilization from intracellular stores, mainly by IP<sub>3</sub> receptors.

**Key Words:** Cyclic AMP. Calcium Channels. Potassium Channels. Phosphodiesterase 4 Inhibitors. Smooth Muscle.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Representação esquemática do mecanismo de relaxamento do músculo liso vascular. ....	22
<b>Figura 2:</b>	Representação esquemática dos canais para K <sup>+</sup> e o tônus vascular. ....	23
<b>Figura 3:</b>	Estrutura química do AAL 195 .....	32
<b>Figura 4:</b>	Representação esquemática da cuba para órgãos isolados .....	38
<b>Figura 5:</b>	Aparato utilizado para registros de tensões isométricas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato .....	38
<b>Figura 6:</b>	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN, com endotélio (A) ou sem endotélio (B) vascular .....	39
<b>Figura 7:</b>	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN, com ou sem endotélio vascular, após bloqueio com solução Tyrode de KCl a 20 mM .....	40
<b>Figura 8:</b>	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com TEA (5 mM) .....	40

<b>Figura 9:</b>	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com TEA (1mM) GLIB (10 µM) ou com 4-AP (1mM) .....	41
<b>Figura 10:</b>	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com solução despolarizante Tyrode (KCl 80 mM), sem endotélio vascular .....	42
<b>Figura 11:</b>	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar o efeito do AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sobre o influxo de cálcio extracelular .....	42
<b>Figura 12:</b>	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sobre a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares. Agonistas: (A) FEN e (B) cafeína .....	43
<b>Figura 13:</b>	Representação esquemática da provável via de sinalização do efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em artéria mesentérica superior de ratos Wistar .....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar com endotélio intacto (o) ou sem endotélio (●), pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos ..... 45
- Gráfico 2:** Porcentagem de contração da fenilefrina e recuperação do órgão após curva concentração resposta do AAL 195, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio intacto ( $E^+$ ) e sem o endotélio funcional ( $E^-$ ) ..... 46
- Gráfico 3:** Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio (o) e após o bloqueio com KCl 20 mM (●), pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos. \*\*\* $p < 0,001$  vs FEN  $E^-$  ..... 47
- Gráfico 4:** Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio (o) e após o bloqueio com TEA 5 mM (●), pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos. \*\*\* $p < 0,001$  vs FEN  $E^-$  ..... 48
- Gráfico 5:** Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio (o) e após o bloqueio com GLIB (10  $\mu$ M) (●), pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos. \*\* $p < 0,01$  vs FEN  $E^-$  ..... 49

- Gráfico 6:** Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio (o) e após o bloqueio com 4-AP (1mM) (●), pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs FEN E<sup>-</sup> ..... 50
- Gráfico 7:** Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio (o) e após o bloqueio com TEA (1mM) (●), pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 vs FEN E<sup>-</sup> ..... 51
- Gráfico 8:** Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $3 \times 10^{-8}$ - $10^{-2}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar sem endotélio (●), pré-contraídos com KCl 80 mM. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos ..... 52
- Gráfico 9:** Curva concentração-resposta para CaCl<sub>2</sub> ( $10^{-6}$ - $10^{-2}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar sem endotélio (●), pré-incubadas com [AAL 195] M, n = 7. ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni. \*\*\* p < 0,001 vs Controle ..... 53
- Gráfico 10:** Efeito de AAL 195 na contração (g) induzida por FEN, em anéis de artéria mesentérica exposta a solução livre de Ca<sup>2+</sup>, sem endotélio funcional (n= 4). ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni. <sup>a</sup> p < 0,001 vs Controle; <sup>b</sup> p < 0,01 vs  $10^{-9}$  M; <sup>c</sup> p < 0,01 vs  $3 \times 10^{-7}$  M ..... 54
- Gráfico 11:** Efeito de AAL 195 na contração (g) induzida por cafeína, em anéis de artéria mesentérica exposta a solução livre de Ca<sup>2+</sup>, sem endotélio funcional (n= 4). ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni. <sup>a</sup> p < 0,001 vs Controle; <sup>b</sup> p < 0,01 vs  $10^{-9}$  M ou  $3 \times 10^{-7}$  M <sup>c</sup> p < 0,05 vs  $10^{-6}$  ..... 55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Classificação, distribuição nos tecidos e inibidores de referência das PDEs .....	27
<b>Tabela 2:</b>	Composição das soluções nutritivas (todas com pH 7,4) .....	36
<b>Tabela 3:</b>	Comparação dos valores de $E_{m\acute{a}x}$ e $pD_2$ de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-Aminopiridina
AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
AMPc	3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	análise de variância "One-way"
ATP	Trifosfato de adenosina
BK <sub>Ca</sub>	Canal para K <sup>+</sup> de grande condutância ativado pelo Ca <sup>2+</sup>
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CaM	Calmodulina
CE <sub>50</sub>	Concentração da droga que produz 50% do efeito máximo
CI <sub>50</sub>	Concentração que produz 50% de inibição
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
e.p.m	Erro padrão da média
E <sub>máx</sub>	Efeito máximo
FEN	Fenilefrina
FHDE	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
FRDE	Fator relaxante derivado do endotélio
GC	Guanilato ciclase
GLIB	Glibenclamida
GMPc	3',5'-monofosfato de guanosina cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
IK <sub>Ca</sub>	Canal para K <sup>+</sup> de condutância intermediária ativado pelo Ca <sup>2+</sup>
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
IP <sub>3</sub> R	Receptor de IP <sub>3</sub>
K <sup>+</sup>	Íon potássio
K <sub>ATP</sub>	Canal para K <sup>+</sup> sensível ao ATP
K <sub>Ca</sub>	Canais para K <sup>+</sup> ativado pelo Ca <sup>2+</sup>

K <sub>IR</sub>	Canal para K <sup>+</sup> retificador de entrada
K <sub>v</sub>	Canal para K <sup>+</sup> sensível à voltagem
MLC <sub>20</sub>	Unidade regulatória 20-kDa da cadeia leve da miosina
MLCK	Quinase da cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
MLV	Músculo liso vascular
pD <sub>2</sub>	Logaritmo negativo da CE <sub>50</sub>
PDE	Fosfodiesterase
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil inositol bisfosfato
PKA	Proteína quinase ativada por AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase ativada por GMPc
PLC	Fosfolipase C
PMCA	Bomba de cálcio de membrana plasmática
ROC	Canal para cálcio operado por receptor
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático
SK <sub>Ca</sub>	Canal para K <sup>+</sup> de pequena condutância ativado pelo Ca <sup>2+</sup>
SOC	Canal para cálcio operado por estoque
TEA	Tetraetilamônio
UCR	Upstream conserved region (região conservada da PDE4)
VOC	Canal para cálcio operado por voltagem
vs	Versus

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

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> -----	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> -----	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Considerações sobre o Tônus Vascular</b> -----	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Considerações sobre Nucleotídeos Cíclicos</b> -----	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Considerações sobre as Fosfodiesterases</b> -----	<b>26</b>
<b>2.4</b>	<b>Fosfodiesterase como Alvo de Fármacos</b> -----	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>Fosfodiesterase 4 e o AAL 195</b> -----	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> -----	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> -----	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> -----	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL</b> -----	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais</b> -----	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Substâncias Utilizadas</b> -----	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparação das Soluções de AAL 195</b> -----	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Soluções Fisiológicas</b> -----	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>MÉTODO</b> -----	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Preparações de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Rato Com ou Sem Endotélio Funcional</b> -----	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>Protocolos Experimentais Utilizando Anéis de Artéria Mesentérica Superior de Rato</b> -----	<b>38</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN</b> -----	<b>38</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Avaliação da participação de canais para K<sup>+</sup> no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos</b> -----	<b>39</b>

5.2.3	Efeito do AAL 195 sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de TEA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos -----	40
5.2.4	Identificação dos canais para K <sup>+</sup> envolvidos no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos -----	41
5.2.5	Avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com solução Tyrode com KCl a 80 mM -----	41
5.2.6	Avaliação do efeito de AAL 195 sobre o influxo de cálcio extracelular -----	42
5.2.7	Avaliação do efeito de AAL 195 sobre a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares -----	43
<b>5.3</b>	<b>Análise Estatística -----</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS -----</b>	<b>45</b>
<b>6.1</b>	<b>Efeito do AAL 195 Sobre as Contrações Induzidas por FEN em Anéis de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Ratos -----</b>	<b>45</b>
<b>6.2</b>	<b>Participação dos Canais para K<sup>+</sup> no Efeito Vasorrelaxante induzido por AAL 195 em Anéis de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Ratos -----</b>	<b>47</b>
<b>6.3</b>	<b>Participação dos Canais para K<sup>+</sup> Sensíveis ao ATP no Efeito Vasorrelaxante induzido por AAL 195 em Anéis de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Ratos -----</b>	<b>49</b>
<b>6.4</b>	<b>Participação dos Canais para K<sup>+</sup> Sensíveis à Voltagem no Efeito Vasorrelaxante induzido por AAL 195 em Anéis de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Ratos -----</b>	<b>50</b>
<b>6.5</b>	<b>Participação dos Canais para K<sup>+</sup> de Grande Condutância Ativados pelo Ca<sup>2+</sup> no Efeito Vasorrelaxante induzido por AAL 195 em Anéis de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Ratos -----</b>	<b>51</b>
<b>6.6</b>	<b>Efeito do AAL 195 sobre as Contrações Induzidas por KCl 80 mM em Anéis de Artéria Mesentérica Superior de Ratos -----</b>	<b>52</b>
<b>6.7</b>	<b>Efeito do AAL 195 sobre o Influxo de Ca<sup>2+</sup> em Anéis de Artéria Mesentérica Superior de Ratos -----</b>	<b>53</b>

6.8	Efeito do AAL 195 sobre a Mobilização de $\text{Ca}^{2+}$ pelos Receptores de $\text{IP}_3$ dos Estoques Intracelulares -----	54
6.9	Efeito do AAL 195 sobre a Mobilização de $\text{Ca}^{2+}$ pelos Receptores de Rianodina dos Estoques Intracelulares -----	55
7	DISCUSSÃO -----	56
8	CONCLUSÃO -----	64
9	PERSPECTIVAS -----	65
	REFERÊNCIAS -----	66
	ANEXO A -----	78

## 1 INTRODUÇÃO

A maior parte dos fármacos presentes na prática clínica é de origem sintética (BARREIRO; FRAGA, 2008). Esses fármacos representam uma parcela significativa na economia do mercado farmacêutico (CALIXTO; SIQUEIRA JR, 2008). A síntese de novas moléculas tem por objetivo produzir fármacos que sejam capazes de apresentar os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada, além de apresentar segurança e eficácia em seu emprego terapêutico (BARREIRO, 2002).

O sildenafil é um exemplo de fármaco sintético. Lançado em 1998 para o tratamento da disfunção erétil, tornou-se um dos líderes de vendas mundiais, ultrapassando a marca de US\$ 2,5 bilhões ao ano (BARREIRO; PINTO, 2013). O sildenafil pertence à classe de inibidores da enzima fosfodiesterase (PDE). As PDEs são uma superfamília de enzimas que regulam os níveis intracelulares dos segundos mensageiros 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), ao controlar suas taxas de degradação (KERAVIS; LUGNIER, 2012; MAURICE et al, 2014).

Atualmente as PDEs estão classificadas em 11 famílias, com mais de 50 isoformas identificadas. Essa multiplicidade de isoformas tornam as PDEs promissoras alvos de fármacos, visto que há uma busca cada vez maior de moléculas mais seletivas (LUGNIER, 2011). O sucesso comercial e clínico de medicamentos para a disfunção erétil, como o sildenafil (Viagra<sup>®</sup>), tadalafil (Cialis<sup>®</sup>) e vardenafil (Levitra<sup>®</sup>), exemplificam a viabilidade do investimento em pesquisas com as PDEs (BENDER; BEAVO, 2006).

As PDEs estão distribuídas em todos os tipos celulares (LUGNIER, 2006). No músculo liso vascular os inibidores de PDE estão diretamente relacionados à vasodilatação, devido ao aumento da concentração intracelular de AMPc ou GMPc (MURAD, 1986). Além do efeito relaxante, a maioria dos fármacos que atuam nas PDEs vasculares é capaz de promover ação cardiotônica, anti-agregante plaquetária e inibidora da proliferação vascular (CONTI et al, 1995; RAHIMI et al, 2010; KE, 2004). Além disso, inibidores de PDEs têm se mostrado úteis na terapia de doenças que estão intrinsecamente relacionadas à desregulações no tônus, como hipertensão arterial sistêmica e hipertensão pulmonar (PONTES et al, 2012). Sendo assim,

inibidores de PDEs podem ser importantes no tratamento de doenças do sistema cardiovascular (RAHIMI et al, 2010).

AAL 195 é uma molécula sintetizada a partir de modificações estruturais da zardaverina e do rolipram, dois conhecidos inibidores de PDE4. Após ensaios de *binding* e modelagem molecular, AAL 195 foi considerado um potente e seletivo inibidor de PDE4 (ARAÚJO-JÚNIOR et al, 2015; KRIER et al, 2005).

Com base na importância das PDEs como alvo de fármacos que atuem no sistema cardiovascular, o objetivo desse trabalho é investigar o efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195, bem como os possíveis mecanismos que envolvem esse efeito.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Considerações sobre o Tônus Vascular

O tônus vascular representa a atividade contrátil das células do músculo liso vascular (MLV) (JACKSON, 2000). Ele é o principal fator determinante da resistência vascular periférica e é capaz de promover a regulação da pressão arterial e a distribuição do fluxo sanguíneo nos tecidos (SONKUSARE et al, 2006). A regulação do tônus vascular envolve uma interação entre fatores vasoconstrictores e vasodilatadores (JACKSON, 2000) e sua desregulação pode ocasionar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como vasoespasmo e hipertensão arterial (HIRANO; HIRANO; KANAIDE, 2004).

O MLV é o principal constituinte da parede dos vasos sanguíneos e é responsável pelas alterações dinâmicas no diâmetro e no volume desse órgão (WATRAS, 2009). Fisiologicamente, a principal função das células do MLV é gerar força de contração (WEBB, 2003). O estímulo inicial que desencadeia a contração do MLV é o aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  no meio intracelular (THORNELOE; NELSON, 2005). Esse aumento pode ocorrer de duas formas: 1) influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular, através dos canais presentes na membrana plasmática; ou 2) liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares, através do retículo sarcoplasmático (RS) (BERRIDGE, 2004; SOMLYO; SOMLYO, 1994).

O influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular pode ocorrer em decorrência de um acoplamento eletromecânico ou um acoplamento farmacomecânico. O acoplamento eletromecânico é caracterizado pela despolarização do potencial de repouso da membrana, que promove a abertura de canais para cálcio operados por voltagem (VOC, do inglês *voltage-operated channels*) (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Os VOCs são canais de grande importância na membrana celular, sendo considerados como a principal via de entrada de  $Ca^{2+}$  para as células do MLV (CRIBBS, 2006).

O acoplamento farmacomecânico ocorre devido a ativação de canais para cálcio operados por receptores (ROC, do inglês *receptor-operated channels*), os quais são ativados por agonistas específicos (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Os agonistas interagem com receptores acoplados à proteína G na membrana plasmática, que por sua vez, ativa a enzima fosfolipase C (PLC), e esta promove a hidrólise do fosfatidil inositol bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) em inositol trisfosfato (IP<sub>3</sub>) e

diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  se difunde no citosol e faz ligação a receptores específicos na membrana do RS ( $IP_3R$  – receptor de  $IP_3$ ), resultando em liberação de  $Ca^{2+}$  para o meio intracelular (OGUT; BROZOVICH, 2003; WEBB, 2003). O DAG permanece na membrana, e juntamente com o  $Ca^{2+}$ , ativa uma proteína quinase C (PKC), responsável pelo aumento da condutância iônica dos canais transmembranares para  $Ca^{2+}$ . A PKC também modula a sensibilidade do aparato contrátil ao  $Ca^{2+}$  (MORGADO et al, 2012; PAIVA; FARIAS, 2005).

Além dos VOCs e ROCs, outra maneira de elevação dos níveis de  $Ca^{2+}$  pelo influxo intracelular desses íons é através dos canais para cálcio operados por estoque (SOC, do inglês *store-operated channels*) (CLAPHAM, 2007). Estes canais estão presentes na membrana celular e são ativados quando há depleção de  $Ca^{2+}$  dos estoques do RS (BERRIDGE, 1997; MCFADZEAN; GIBSON, 2002). A ativação dos SOCs possibilita que a concentração de  $Ca^{2+}$  permaneça elevada no citosol mesmo quando as reservas estão se esgotando, além de favorecer o transporte desse íon para o retículo (THORNELOE; NELSON, 2005).

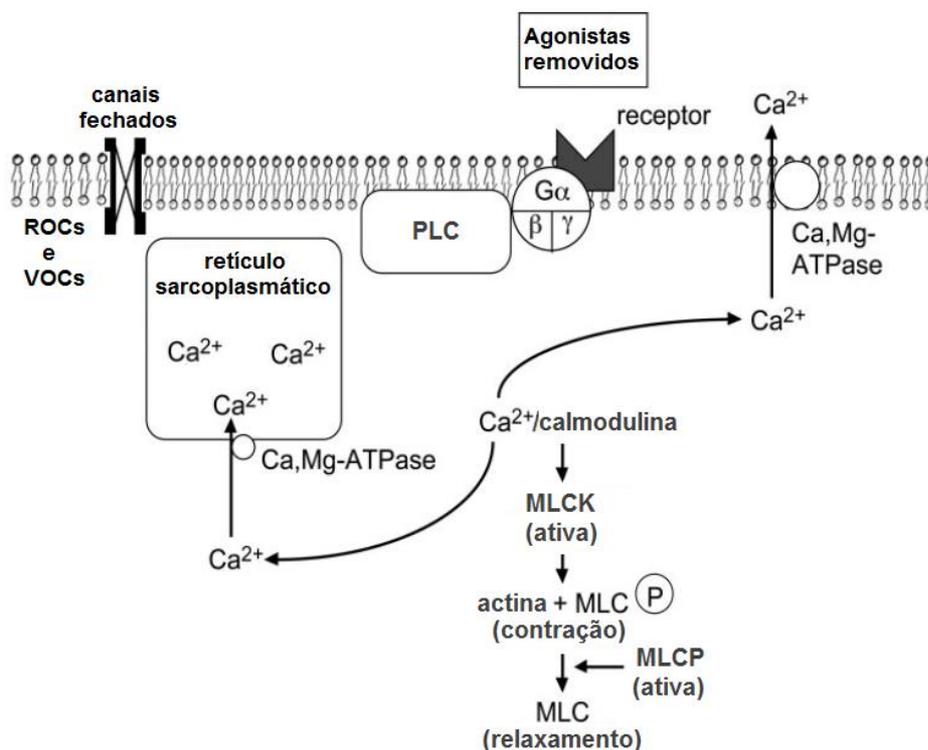
A liberação do  $Ca^{2+}$  estocado no RS se dá através da ativação de receptores de  $IP_3$  e receptores de rianodina (RyR) (WRAY; BURDYGA, 2010). O  $IP_3R$ , a classe mais expressa de canais para  $Ca^{2+}$  intracelular, promove a efluxo de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares em resposta à ligação do  $IP_3$  e do próprio  $Ca^{2+}$  (PROLE; TAYLOR, 2016). Os RyRs são assim denominados por serem sensíveis à planta alcaloide rianodina e à cafeína. Estes são ativados pelo  $Ca^{2+}$  liberado através dos  $IP_3R$ , processo conhecido por liberação de cálcio induzida por cálcio (McHALE et al., 2006; SANDERSON et al., 2008).

A elevação do  $Ca^{2+}$  intracelular, independente do estímulo contrátil, permite a ligação do  $Ca^{2+}$  à calmodulina (CaM), formando o complexo  $4Ca^{2+}$ -CaM. Este complexo ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK, do inglês *myosin light chain kinase*), que por sua vez, fosforila a unidade regulatória 20-kDa da cadeia leve da miosina ( $MLC_{20}$ ) através da transferência de um grupo fosfato do trifosfato de adenosina (ATP), promovendo a exposição do sítio de fixação para actina na molécula de miosina, o que possibilita a formação de pontes cruzadas. A miosina ATPase é, então, ativada e a interação molecular entre os filamentos da miosina com a actina produz força e clivagem de ATP, ocorrendo o deslizamento destes filamentos com consequente desenvolvimento de força ou contração do músculo (JOHNSON; SNYDER, 1995; MORGADO et al, 2012).

O relaxamento do MLV é iniciado quando há uma redução citosólica na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ . Essa redução nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ocorrer em resposta a um estímulo vasodilatador, pela remoção do estímulo contrátil ou ainda pela ação direta de substâncias que estimulam a inibição do mecanismo contrátil (MORGADO et al, 2012; WEBB, 2003).

A diminuição dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ocorre pela extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  pela membrana plasmática ou captação do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS. O  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser liberado para o meio extracelular através do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ou pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática (PMCA – do inglês *plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*); já nos estoques intracelulares o  $\text{Ca}^{2+}$  é recaptado pela bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA – do inglês *sarcoplasmic-endoplasmatic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*) (Figura 1) (THORNELOE; NELSON, 2005).

**Figura 1** – Representação esquemática do mecanismo de relaxamento do músculo liso vascular.



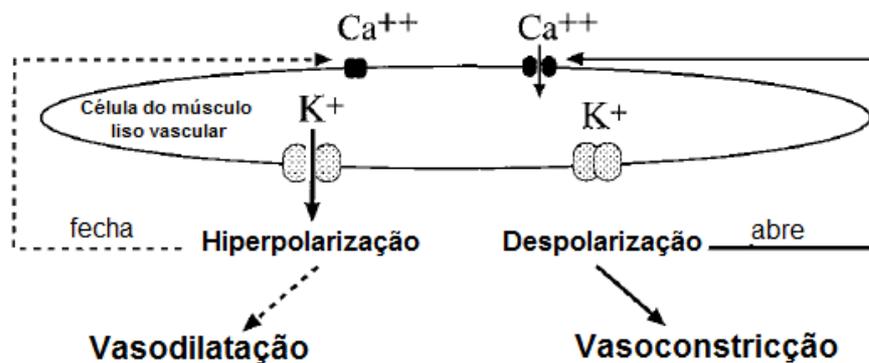
O vasorrelaxamento ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou por ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil. Independentemente, o processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e aumento da atividade da MLCP (Adaptado de WEBB, 2003).

A diminuição do  $\text{Ca}^{2+}$  induz um aumento na atividade da enzima fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP, do inglês *myosin light chain phosphatase*). Esta, por

sua vez, reverte a fosforilação da  $MLC_{20}$ , desfosforilando-a, o que resulta no relaxamento do MLV (Figura 1) (HIRANO et al, 2003; WEBB, 2003). Portanto, a MLCK e a MLCP possuem efeitos que se contrabalançam, promovendo contração e relaxamento, respectivamente (HIRANO et al, 2003).

Até aqui foi visto que os canais para  $Ca^{2+}$  exercem grande influência na regulação do tônus vascular, no entanto outros canais também podem estar envolvidos nessa regulação ao promover alterações no potencial elétrico da membrana, dentre esses, os canais para  $K^+$ . A ativação desses canais pode determinar o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos VOCs, visto que a condutância aumentada ao  $K^+$  promove a hiperpolarização da membrana celular, com conseqüente relaxamento do MLV, enquanto a condutância diminuída promove a despolarização, resultando na contração dessa musculatura (Figura 2) (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996; THORNELOE; NELSON, 2005).

**Figura 2** – Representação esquemática dos canais para  $K^+$  e o tônus vascular.



A abertura de canais para  $K^+$  leva a difusão dos íons  $K^+$  para fora da célula, a hiperpolarização da membrana, o fechamento dos canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem e a diminuição do  $Ca^{2+}$  intracelular, o que promove a vasodilatação. O fechamento dos canais para  $K^+$  tem o efeito oposto (Adaptado de JACKSON, 2000).

Há vários tipos de canais para  $K^+$  que podem estar envolvidos na regulação do tônus basal do MLV, dentre eles, incluem-se: canais para  $K^+$  sensíveis à voltagem ( $K_v$ ); canais para  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ); canais para  $K^+$  ativados pelo  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) e canais para  $K^+$  retificadores de entrada ( $K_{IR}$ ) (JACKSON, 2000).

Os  $K_v$  são uma classe ubíqua de canais para  $K^+$ , expressos pelas células do MLV (NELSON; QUAYLE, 1995) Esses canais são ativados pela despolarização da membrana e, desta forma, promovem o efluxo de  $K^+$  e a repolarização da membrana, além de participar da manutenção do potencial de repouso e do tônus

vascular (KO et al, 2010). Os  $K_v$  também podem participar do mecanismo de ação de drogas vasoconstrictoras e vasodilatadoras: vasoconstrictores podem fechar canais  $K_v$  por mecanismos que envolvem a elevação do  $Ca^{2+}$  intracelular e a PKC; e vasodilatadores podem promover a abertura desses canais pela cascata de sinalização do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (JACKSON, 2000).

Os  $K_{ATP}$  foram inicialmente identificados em cardiomiócitos. Em estudos posteriores, foram identificados  $K_{ATP}$  em diversos outros tipos celulares, incluindo as células do MLV (TERAMOTO, 2006). Os  $K_{ATP}$  são canais iônicos seletivos a passagem do  $K^+$  e ativados por redução na concentração intracelular de ATP (NELSON et al, 1990). Esses canais desempenham um importante papel na regulação do potencial de repouso da membrana e, portanto, na manutenção do tônus vascular. Eles também parecem participar do mecanismo de ação de substâncias vasodilatadoras através de mecanismos dependentes e independentes do AMPc/Proteína quinase dependente de AMPc (FOSTER; COETZEE, 2016; JACKSON, 2000).

Os  $K_{Ca}$  são subdivididos de acordo com sua condutância em canais para  $K^+$  de grande condutância ativados pelo  $Ca^{2+}$  ( $BK_{Ca}$ ), canais para  $K^+$  de condutância intermediária ativados pelo  $Ca^{2+}$  ( $IK_{Ca}$ ) e canais para  $K^+$  de pequena condutância ativados pelo  $Ca^{2+}$  ( $SK_{Ca}$ ) (WEI et al, 2005). Os  $BK_{Ca}$  são dependentes de  $Ca^{2+}$  e de voltagem. Esses canais podem ser regulados, dentre outros fatores, por fosforilação mediada por proteínas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos (CLEMENTS; TARENTYEV; SELLKE, 2015). Os  $BK_{Ca}$  contribuem para a repolarização do potencial de ação (SAH; FABER, 2002) e desta forma, regulam o tônus vascular e promovem vasodilatação (CLEMENTS; TARENTYEV; SELLKE, 2015). Os  $SK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$  são insensíveis à voltagem e são exclusivamente ativados pela baixa concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular (WEI et al, 2005). A ativação dos  $SK_{Ca}$  no endotélio vascular contribui para o relaxamento das células do MLV (GRGIC et al, 2009).

Os  $K_{IR}$  são abundantes no músculo liso de vasos de resistência de pequenos diâmetros. A função exata desses canais no MLV não está totalmente elucidada, mas há duas hipóteses para sua função. A primeira hipótese é de que os  $K_{IR}$  contribuem para o potencial de repouso da membrana e o tônus basal em células musculares lisas de vasos de resistência. A segunda é que a ativação do  $K_{IR}$  em

resposta a aumentos moderados na concentração de  $K^+$  extracelular pode causar vasodilatação (KO et al, 2008).

## 2.2 Considerações sobre Nucleotídeos Cíclicos

Os primeiros segundos mensageiros descritos na literatura foram os nucleotídeos cíclicos 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (LUGNIER, 2006). Eles são responsáveis por regular numerosas funções celulares, dentre elas, a contração e o relaxamento do MLV (BOBIN et al, 2016; OMORI; KOTERA, 2007; RYBALKIN et al, 2003). Como esses segundos mensageiros controlam diversos processos homeostáticos, a desregulação das suas vias de sinalização pode desencadear ou modular estados fisiopatológicos relacionados a várias doenças, incluindo disfunção erétil, claudicação intermitente, insuficiência cardíaca e hipertensão pulmonar (AHMAD et al, 2014).

Os níveis intracelulares dos nucleotídeos cíclicos são produtos do balanço entre as suas taxas de síntese e degradação (MORGADO et al, 2012). O AMPc é sintetizado a partir de uma molécula de ATP por uma proteína transmembranar, a adenilato ciclase (AC), que geralmente é ativada por primeiros mensageiros externos (neurotransmissores, hormônios ou fármacos) que se ligam a um receptor acoplado à proteína G (LEE; MAURICE; BAILLIE, 2013). O GMPc, por sua vez, é sintetizado a partir do GTP pela enzima guanilato ciclase (GC) (RUTH, 1999). Nas células do MLV, a GC pode ocorrer de duas formas, a GC presente na membrana plasmática, o qual é ativada por peptídeos natriuréticos, ou a GC solúvel, que está presente no citoplasma e pode ser ativada pelo óxido nítrico ou fármacos doadores de óxido nítrico (MUNZEL et al, 2003). Ambos os nucleotídeos cíclicos são degradados por enzimas denominadas de fosfodiesterases (PDEs) (LUGNIER, 2006).

Uma vez sintetizados, o AMPc e o GMPc iniciam sua sinalização intracelular por ativar, respectivamente, uma proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (MAURICE et al, 2014). A PKA é uma proteína heterotrimérica, composta por duas subunidades catalíticas e duas subunidades regulatórias. A ligação do AMPc às subunidades regulatórias promove uma alteração conformacional dessa proteína, resultando em dissociação do

complexo. As subunidades catalíticas, por estarem livres, fosforilam substratos proteicos específicos, promovendo seus efeitos biológicos (NEWTON; SMITH, 2004). A PKG é uma proteína homodimérica, composta de um domínio N-terminal, um domínio regulatório e um domínio catalítico. É o domínio N-terminal da PKG que interage com os substratos proteicos específicos (TSAI; KASS, 2009).

Apesar do AMPc e do GMPc modular a atividade de uma proteína quinase específica, como citado anteriormente, vale ressaltar que em situações em que estes nucleotídeos cíclicos se encontram em concentrações citosólicas bastante altas (aproximadamente 10 vezes mais), cada um deles pode ativar ambas proteínas quinases, PKA e PKG (REMBOLD, 1992).

Nas células do MLV, o aumento na concentração de AMPc e GMPc é um dos principais fatores que está relacionado com a redução dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e consequente relaxamento dessa musculatura. Os mecanismos que provavelmente estão envolvidos nesse efeito são: 1) a recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o RS, a inibição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, o aumento do efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e/ou a redução do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular; 2) a hiperpolarização da membrana celular pela ativação de canais para  $\text{K}^+$ ; 3) a diminuição na sensibilidade do  $\text{Ca}^{2+}$  pela maquinaria contrátil devido a uma redução na atividade da MLCK e/ou elevação na atividade da MLCP; e 4) a redução na sensibilidade da maquinaria contrátil pela desfosforilação da  $\text{MLC}_{20}$  (MORGADO et al, 2012).

### **2.3 Considerações sobre as Fosfodiesterases**

As fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) são uma superfamília de enzimas, do tipo fosfohidrolases, que catalisam de maneira seletiva a hidrólise da ligação 3'-fosfodiéster do AMPc e GMPc resultando na formação de seus metabólitos inativos 5'-AMP e 5'-GMP, respectivamente (BENDER; BEAVO, 2006). As PDEs representam a principal via para uma diminuição rápida nos níveis desses segundos mensageiros dentro da célula e, desta forma, desempenham um papel crucial na sinalização intracelular (BOBIN et al, 2016; KERAVIS; LUGNIER, 2012).

Atualmente as PDEs estão classificadas em onze famílias (PDE1 a PDE11) (Tabela 1). Cada família compreende de um a quatro genes distintos que, nas células dos mamíferos, codificam mais de 50 diferentes isoenzimas de PDEs (CONTI, 2000; CONTI; BEAVO, 2007; FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011). Essa

**Tabela 1** – Classificação, distribuição nos tecidos e inibidores de referência das PDEs

<b>Família</b>	<b>Substrato</b>	<b>Características</b>	<b>Localização</b>	<b>Inibidores</b>
<b>PDE1</b>	AMPc e GMPc	Estimulada por Ca <sup>2+</sup> -CaM	Cérebro, Coração, rim, fígado, músculo esquelético, músculo liso vascular e visceral.	Nimodipino, IC224
<b>PDE2</b>	AMPc e GMPc	Estimulada por GMPc	Córtex adrenal, cérebro, corpo cavernoso, rim, fígado, coração, músculo liso visceral e músculo esquelético.	EHNA, BAY60-7550, Oxindol e músculo esquelético.
<b>PDE3</b>	AMPc > GMPc	Inibida por GMPc	Corpo cavernoso, coração, plaquetas, músculo liso vascular e visceral, fígado, rim.	Cilostamida, Milrinona, Cilostazol
<b>PDE4</b>	AMPc	Específica para AMPc, Insensível a GMPc	Rim, pulmão, cérebro, mastócitos, coração, músculo esquelético, músculo liso vascular e visceral.	Rolipram, Cilomilast, Roflumilast, Zardaverina
<b>PDE5</b>	GMPc	Específica para GMPc, fosforilada por PKA/PKG	Corpo cavernoso, plaquetas, músculo esquelético, músculo liso visceral e vascular.	Zaprinast, DMPPO, Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil
<b>PDE6</b>	GMPc	Específica para GMPc	Retina.	Zaprinast, DMPPO, Sildenafil, Vardenafil
<b>PDE7</b>	AMPc	Específica para AMPc	Músculo esquelético, coração e linfócitos.	BRL 50481, IC1242
<b>PDE8</b>	AMPc	Específica para AMPc	Testículo, ovário, baixo intestino e cólon.	PF-04957325
<b>PDE9</b>	GMPc	Específica para GMPc	Baço, intestino e cérebro.	BAY73-6691, PF-04447943
<b>PDE10</b>	AMPc e GMPc	Hidrolisa GMPc, inibida por AMPc	Cérebro, testículo e tireoide.	Papaverina, TP-10
<b>PDE11</b>	AMPc e GMPc	Ligação com dois GMPc	Células esqueléticas, próstata, bexiga, células secretoras, testículos, fígado e rim.	Desconhecido

Fonte: Adaptado de KERAIVIS; LUGNIER, 2012; LUGNIER, 2006; MAURICE et al, 2014.

classificação em famílias está relacionada às diferenças nas funções celulares, estruturas primárias, afinidade ao AMPc e ao GMPc, propriedades catalíticas e respostas a inibidores, ativadores e efetores específicos, bem como aos

mecanismos de regulação das PDEs (BENDER; BEAVO, 2006; MAURICE et al, 2014).

A regulação das PDEs ocorre a nível genético ou por diversos mecanismos bioquímicos, tais como fosforilação e desfosforilação, ligação alostérica ao AMPc ou GMPc, ligação ao complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina e várias interações proteína-proteína (BENDER; BEAVO, 2006).

A organização estrutural das PDEs exhibe três domínios funcionais: um domínio C-terminal, um núcleo catalítico conservado e um domínio regulatório N-terminal. A região C-terminal é similar em todas as famílias de PDE, exceto na PDE6. O domínio catalítico contém cerca de 250 a 300 aminoácidos mostrando um alto grau de conservação dessa região entre as onze famílias de PDE (OTERO et al, 2014). No entanto, cada isoforma da enzima difere acentuadamente na região regulatória N-terminal (MAURICE et al, 2014).

Os domínios catalíticos são responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos cíclicos (AZEVEDO; KÜMMERLE, 2015). Estes domínios possuem sequências específicas para cada família, o que determina os alvos distintos de cada PDE (LEE; MAURICE; BAILLIE, 2013). As últimas evidências descritas na literatura sugerem que a especificidade aos substratos das PDEs é conferida pela orientação de um resíduo de glutamina dentro do sítio catalítico, o qual pode formar ligações de hidrogênio com o AMPc, o GMPc ou ambos, dependendo da sua orientação fixa ou capacidade de rotação (OTERO et al, 2014). As famílias PDE4, PDE7 e PDE8 hidrolisam seletivamente o AMPc; PDE5, PDE6 e PDE9 fazem a hidrólise seletiva do GMPc; e as demais famílias (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 e PDE11) hidrolisam ambos os nucleotídeos (Tabela 1) (BOBIN et al, 2016; LEE; MAURICE; BAILLIE, 2013).

O domínio N-terminal exhibe uma grande diversidade entre as famílias de PDE e essas diferenças são cruciais para o entendimento da regulação e localização celular das diferentes isoformas da enzima. Essa região inclui o domínio de ligação à calmodulina, encontrada na PDE1; os domínios de ligação ao GMPc, encontrados nas famílias PDE2, 5, 6, 10 e 11; e as chamadas *upstream conserved region 1* e *2* (UCR1 e UCR2), encontradas na PDE4 (OTERO et al, 2014).

Nos mamíferos, as PDEs encontram-se distribuídas de forma ubíqua (LUGNIER, 2006). Apenas um tipo de célula pode expressar diferentes isoformas dessas enzimas (BENDER; BEAVO, 2006). A ampla distribuição das PDEs pode

influenciar em muitas funções celulares, tais como a produção e ação de mediadores pró-inflamatórios, diferenciação, apoptose, lipogênese, gliconeogênese, glicogenólise, agregação plaquetária, resposta erétil e resposta visual, além de funções cardíacas, regulação de canais iônicos e a contração do MLV (RAHIMI et al, 2010; JUILFS et al., 1999; PERRY; HIGGS, 1998).

Alteração na atividade das PDEs tem sido associada ao desenvolvimento de doenças, como a asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, disfunção erétil, doenças autoimunes, esquizofrenia, depressão, claudicação, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca e hipertensão (LUGNIER, 2011). Desta forma, as PDEs tem sido, cada vez mais, consideradas importantes alvos terapêuticos, principalmente ao que se refere às doenças de origem multifatorial (LUGNIER, 2006).

## **2.4 Fosfodiesterase como Alvo de Fármacos**

A teofilina foi o primeiro inibidor de PDE descrito na literatura (LUGNIER, 2006). Entretanto, não estava clara a vantagem terapêutica que a inibição dessas enzimas poderia proporcionar. Um dos motivos que levaram os pesquisadores a considerar as PDEs como possíveis alvos de fármacos foi o princípio básico da farmacologia de que a regulação das taxas de degradação de qualquer ligante ou segundo mensageiro pode alterar muito mais a concentração dos mesmos ao comparar com a regulação da sua síntese. No caso das PDEs, esse pressuposto foi ratificado quando se constatou que na maioria das células a atividade desta enzima é bem maior, quando comparado à sua atividade ciclase, tanto para o AMPc, quanto para o GMPc. A baixa concentração intracelular dos substratos (aproximadamente de 1 a 10  $\mu\text{M}$ ) também foi outra razão para que as PDEs fossem consideradas bons alvos terapêuticos, visto que um inibidor competitivo não necessitaria competir com altos níveis de substratos endógenos para exercer seus efeitos (BENDER; BEAVO, 2006).

Posteriormente, observou-se que alterações na sinalização intracelular relacionadas à desregulações das PDEs podem contribuir para explicar as dificuldades observadas na prevenção e tratamento, assim como no desenvolvimento de patologias como a inflamação, o câncer, distúrbios

neurodegenerativos e doenças cardiovasculares (FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011; KERAVIS; LUGNIER, 2012).

A descoberta de inibidores específicos e potentes para cada família de PDE alavancou ainda mais as pesquisas e a cada dia, o impacto funcional e as utilidades terapêuticas destes inibidores vem ganhando grande reconhecimento (AHMAD et al, 2015; CORBIN; FRANCIS, 1999; MAURICE et al, 2014). Exemplo disso é o Sildenafil, um inibidor seletivo para a PDE5. O Sildenafil inicialmente foi descoberto e introduzido no mercado farmacêutico para tratar a disfunção erétil e acabou gerando grande repercussão ao se tornar um dos medicamentos mais vendidos nos Estados Unidos. Atualmente, este fármaco tem sido considerado bastante promissor no tratamento de diversas patologias, como por exemplo, na hipertensão arterial pulmonar e em diversas outras disfunções relacionadas à musculatura lisa (AZEVEDO et al, 2014; BOSWELL-SMITH; SPINA; PAGE, 2006).

Em relação ao MLV, o primeiro achado que evidencia o papel das PDEs sobre ele foi a descoberta de que a papaverina, um fármaco vasodilatador, inibia PDEs nos vasos sanguíneos (KUKOVETZ; POCH, 1970). Após essa constatação, iniciaram-se mais estudos para avaliar o papel dessas enzimas na musculatura vascular (LUGNIER, 2011). Atualmente, já é bem estabelecido que a elevação nos níveis de AMPc e GMPc no MLV promove efeito vasorrelaxante, devido à redução dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular (LUGNIER, 2006). As famílias identificadas nesta musculatura foram as PDEs 1, 3, 4 e 5 (LUGNIER, 2011).

Além da vasodilatação, muitos fármacos que inibem as PDEs vasculares são capazes de promover ação cardiotônica, anti-agregante plaquetária e inibidora da proliferação vascular (CONTI et al, 1995; KE, 2004; RAHIMI et al, 2010). Sendo assim, inibidores de PDEs tem atraído, cada vez mais, o interesse para o uso clínico em doenças do sistema cardiovascular (RAHIMI et al, 2010).

## **2.5 Fosfodiesterase 4 e o AAL 195**

A PDE4 é uma das famílias de fosfodiesterase mais bem exploradas atualmente (OTERO et al, 2014). Ela é responsável em promover a hidrólise seletiva do AMPc (GIEMBYCZ, 2005). O aumento da atividade da PDE4 resulta no retorno dos níveis desse segundo mensageiro para o seu estado basal (ESKANDARI et al, 2015). Inibidores seletivos dessa família vêm sendo extensamente estudados nas

últimas décadas devido ao seu grande potencial clínico em diversas doenças (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005). Fármacos que inibem seletivamente essa enzima atuam por competição direta com o substrato, portanto, promovem a elevação dos níveis intracelulares do segundo mensageiro (KE, 2004).

A PDE4 pode ser encontrada em vários tipos celulares, como descrito na tabela 1. O envolvimento da PDE4 em processos patológicos associados aos tecidos em que ela se encontra, sugere um grande potencial para intervenções farmacológicas em uma variedade de distúrbios inflamatórios, neurológicos, angiogênicos e vasculares (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005).

Essa família é codificada por quatro genes, denominados PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D, dos quais originam mais de 25 isoformas distintas, tornando a família PDE4 a mais vasta dentre as demais PDEs (ESKANDARI et al, 2015; KERAVIS; LUGNIER, 2012). A expressão das isoformas de PDE4 varia com o tipo celular e o sítio intracelular em que estão compartimentalizadas (AZEVEDO; KÜMMERLE, 2015). No MLV, a isoforma predominante é a PDE4D (HOUSLAY; BAILLIE; MAURICE, 2007; HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005).

O rolipram foi o primeiro inibidor identificado como seletivo para a PDE4. Inicialmente ele foi desenvolvido para o tratamento da depressão, no entanto, ao passar por testes de ensaios clínicos seu uso não foi permitido devido à sua estreita janela terapêutica, com efeitos colaterais como náuseas e distúrbios no trato gastrointestinal (BOSWELL-SMITH; SPINA; PAGE, 2006). Apesar da limitação em seu uso, o rolipram instigou novos estudos a fim de buscar inibidores de PDE4 com uma maior janela terapêutica e com menos efeitos colaterais (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005; PERRY; HIGGS, 1998).

Outros fármacos inibidores de PDE4, tais como a zardaverina e o piclamilaste, tiveram seus usos limitados devido à estreita janela terapêutica que apresentaram (LIPWORTH, 2005). No entanto, os inibidores roflumilaste e cilomilaste foram aprovados para o uso clínico no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica e redução da inflamação das vias aéreas, ambos com segurança e eficácia terapêutica comprovada (AHMAD et al, 2015; CHONG; LEUNG; POOLE, 2013; LEE et al, 2016; LI et al, 2016; ROGLIANI et al, 2016).

Além disso, há ensaios pré-clínicos para inibidores de PDE4 e seus efeitos nos leucócitos, na secreção de muco em doenças das vias aéreas, no câncer (efeitos antitumor e anti-angiogênico) e no sistema nervoso central (HOUSLAY;

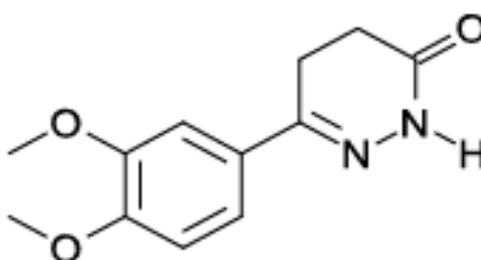
SCHAFER; ZHANG, 2005). Ademais, estudos mostraram inibidores de PDE4 capazes de promover o relaxamento do MLV (ORALLO et al, 2005; TANAKA et al, 1988; WALDKIRCH et al, 2010).

A partir da otimização estrutural da zardaverina e do rolipram, foram sintetizadas várias moléculas a fim de se obter um inibidor seletivo para a PDE4, com melhores propriedades farmacológicas. Uma das moléculas que mostraram grande potencial inibitório foi o AAL 195, cuja principal característica é o sistema piridazinona em sua estrutura (Figura 3) (KRIER et al., 2005). O anel piridazinona representa um heterociclo de seis membros que contém dois átomos de nitrogênio adjacentes e uma carbonila (AKHTAR et al, 2016).

Na literatura, compostos que contem este anel demonstraram possuir muitos efeitos, como antidiabético, antiinflamatório, analgésico, antiplaquetário, brocodilatador e anti-hipertensivo, além de propriedades inotrópica positiva, cardiotônica e vasodilatadora, através da inibição de PDEs (AKHTAR et al, 2016; BANOGLU et al, 2004; CHEN et al, 1997; DUBEY; BHOSLE, 2015; VAN DER MEY et al, 2003). Inclusive, alguns fármacos derivados da piridazinona foram desenvolvidos, a exemplo da minaprina, como antidepressivo; emorfazona, como antiinflamatório; e indolidan, pimobendan e levosimendan, como anti-hipertensivos (DUBEY; BHOSLE, 2015).

AAL 195 foi submetido a ensaios de *binding* e modelagem molecular, onde demonstrou possuir alta potência inibitória para a PDE4 ( $CI_{50} = 2 \mu M$ ) (KRIER et al, 2005). Após a análise da relação estrutura-atividade das moléculas sintetizadas, observou-se que AAL 195 é mais seletivo à PDE4 em relação às demais (ARAÚJO-JÚNIOR et al, 2015). Sendo assim, AAL 195 pode ser considerado um potente e seletivo inibidor de PDE4.

**Figura 3** – Estrutura química do AAL 195.



(Adaptado de KRIER et al, 2005)

Sabendo-se que a PDE4 está presente nas células do músculo liso vascular e após a constatação do AAL 195 como um inibidor seletivo para essa família de enzimas, decidiu-se investigar o efeito vasorrelaxante desse composto, utilizando, para esse fim, o modelo de artéria mesentérica superior isolada de rato.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito vasorrelaxante do composto AAL 195 em ratos, bem como elucidar os possíveis mecanismos de ação que envolve esse efeito.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito vasorrelaxante de AAL 195 sobre a artéria mesentérica superior de ratos, bem como a participação do endotélio vascular nesse efeito;
- Caracterizar a especificidade do efeito vasorrelaxante, frente a contrações por diferentes agonistas;
- Investigar o papel dos canais para potássio no efeito;
- Avaliar a influência dos íons cálcio e de sua liberação intracelular.

## **4 MATERIAL**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), todos com peso em torno de 250-300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os mesmos foram mantidos no biotério setorial do Núcleo de Pesquisa Experimental (NUCIEEX), sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1$  °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas, e tendo livre acesso à água e a alimentação. Os protocolos realizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFAL, nº: 006/2013 (Anexo A).

### **4.2 Substâncias Utilizadas**

Na realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes substâncias: Cloridrato de fenilefrina (FEN), Cloridrato de Acetilcolina (ACh), Glibenclamida (GLIB), 4-aminopiridina (4-AP), Cafeína e Cremofor - todas obtidos da Sigma-Aldrich® Brazil – e tetraetilamônio, obtido da Fluka®. Para a preparação das soluções estoques, a GLIB foi dissolvida em DMSO e as demais soluções estoque foram dissolvidas em água destilada. Todas as soluções foram mantidas entre 0 a 4 °C e somente retiradas no momento do experimento.

### **4.3 Preparação das Soluções de AAL 195**

AAL 195 foi solubilizado em cremofor (3 % por mL de solução) e diluído em água destilada na concentração de  $10^{-1}$  M para os experimentos. Este foi estocado a 0 °C, sendo novamente diluído de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final de cremofor em cada cuba nunca excedeu 0,01%. Nesta concentração o cremofor foi desprovido de efeito farmacológico.

#### 4.4 Soluções Fisiológicas

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de magnésio hexa-hidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), fosfato de sódio mono-hidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e EDTA. A tabela a seguir mostra as composições das soluções utilizadas:

**Tabela 2** – Composição das soluções nutritivas (todas com pH 7,4).

Sal	Concentração (mM)							
	Solução 1	Solução 2	Solução 3	Solução 4	Solução 5	Solução 6	Solução 7	Solução 8
NaCl	158,3	158,3	158,3	102,3	102,3	102,3	142,3	82,3
KCl	4,0	4,0	4,0	60,0	60,0	60,0	20,0	80,0
$\text{CaCl}_2$	2,0	-	-	2,0	-	-	2,0	2,0
$\text{MgCl}_2$	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05
$\text{NaHCO}_3$	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
Glicose	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
EDTA	-	-	10	-	-	10	-	-

**Solução 1:** Solução nutritiva Tyrode

**Solução 2:** Solução nutritiva Tyrode nominalmente sem cálcio

**Solução 3:** Solução nutritiva Tyrode livre de cálcio

**Solução 4:** Solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 60 mM

**Solução 5:** Solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 60 mM nominalmente sem cálcio

**Solução 6:** Solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 60 mM livre de cálcio

**Solução 7:** Solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 20 mM

**Solução 8:** Solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 80 mM

(Adaptado de TANAKA; MOCHIZUKI; SHIGENOBU, 1999)

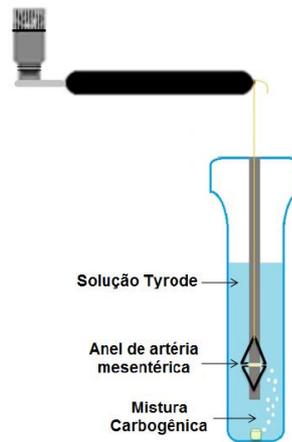
## 5 MÉTODO

### 5.1 Preparações de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Rato Com ou Sem Endotélio Funcional

Os ratos foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia. Através de uma incisão no abdômen do animal, a artéria mesentérica superior foi identificada, removida, dissecada para a remoção de todo o tecido conectivo e adiposo, e seccionada em anéis (1 – 2 mm). Os anéis da artéria foram inseridos em hastes metálicas, suspensos por fios de algodão num transdutor de força. As preparações foram mantidas em uma cuba para órgãos isolados contendo 5 mL de solução nutritiva Tyrode (pH = 7,4), aerada com uma mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), a uma temperatura de 37 °C (Figura 4). O registro da tensão isométrica do músculo foi realizado através do transdutor de força (AECAD 1604, AVS Projetos, Brasil), acoplado a um sistema de aquisição de dados (AQCAD, AVS Projetos, Brasil) (Figura 5). Os anéis foram submetidos a uma tensão constante de 0,5 g por um período de estabilização de 1 hora. Durante esse tempo a solução nutritiva foi substituída a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Para avaliar a presença do endotélio funcional intacto, foi induzida uma contração com 10 µM de fenilefrina (FEN) e, após o platô, foi adicionado 10 µM de acetilcolina (ACh) ao meio. Foram considerados anéis com endotélio funcional quando o vasorrelaxamento foi maior ou igual a 70% da contração e sem endotélio, aqueles que promoviam vasorrelaxamento menor ou igual a 10 % da contração.

**Figura 4** – Representação esquemática da cuba para órgãos isolados.



(MACHADO, 2013)

**Figura 5** – Aparato utilizado para registros de tensões isométricas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.



(AUTOR, 2017)

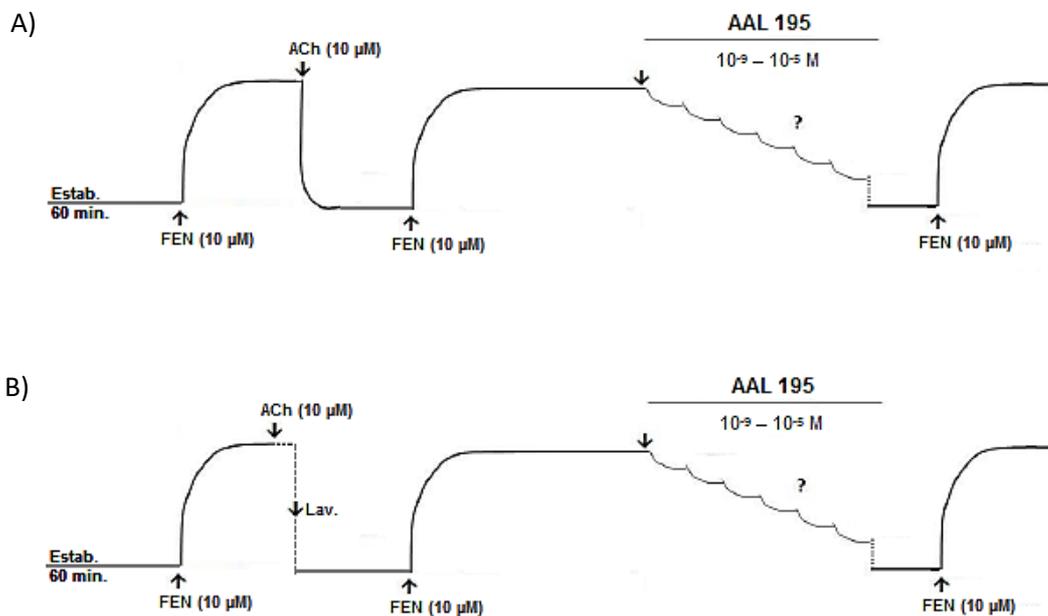
## 5.2 Protocolos Experimentais Utilizando Anéis de Artéria Mesentérica Superior de Rato

### 5.2.1 Avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN

Após a verificação da integridade do endotélio funcional, como descrito no item 5.1, uma nova contração com FEN (10  $\mu$ M) foi induzida. Após atingir o platô, esperou-se um período de 40 minutos para a estabilização da contração e foram

adicionadas concentrações crescentes de AAL 195 ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M), de maneira cumulativa, tanto em anéis com endotélio como em anéis sem endotélio (Figura 6). Em seguida, para avaliar um possível dano tecidual induzido por AAL 195, foram realizadas lavagens sucessivas com solução Tyrode, esperando-se um novo período de estabilização, e uma nova contração com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ) foi obtida.

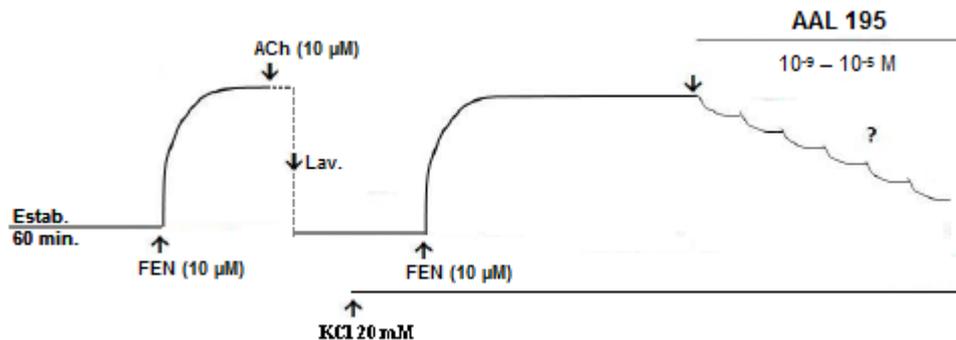
**Figura 6** – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN, com endotélio (A) ou sem endotélio (B) vascular.



### 5.2.2 Avaliação da participação de canais para $\text{K}^+$ no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Após a verificação da ausência do endotélio, como descrito no item 5.1, a solução Tyrode foi trocada pela solução despolarizante de Tyrode com KCl a 20 mM e as preparações permaneciam nesta solução até o final do experimento. Após 30 minutos foi induzida uma nova contração com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ) e, em seguida, uma nova curva concentração-resposta cumulativa para AAL 195 ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M) foi obtida (Figura 7). O vasorelaxamento obtido na presença de KCl 20 mM foi comparado com o obtido na ausência do mesmo.

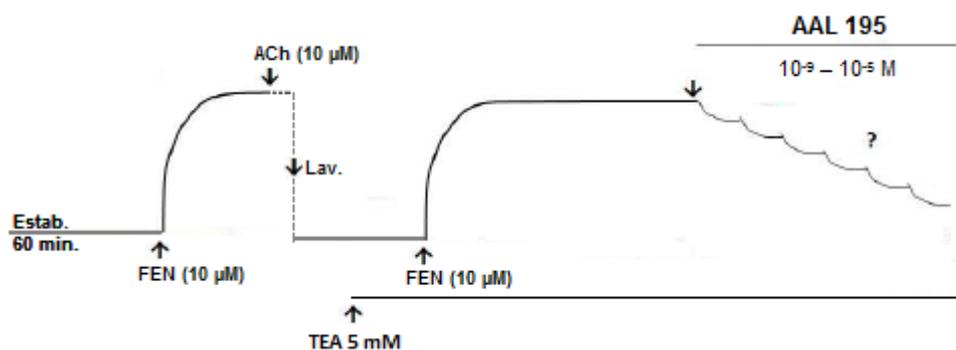
**Figura 7** – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com solução Tyrode de KCl a 20 mM, .



### 5.2.3 Efeito do AAL 195 sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de TEA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Após a verificação da ausência do endotélio, como descrito no item 5.1, as preparações foram incubadas com 5 mM de TEA, um bloqueador não seletivo de canais para  $K^+$ . Após 30 minutos, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (10 µM) e, em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa para o AAL 195 ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M) foi obtida (Figura 8).

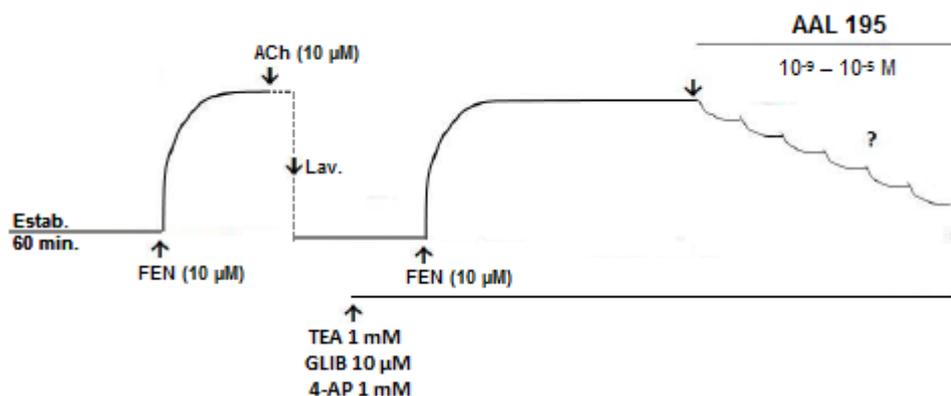
**Figura 8** – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com TEA (5 mM),.



#### 5.2.4 Identificação dos canais para $K^+$ envolvidos no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Após a verificação da ausência do endotélio, como descrito no item 5.1, as preparações foram incubadas separadamente com  $10\ \mu\text{M}$  de GLIB, um bloqueador seletivo de canais  $K_{\text{ATP}}$  (HUANG; KWOK, 1997; MOMBOULI; VANHOUTTE, 1997), com  $1\ \text{mM}$  de 4-AP, um bloqueador dos canais  $K_{\text{v}}$  (OKABE; KITAMURA; KURIYAMA, 1987) ou com  $1\ \text{mM}$  de TEA, que nesta concentração é considerado um bloqueador de canais  $BK_{\text{Ca}}$  (GARCIA; KACZOROWSKI, 1992). Após 30 minutos, foi induzida uma nova contração tônica com FEN ( $10\ \mu\text{M}$ ) e, em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa para o AAL 195 ( $10^{-9} - 10^{-5}\ \text{M}$ ) foi obtida (Figura 9).

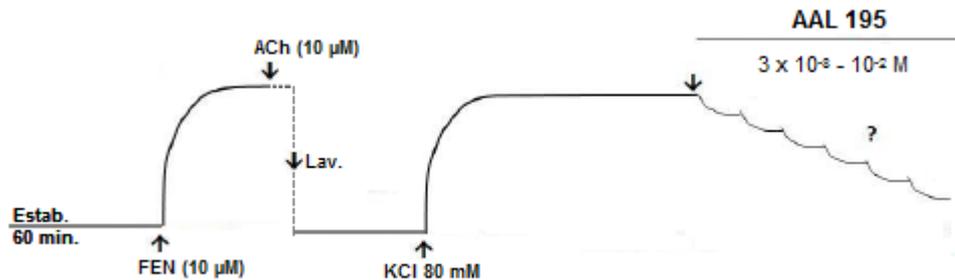
**Figura 9** – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com TEA ( $1\ \text{mM}$ ), GLIB ( $10\ \mu\text{M}$ ) ou com 4-AP ( $1\ \text{mM}$ ).



#### 5.2.5 Avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com solução Tyrode com KCl a $80\ \text{mM}$

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito no item 5.1, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado por uma solução Tyrode com KCl a  $80\ \text{mM}$ . Durante a fase tônica da contração foi obtida uma curva concentração-resposta cumulativa para o AAL 195 ( $3 \times 10^{-8} - 10^{-2}\ \text{M}$ ) (Figura 10).

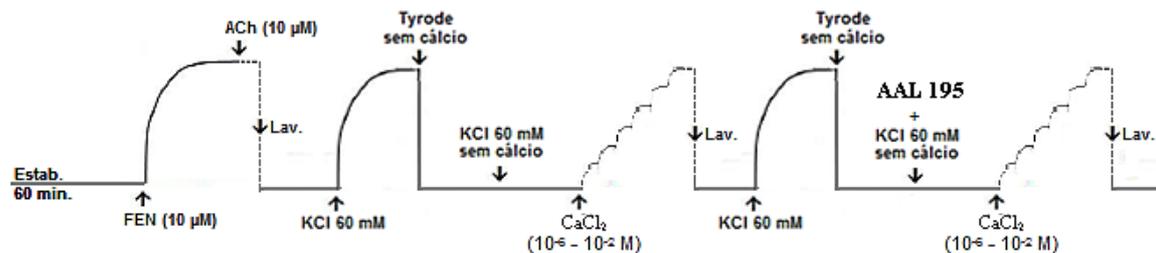
**Figura 10** – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com solução despolarizante Tyrode (KCl 80 mM), sem endotélio vascular.



### 5.2.6 Avaliação do efeito de AAL 195 sobre o influxo de cálcio extracelular

Em anéis sem endotélio funcional, o Tyrode foi substituído pela solução despolarizante com KCl a 60 mM (curva padrão). As preparações foram lavadas com solução Tyrode nominalmente sem  $\text{Ca}^{+2}$  e nela mantidas por 15 minutos. Em seguida, os anéis foram expostos a solução despolarizante de KCl 60 mM nominalmente sem  $\text{Ca}^{+2}$  por 15 minutos, e uma curva concentração-resposta foi obtida pela adição cumulativa de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$  -  $10^{-2}$  M) ao meio. AAL 195 ( $3 \times 10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $3 \times 10^{-5}$ ;  $10^{-3}$ ;  $3 \times 10^{-3}$  e  $10^{-2}$  M), em preparações individuais, foi incubado por 15 minutos. Logo após foi obtida uma nova curva cumulativa ao  $\text{CaCl}_2$  (Figura 11). Os resultados foram analisados comparando-se os efeitos máximos ( $E_{\text{máx}}$ ) das curvas com  $\text{CaCl}_2$  na ausência (controle) e na presença das diferentes concentrações do AAL 195.

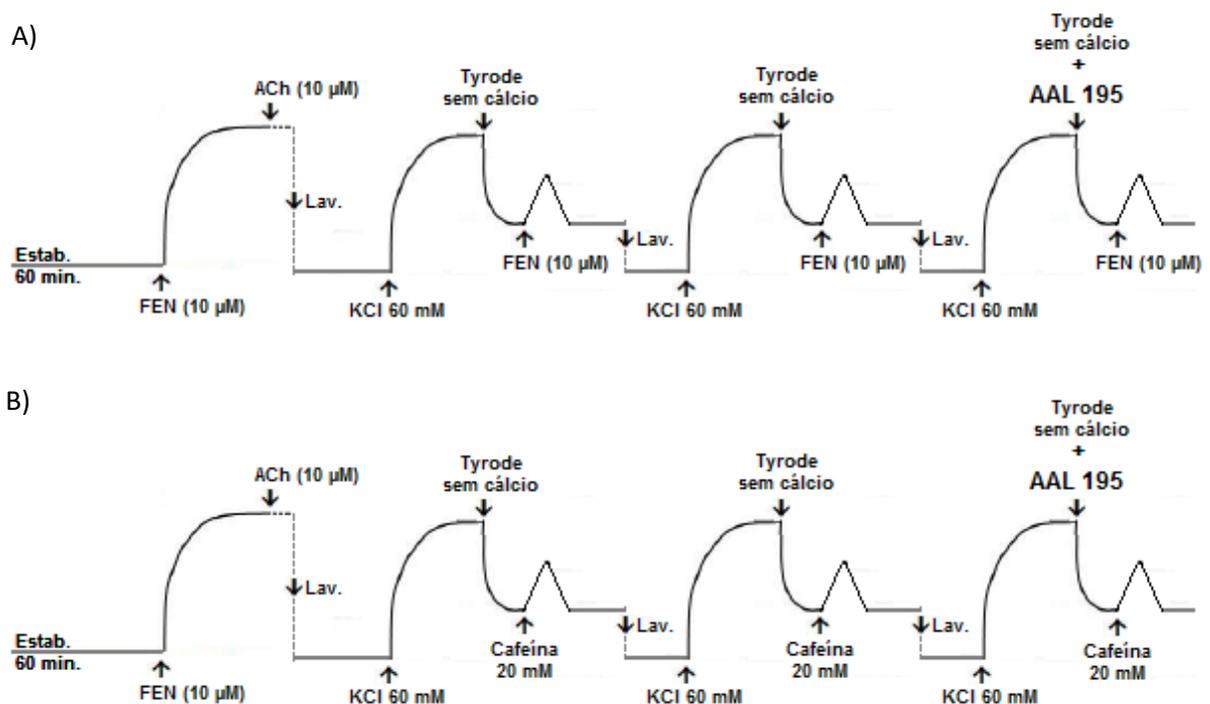
**Figura 11** – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar o efeito do AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sobre o influxo de cálcio extracelular.



### 5.2.7 Avaliação do efeito de AAL 195 sobre a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares

Este protocolo objetivou investigar os efeitos de AAL 195 sobre as contrações induzidas pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, utilizando anéis sem endotélio funcional. Após um período de estabilização de 30 minutos, os anéis mesentéricos foram expostos à solução Tyrode com KCl à 60 mM por 3 minutos. Estas preparações foram lavadas com solução Tyrode livre de  $\text{Ca}^{2+}$  por 2 minutos e em seguida 10  $\mu\text{M}$  de FEN (banho à temperatura de 37 °C) ou 20 mM de cafeína (banho à temperatura de 21 °C) foram adicionados. Este procedimento foi repetido para a obtenção de duas contrações transientes similares ao agonista. AAL 195 foi então acrescentado ao meio e depois de 2 minutos, FEN (10  $\mu\text{M}$ ) ou cafeína (20 mM) foram adicionadas novamente (Figura 12).

**Figura 12** – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sobre a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares. Agonistas: (A) FEN e (B) cafeína.



### 5.3 Análise Estatística

Os Valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). Para avaliar a significância das diferenças entre as médias foram utilizados o teste *t de Student* ou a análise de variância “One-way” (ANOVA) para amostras não pareadas, seguida do pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas quando valor de “p” foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Para avaliar o efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195, dois parâmetros farmacológicos foram analisados: o  $E_{\text{máx}}$  (média percentual do efeito máximo induzido pela substância) e o  $pD_2$  (logaritmo negativo da concentração da droga que produz 50% do efeito máximo,  $-\log CE_{50}$ ), que representam, respectivamente, a eficácia e a potência farmacológica.

A análise estatística e a plotagem dos gráficos foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 3.0.

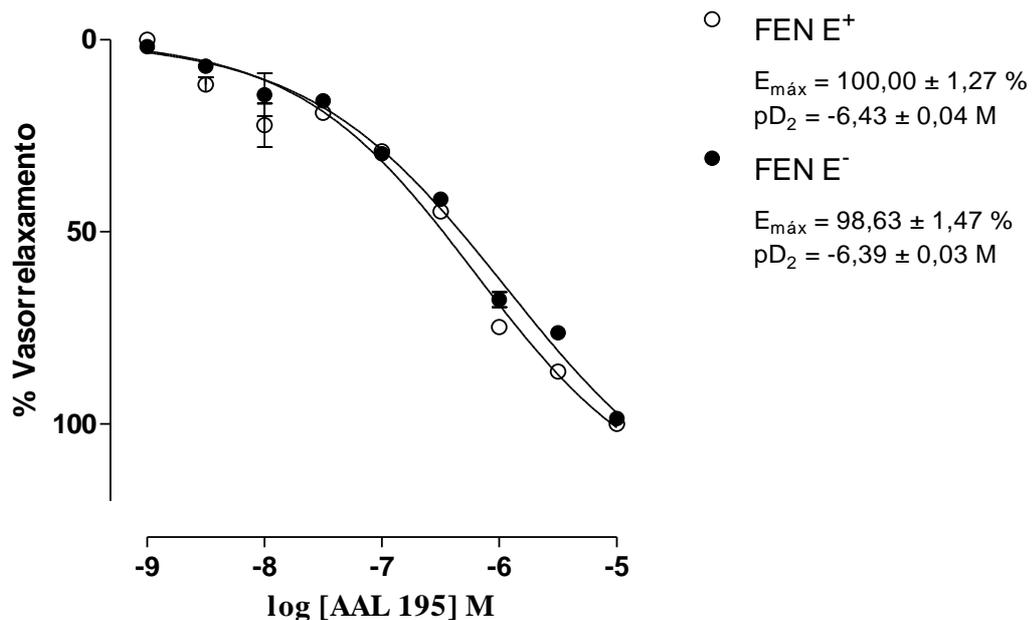
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Efeito do AAL 195 sobre as Contrações Induzidas por FEN em Anéis de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Ratos

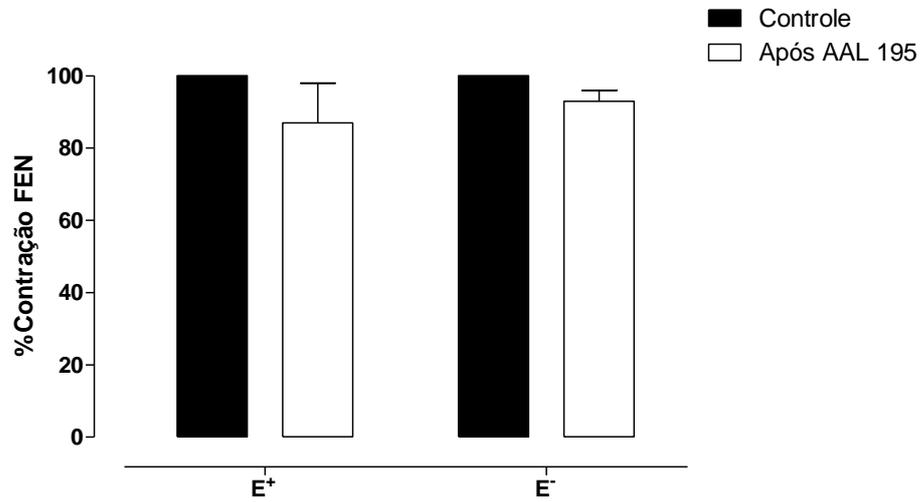
Em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN, concentrações crescentes de AAL 195 ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M) foram capazes de promover vasorrelaxamento de maneira dependente de concentração ( $E_{m\acute{a}x} = 100,00 \pm 1,27 \%$ ). Após remoção do endotélio, o efeito vasorrelaxante não foi alterado significativamente ( $E_{m\acute{a}x} = 98,63 \pm 1,47 \%$ ). Do mesmo modo, a potência entre os anéis com o endotélio funcional ( $pD_2 = -6,43 \pm 0,04$  M) e sem o endotélio ( $pD_2 = -6,39 \pm 0,03$  M) não foram significativamente diferentes (Gráfico 1).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração de AAL 195 foi de aproximadamente 5 minutos. No final dos experimentos houve uma completa reversão do vasorrelaxamento induzido por AAL 195 após verificação da resposta do tecido à FEN ( $10 \mu\text{M}$ ) (Gráfico 2).

**Gráfico 1** – Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar com endotélio intacto (o) ou sem endotélio (●), pré-contraídos com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos.



**Gráfico 2** – Porcentagem de contração da fenilefrina e recuperação do órgão após curva concentração resposta do AAL 195, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio intacto ( $E^+$ ) e sem o endotélio funcional ( $E^-$ ).

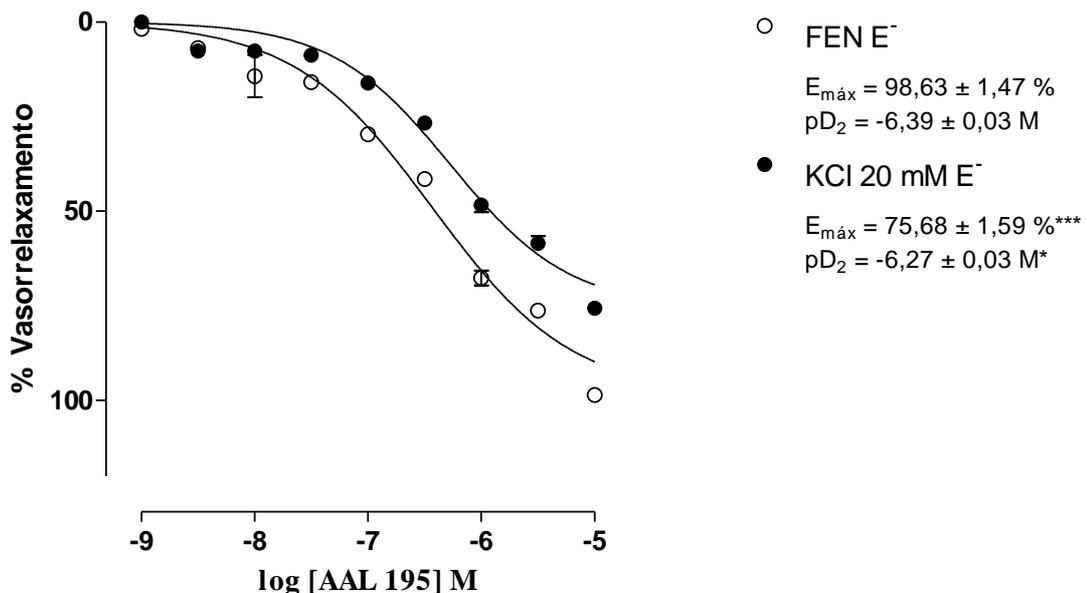


## 6.2 Participação dos Canais para K<sup>+</sup> no Efeito Vasorrelaxante induzido por AAL 195 em Anéis de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Ratos.

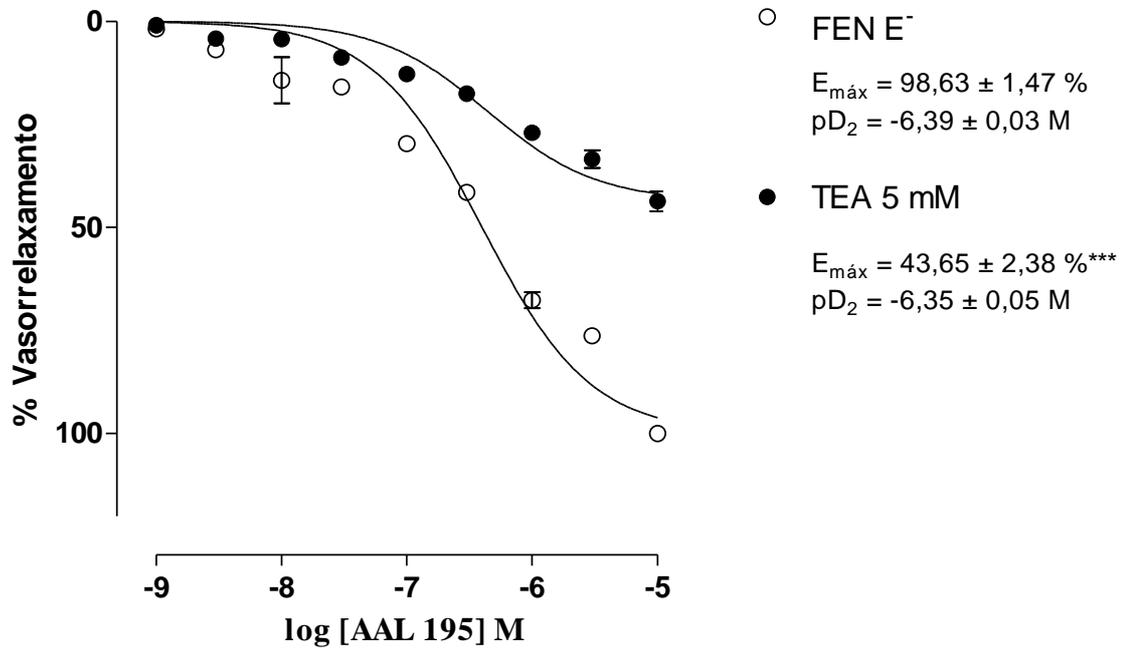
Em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN, na presença de solução Tyrode com KCl a 20 mM, concentrações crescentes de AAL 195 ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M) foram capazes de reduzir significativamente o efeito máximo ( $E_{m\acute{a}x} = 75,68 \pm 1,59 \%$ ) ( $p < 0,001$ ), comparados à curva controle, com redução significativa da potência farmacológica ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 3).

De maneira semelhante, em anéis mesentéricos pré-contraídos com FEN, na presença de TEA (5 mM), que nesta concentração é um inibidor não seletivo de canais para K<sup>+</sup>, concentrações crescentes de AAL 195 ( $10^{-9}$  –  $10^{-5}$  M) foram capazes de promover a redução do efeito máximo ( $E_{m\acute{a}x} = 43,65 \pm 2,38 \%$ ) ( $p < 0,001$ ), comparados ao controle. No entanto, não houve redução significativa da potência farmacológica (Gráfico 4).

**Gráfico 3** – Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio (o) e após o bloqueio com KCl 20 mM (●), pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos. \*\*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$  vs FEN E<sup>-</sup>.



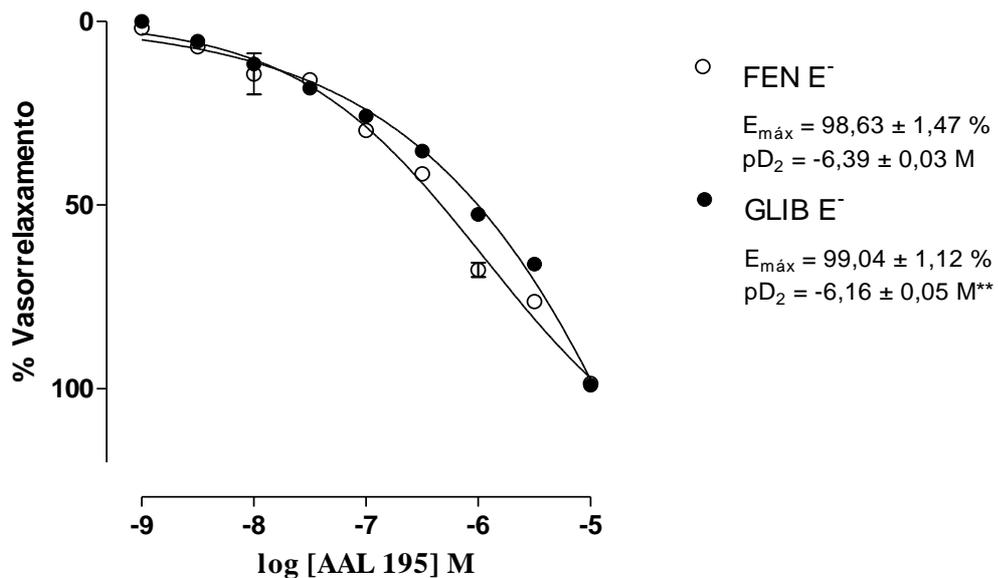
**Gráfico 4** – Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio (o) e após o bloqueio com TEA 5 mM (●), pré-contraindidos com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos. \*\*\* $p < 0,001$  vs FEN  $\text{E}^-$ .



### 6.3 Participação dos Canais para K<sup>+</sup> Sensíveis ao ATP no Efeito Vasorrelaxante induzido por AAL 195 em Anéis de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Ratos.

Em anéis sem endotélio, pré-contraídos com FEN, após o bloqueio com GLIB (10 μM), não houve deslocamento da curva concentração-resposta para o AAL 195 ( $E_{m\acute{a}x} = 99,04 \pm 1,12 \%$ ), no entanto, observou-se uma redução significativa da potência farmacológica ( $pD_2 = -6,16 \pm 0,05 M$ ) ( $p < 0,01$ ), quando comparados ao controle (Gráfico 5).

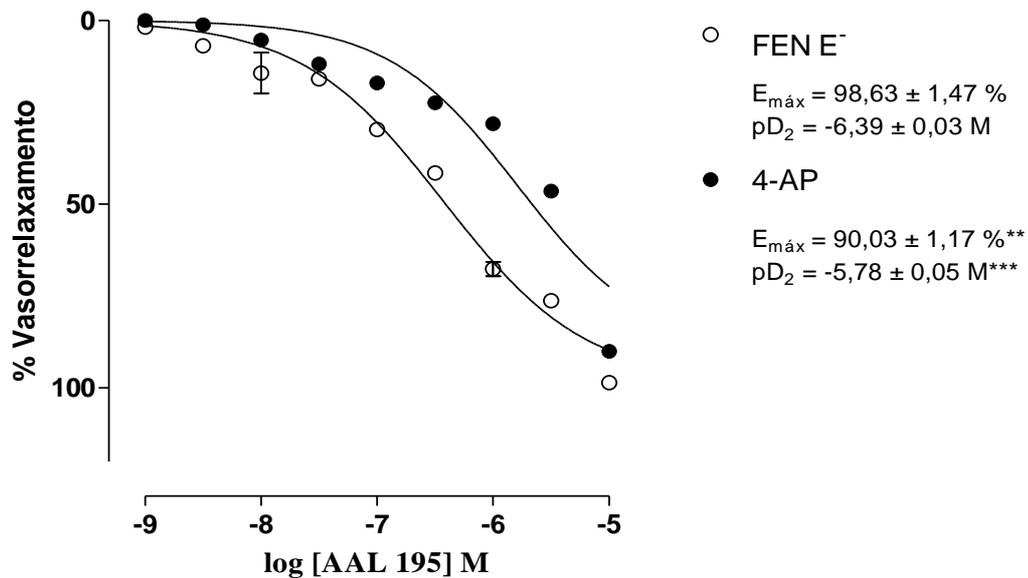
**Gráfico 5** – Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio (o) e após o bloqueio com GLIB (10 μM) (●), pré-contraídos com FEN (10 μM). Valores expressos com média ± e.p.m. de 7 experimentos. \*\* $p < 0,01$  vs FEN E<sup>-</sup>.



#### 6.4 Participação dos Canais para $K^+$ Sensíveis à Voltagem no Efeito Vasorrelaxante induzido por AAL 195 em Anéis de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Ratos

Em anéis sem endotélio, pré-contraídos com FEN, o bloqueio com 4-AP (1 mM), deslocou a curva concentração-resposta para o AAL 195 ( $p < 0,001$ ), com redução significativa do efeito máximo ( $p < 0,01$ ), quando comparado ao controle ( $E_{m\acute{a}x} = 90,03 \pm 1,17 \%$  e  $pD_2 = -5,78 \pm 0,05 M$ ) (Gráfico 6).

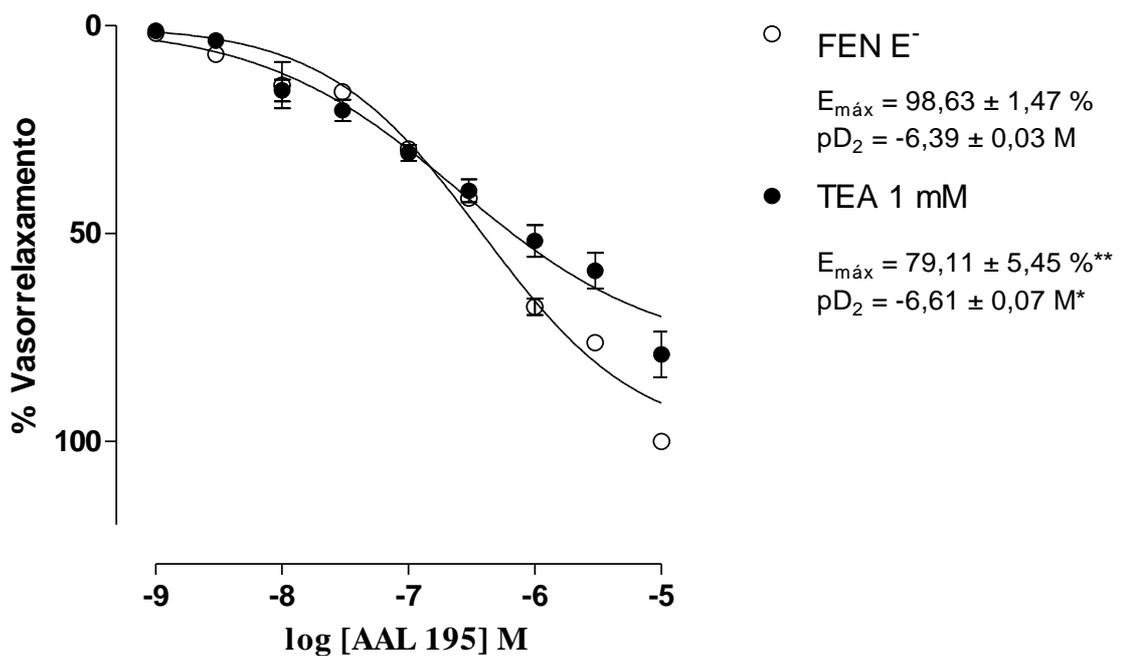
**Gráfico 6** – Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio (o) e após o bloqueio com 4-AP (1mM) (●), pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs FEN E $^-$ .



### 6.5 Participação dos Canais para $K^+$ de Grande Condutância Ativados pelo $Ca^{2+}$ no Efeito Vasorrelaxante induzido por AAL 195 em Anéis de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Ratos

Em anéis sem endotélio, pré-contraídos com FEN, o bloqueio com TEA (1 mM), deslocou para a direita a curva concentração-resposta para o AAL 195 ( $p < 0,05$ ), com redução significativa do efeito máximo ( $p < 0,01$ ), quando comparado ao controle ( $E_{m\acute{a}x} = 79,11 \pm 5,45 \%$  e  $pD_2 = -6,61 \pm 0,07 M$ ) (Gráfico 7).

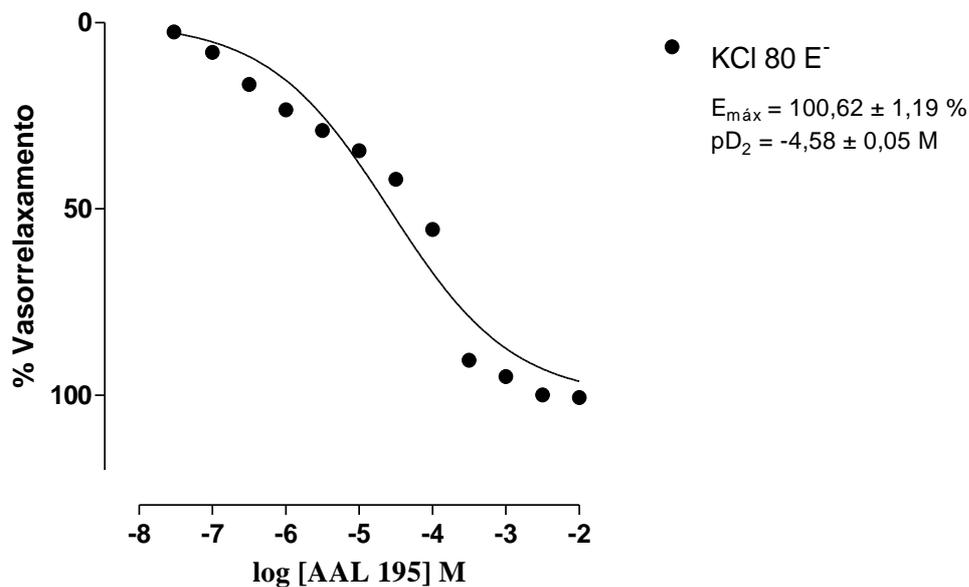
**Gráfico 7** – Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio (o) e após o bloqueio com TEA (1mM) (●), pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M). Valores expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs FEN  $E^-$ .



## 6.6 Efeito do AAL 195 sobre as Contrações Induzidas por KCl 80 mM em Anéis de Artéria Mesentérica Superior de Ratos.

Em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução Tyrode despolarizante com KCl a 80 mM, AAL 195 ( $3 \times 10^{-8} - 10^{-2}$  M) foi capaz de promover efeito vasorrelaxante, de maneira dependente de concentração ( $E_{m\acute{a}x} = 100,62 \pm 1,19$  % e  $pD_2 = -4,58 \pm 0,05$  M) (Gráfico 8). Além disso, observa-se em anéis sem endotélio, após pré-contração com FEN ou KCl 80 mM, uma redução significativa da potência nos anéis pré-contraídos com KCl 80 mM ( $p < 0,001$ ), quando comparados aos pré-contraídos com FEN, sem alteração no efeito máximo (Tabela 4).

**Gráfico 8** – Curva concentração-resposta para AAL 195 ( $3 \times 10^{-8}$ - $10^{-2}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar sem endotélio (●), pré-contraídos com KCl 80 mM. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos.



**Tabela 3** – Comparação dos valores de  $E_{m\acute{a}x}$  e  $pD_2$  de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional.

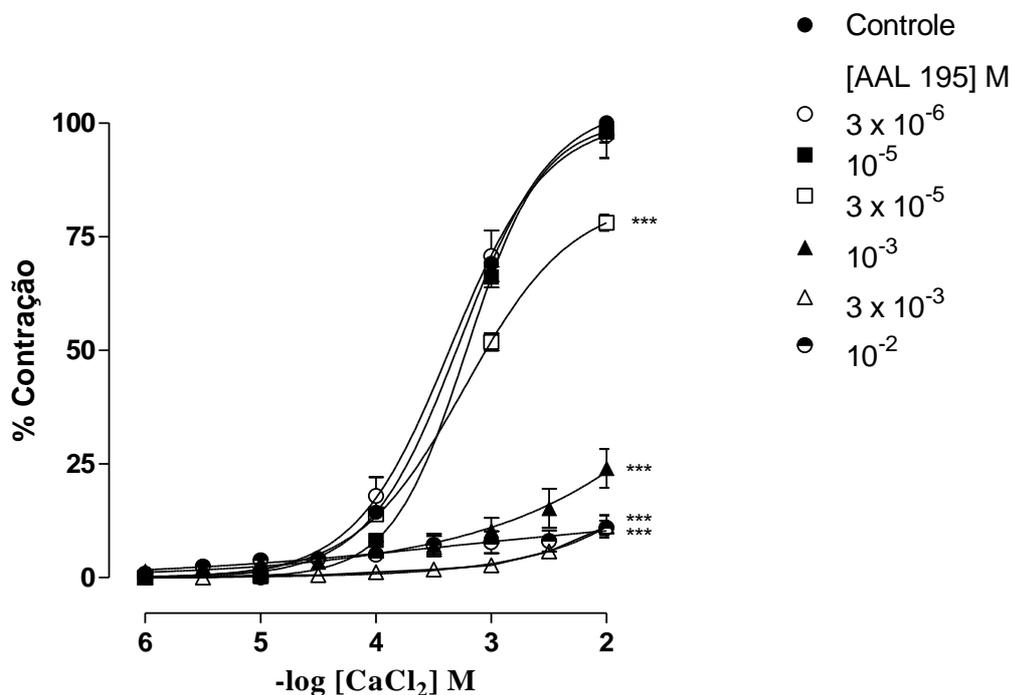
Condições Experimentais	$E_{m\acute{a}x}$ (% relaxamento)	$pD_2$ (M)	n
FEN (10 $\mu$ M)	$98,63 \pm 1,47$	$-6,39 \pm 0,03$	7
KCl 80 mM	$100,62 \pm 1,19$	$-4,58 \pm 0,05^a$	7

Os valores estão expressos com média  $\pm$  e.p.m. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  vs FEN E<sup>-</sup>.

## 6.7 Efeito do AAL 195 sobre o Influxo de $\text{Ca}^{2+}$ em Anéis de Artéria Mesentérica Superior de Ratos.

A administração cumulativa de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$  –  $10^{-2}$  M) promoveu contração, dependente de concentração, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-incubados com solução despolarizante de KCl a 60 mM e nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  (curva controle). Após a incubação com AAL 195 ( $3 \times 10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $3 \times 10^{-5}$ ;  $10^{-3}$ ;  $3 \times 10^{-3}$ ;  $10^{-2}$  M, separadamente) a curva concentração-resposta para o  $\text{CaCl}_2$  foi significativamente atenuada ( $p < 0,001$ ) a partir da concentração de  $3 \times 10^{-5}$  ( $E_{\text{máx}} = 97,28 \pm 5,02$ ;  $98,04 \pm 2,30$ ;  $78,07 \pm 1,77$ ;  $24,01 \pm 1,51$ ;  $11,26 \pm 1,23$  e  $10,95 \pm 0,70$  %, respectivamente,  $n = 7$ ), quando comparada ao controle ( $E_{\text{máx}} = 100,0 \pm 0,0$  %) (Gráfico 9).

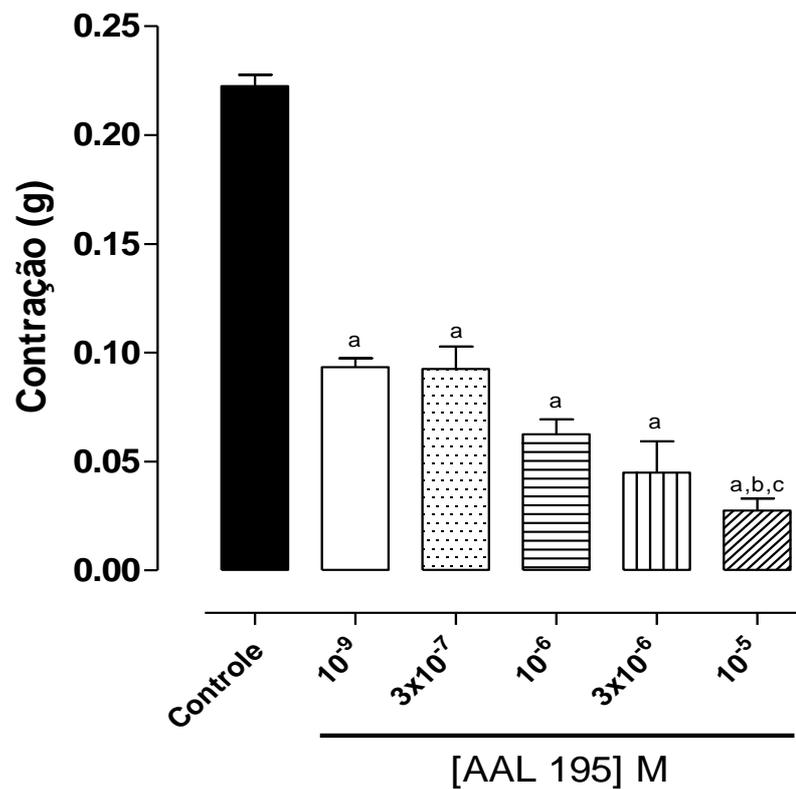
**Gráfico 9** – Curva concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$ - $10^{-2}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar sem endotélio (●), pré-incubadas com [AAL 195] M,  $n = 7$ . ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni.  $p < 0,001$  vs Controle



### 6.8 Efeito do AAL 195 sobre a Mobilização de $\text{Ca}^{2+}$ pelos Receptores de $\text{IP}_3$ dos Estoques Intracelulares

A pré-incubação com AAL 195 ( $10^{-9}$ ;  $3 \times 10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $3 \times 10^{-6}$ ;  $10^{-5}$  M) em meio livre de cálcio atenuou, de maneira significativa ( $p < 0,001$ ), as contrações transientes induzidas por  $10 \mu\text{M}$  de FEN. Além disso, o efeito promovido pela concentração de  $10^{-5}$  M foi significativamente menor ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao efeito promovido pelas concentrações de  $10^{-9}$  e  $3 \times 10^{-7}$  M (Gráfico 10).

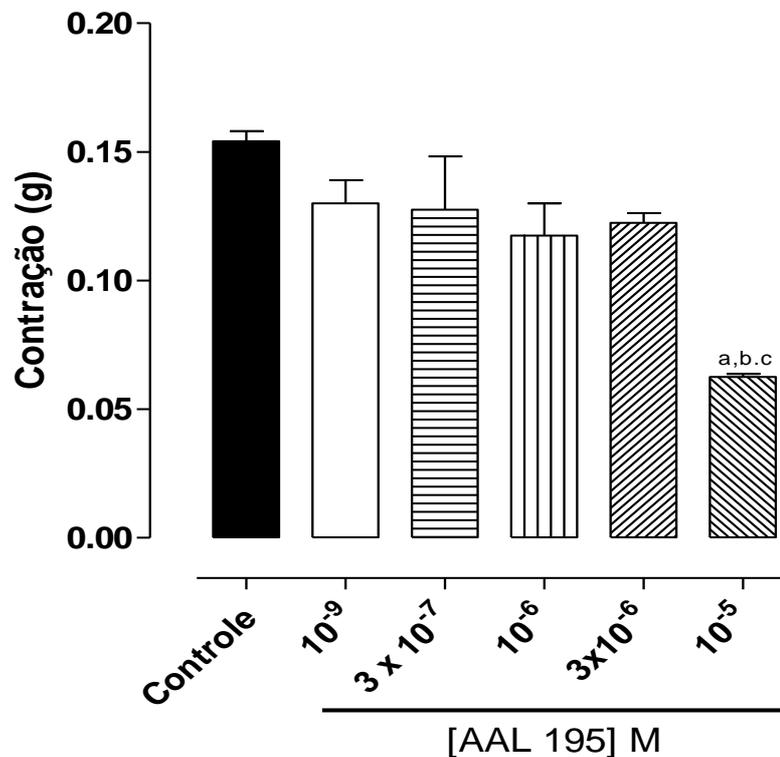
**Gráfico 10** – Efeito de AAL 195 na contração (g) induzida por FEN, em anéis de artéria mesentérica exposta a solução livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , sem endotélio funcional ( $n=4$ ). ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  vs Controle; <sup>b</sup>  $p < 0,01$  vs  $10^{-9}$  M; <sup>c</sup>  $p < 0,01$  vs  $3 \times 10^{-7}$  M.



### 6.9 Efeito do AAL 195 sobre a Mobilização de $\text{Ca}^{2+}$ pelos Receptores de Rianodina dos Estoques Intracelulares.

Em meio livre de cálcio, apenas a concentração de  $10^{-5}$  M do AAL 195 foi capaz de atenuar de maneira significativa ( $p < 0,001$ ) as contrações induzidas por 20 mM de cafeína. O efeito promovido por esta concentração também foi menor significativamente quando comparado aos efeitos das concentrações de  $10^{-9}$  e  $3 \times 10^{-7}$  M ( $p < 0,01$ ) e das concentrações de  $10^{-6}$  e  $3 \times 10^{-6}$  M ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 11).

**Gráfico 11** – Efeito de AAL 195 na contração (g) induzida por cafeína, em anéis de artéria mesentérica exposta a solução livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , sem endotélio funcional (n= 4). ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  vs Controle; <sup>b</sup>  $p < 0,01$  vs  $10^{-9}$  M ou  $3 \times 10^{-7}$  M <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs  $10^{-6}$ .



## 7 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito vasorrelaxante de um inibidor de fosfodiesterase 4, AAL 195, em artéria mesentérica superior de ratos, bem como tentar elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito.

O principal achado desse trabalho foi o efeito vasorrelaxante de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. Esse efeito mostrou-se independente de endotélio vascular e parece envolver a ativação de canais para  $K^+$ , bem como a redução do  $Ca^{2+}$  intracelular via inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  e inibição da mobilização de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares.

As fosfodiesterases desempenham um papel crucial na manutenção do tônus do músculo liso vascular, por participar da regulação dos nucleotídeos cíclicos intracelulares. Das onze famílias de PDE já identificadas atualmente, quatro são encontradas no músculo liso vascular de mamíferos, dentre elas, a PDE4 (BOSWELL-SMITH; SPINA; PAGE, 2006; MAURICE et al, 2014; WALDKIRCH et al, 2010). A PDE4, inclusive, tem despertado cada vez mais o interesse de estudos por ser considerada um potencial alvo de fármacos em diversas patologias, incluindo as doenças cardiovasculares (KLUSSMANN, 2016).

Diversos estudos demonstraram inibidores de PDEs capazes de promover o relaxamento do MLV. Tanaka e colaboradores (1988) estudaram os efeitos do cilostazol, um inibidor de PDE3, em artéria mesentérica de coelho e observaram um efeito vasorrelaxante devido à inibição da hidrólise de AMPc. Posteriormente, o cilostazol demonstrou efeito vasorrelaxante em aorta torácica de ratos (NAKAMURA et al, 2001). Em 1991, um estudo caracterizou os efeitos de inibidores específicos da PDE4 em aorta de rato e constatou que os mesmos promoviam efeito relaxante do músculo liso vascular (KOMAS; LUGNIER; STOCLET, 1991). Hesperetina, hesperidina e narigenina, flavonoides isolados de frutos cítricos, promoveram atividade vasodilatadora em anéis aórticos de ratos, mediada pela inibição de algumas famílias de PDE, dentre elas, a PDE4 (ORALLO et al, 2004; ORALLO et al., 2005). LASSBio-985, um novo composto de sulfonamida, apresentou atividade vasodilatadora e anti-hipertensiva mediada pela inibição de PDEs (PONTES et al, 2012).

Inibidores de PDE têm sido úteis terapeuticamente para o tratamento de patologias que envolvem o relaxamento do MLV, como hipertensão arterial

sistêmica, hipertensão pulmonar e disfunção erétil (PONTES et al, 2012). Com base nessas evidências, entendeu-se a importância de investigar o efeito induzido por AAL 195 na musculatura lisa vascular.

O tônus vascular é considerado o maior regulador da resistência periférica e da pressão arterial (KHALIL, 2001). Ainda que todos os vasos promovam resistência ao fluxo sanguíneo, são as pequenas artérias e arteríolas que controlam o fluxo e a pressão sanguínea (SIEGEL, 1996). Portanto, a artéria mesentérica superior, por ser um vaso de resistência, é um ótimo modelo experimental para o estudo de substâncias que promovem vasodilatação.

Neste sentido, decidiu-se avaliar o efeito vasorrelaxante de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior de ratos, pré-contraídos com fenilefrina. A FEN é um agonista seletivo dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (DINIZ-FILHO et al, 2007). Estes receptores estão acoplados à proteína  $G_{q/11}$ . Após ativação desses receptores, a subunidade  $\alpha$  da proteína  $G_{q/11}$  ativa a PLC, que por sua vez, catalisa a hidrólise do  $PIP_2$  em  $IP_3$  e DAG. O  $IP_3$  promove a liberação do  $Ca^{2+}$  do RS, aumentando os níveis desse íon no meio intracelular, enquanto o DAG, juntamente com o  $Ca^{2+}$ , ativa a PKC, o que promove a fosforilação de enzimas envolvidas no processo de contração. Todas essas ações resultam na contração muscular e na manutenção desta contração (MORGADO et al, 2012; THORNEOLE; NELSON, 2005). Com o objetivo de avaliar se AAL 195 é capaz de induzir vasorrelaxamento após contração induzida por FEN, obteve-se uma curva concentração-resposta para o AAL 195 durante a fase tônica da contração de anéis mesentéricos pré-contraídos com FEN e observou-se que o composto foi capaz de promover efeito vasorrelaxante, de maneira dependente de concentração (Gráfico 1).

O relaxamento da musculatura lisa vascular pode ocorrer através de substâncias que atuam diretamente no músculo ou indiretamente, ao estimular a liberação de fatores do endotélio vascular (GURNEY, 1994). O endotélio desempenha um importante papel na regulação e manutenção da homeostase dos vasos, principalmente no que se refere ao controle do tônus vascular. Nele são sintetizados e liberados diversos fatores vasoconstrictores e fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs) que agem diretamente no MLV. Dentre os FRDEs estão o óxido nítrico, as prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) (BUSSE et al., 2002; STANKEVICIUS et al, 2003).

Para avaliar se o endotélio estaria envolvido no vasorrelaxamento induzido pelo AAL 195, foi obtida uma nova curva concentração-resposta para esse composto em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional. Após remoção mecânica do endotélio, o efeito vasorrelaxante não foi alterado significativamente (Gráfico 1), o que indica que o endotélio não está participando do efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 e que, provavelmente, o efeito desse composto é direto sobre o MLV. Em decorrência desse resultado, resolveu-se investigar o mecanismo de ação independente do endotélio vascular no qual AAL 195 poderia induzir vasorrelaxamento.

Para certificar-se que o vasorrelaxamento induzido por AAL 195 não estaria relacionado a um possível dano tecidual, após a obtenção da curva concentração-resposta para o composto foram realizadas sucessivas lavagens para a remoção do AAL 195 das cubas e uma nova contração com FEN foi induzida. Em seguida, observou-se que houve uma total reversão da contração induzida pela FEN, sugerindo que AAL 195 não promoveu dano à maquinaria contrátil do MLV (Gráfico 2).

Os canais para  $K^+$  estão intrinsicamente envolvidos nas alterações que envolvem a contratilidade do MLV e o potencial de membrana, bem como na regulação da pressão sanguínea (JACKSON, 2000; LEDOUX et al., 2006). Fisiologicamente, a concentração intracelular de  $K^+$  é elevada em relação ao meio extracelular, portanto a abertura de canais para  $K^+$  permite o efluxo desse íon, induzindo uma alteração no potencial de membrana para valores mais negativos, o que torna a célula hiperpolarizada e como consequência, o relaxamento do MLV (THORNELOE; NELSON, 2005). Em contrapartida, a diminuição da expressão ou inibição da atividade desses canais promove diminuição do efluxo de  $K^+$ , resultando na elevação e despolarização do potencial de repouso celular (HAYABUCHI, 2017).

Devido à importância que os canais para  $K^+$  tem na regulação do tônus vascular, decidiu-se investigar a participação destes canais no efeito vasorrelaxante promovido por AAL 195. Para isso, os anéis de artéria mesentérica foram incubados com a solução Tyrode com KCl a 20 mM. O aumento na concentração de KCl de 4 para 20 mM promove o bloqueio parcial do efluxo de  $K^+$  por deslocar o potencial de equilíbrio do  $K^+$  para valores mais próximos do potencial de repouso da membrana e, desta forma, atenua relaxamentos mediados pela abertura de canais para  $K^+$  (CAMPBELL et al., 1996; CLARK; FUCHS, 1997). Nestas condições experimentais,

o bloqueio parcial com KCl 20 mM atenuou o efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 (Gráfico 3), sugerindo o envolvimento de canais para  $K^+$  nesse efeito.

Para confirmar a participação dos canais para  $K^+$ , foi realizada uma curva concentração resposta para o AAL 195, na presença de 5 mM de TEA. Em altas concentrações, o TEA promove o bloqueio, de maneira não seletiva, de canais para  $K^+$  (LO et al, 2008). Sob estas condições, observou-se uma atenuação significativa do efeito máximo (Gráfico 4), o que confirma que parte do efeito promovido por AAL 195 se dá pela ativação de canais para  $K^+$ . Estes resultados corroboram com o achado de Lo e colaboradores (2005), onde em aorta de rato um inibidor de PDE derivado da teofilina promoveu vasorrelaxamento, dentre outros mecanismos, através da ativação de canais para  $K^+$ .

No MLV são expressas diferentes classes de canais para  $K^+$ , dentre elas estão os  $K_{ATP}$ , os  $K_v$  e os  $BK_{Ca}$  (KO et al, 2008). Os  $K_{ATP}$  tem como principal característica a redução do efluxo de  $K^+$  na presença de uma alta concentração intracelular de ATP. Diversos estudos mostram que agonistas destes canais promovem a dilatação de arteríolas, isto fornece a evidência de que canais  $K_{ATP}$  estão presentes nas células do músculo arteriolar (FOSTER; COETZEE, 2016). O fármaco glibenclamida é um bloqueador seletivo para esse tipo de canal (KO et al, 2008). Os canais  $K_v$  constituem uma classe expressa de forma ubíqua nas células do MLV. Esses canais são ativados pela despolarização da membrana celular. Substâncias vasodilatadoras que atuam pela via de sinalização do AMPc podem promover a abertura destes canais (JACKSON, 2000). Inclusive, um estudo recente demonstrou a ativação de algumas subclasses de  $K_v$  por uma metilxantina (um inibidor não seletivo de PDE), como sendo capaz de promover a elevação das correntes de  $K^+$  (MANI et al, 2016). Os  $K_v$  são inibidos pela 4-aminopiridina (THORNELOE; NELSON, 2005). Já os  $BK_{Ca}$  são canais ativados pelo cálcio e por voltagem. Eles são expressos nas células do MLV, modulando o tônus vascular e o relaxamento dessa musculatura (CLEMENTS; TEREITYEV; SELLKE, 2015). Os bloqueadores seletivos para os  $BK_{Ca}$  são a iberiotoxina, a caribdotoxina e o TEA. Este último bloqueador promove a inibição dos  $BK_{Ca}$  com a concentração de aproximadamente 1 mM (KO et al, 2008).

As três classes de canais para  $K^+$  mencionadas acima podem ser ativadas pela PKA, enquanto que a PKG ativa apenas os  $BK_{Ca}$  e os  $K_{ATP}$  (LO et al, 2008). Levando em consideração o fato de que a inibição da PDE4 promove, indiretamente,

a ativação da PKA (MORGADO et al, 2012), decidiu-se investigar se os canais para  $K^+$  citados estariam envolvidos no efeito vasorrelaxante de AAL 195. Para isso, os anéis de artéria mesentérica foram pré-incubados com GLIB, para avaliar a participação dos canais  $K_{ATP}$ ; com 4-AP, para avaliar a participação do  $K_v$ ; ou com 1 mM de TEA, para avaliar a participação dos  $BK_{Ca}$  e, após pré-contracção com FEN, uma nova curva-concentração resposta para AAL 195 foi obtida. Nestas condições experimentais, observou-se a redução significativa do efeito máximo após os bloqueios com 4-AP e TEA (Gráficos 6 e 7), no entanto, todos os bloqueadores foram capazes de promover uma redução significativa da potência farmacológica, quando comparados à curva controle (Gráficos 5, 6 e 7). Portanto, os canais  $K_{ATP}$ , canais  $K_v$  e canais  $BK_{Ca}$  parecem estar envolvidos no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195.

A contracção do MLV está intimamente relacionada à elevação da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  (WEBB, 2003) decorrente de diferentes mecanismos (THORNELOE; NELSON, 2005). A contracção desencadeada após a interação de agonistas específicos com um determinado receptor, como é o caso da FEN, é denominado acoplamento farmacomecânico, onde o aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular ocorre através dos ROCs. Em contrapartida, a contracção iniciada pelo aumento do cálcio promovido pelos VOCs, por depender da despolarização do potencial de repouso da membrana, é conhecida por acoplamento eletromecânico (SOMLYO; SOMLYO, 1968).

Nesse sentido, para avaliar a resposta de AAL 195 frente às concentrações mediadas por diferentes estímulos, realizou-se uma curva concentração-resposta sobre pré-contracção com a solução despolarizante de KCl 80 mM. Isso porque o aumento na concentração de 4 mM de  $K^+$  para 80 mM promove a despolarização da membrana plasmática, gerando a ativação dos VOCs, e conseqüentemente, promovendo a contracção (REMBOLD, 1996). Desta forma, observou-se que AAL 195 foi capaz de promover vasorrelaxamento em anéis mesentéricos sem endotélio funcional, pré-contráidos com KCl a 80 mM (gráfico 8). Com isso é possível perceber a inespecificidade do efeito vasorrelaxante dessa substância, visto que há relaxamento tanto em contracções induzidas pelo acoplamento farmacomecânico (FEN), como pelo acoplamento eletromecânico (KCl 80 mM). Esses resultados também sugerem a participação de canais para  $Ca^{2+}$  nesse efeito. Possivelmente

AAL 195 promova a diminuição do influxo desse íon, pois em ambas as situações, o resultado do acoplamento é a elevação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Para comprovar a hipótese de que AAL 195 estaria reduzindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela membrana celular, seu efeito foi avaliado frente a curvas concentração-resposta ao  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$ . Nestas condições, a contração é quase que exclusivamente devido ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos VOCs que foram ativados pela elevação do  $\text{K}^+$  externo. Diante disto, concentrações de AAL 195 foram capazes de inibir as curvas cumulativas ao  $\text{CaCl}_2$ . Isso sugere que AAL 195 está interferindo no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos VOCs em artéria mesentérica de rato. Esse achado corrobora com o efeito vasorrelaxante de dois alcaloides isolados da planta *Peganum harmala* em aorta de rato em que ambos promoveram seus efeitos através da inibição de PDEs e bloqueio dos VOCs (BERROUGUE et al, 2006).

Ao comparar os parâmetros farmacológicos obtidos com AAL 195 nos anéis pré-contraídos com FEN ou com KCl 80 mM, observa-se que não houve alteração quanto a eficácia de ambos os agentes contracturantes, entretanto AAL 195 se mostrou mais potente nos anéis pré-contraídos com FEN (Tabela 4), o que indica uma maior capacidade de relaxamento desse composto em contrações induzidas por esse agonista.

Como mencionado anteriormente, a FEN, ao interagir com os receptores de membrana acoplados à proteína  $\text{G}_{q/11}$ , estimula a formação de  $\text{IP}_3$ . Este se liga ao seu receptor na membrana no RS, o  $\text{IP}_3\text{R}$ , ocasionando a abertura desse canal e consequente liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares. Esse processo desencadeia uma contração fásica no vaso (GURNEY; ALLAM, 1995; HU, 2001). Diante dessa informação, questionou-se a participação dos  $\text{IP}_3\text{Rs}$  no efeito vasorrelaxante de AAL 195.

Para avaliar o envolvimento dos  $\text{IP}_3\text{Rs}$  nesse efeito, foram pré-incubadas várias concentrações de AAL 195, em meio livre de cálcio. Na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular são observadas apenas as contrações transientes, provenientes dos estoques intracelulares, visto que o influxo de cálcio é requerido para a manutenção da fase tônica da contração do MLV (WANG et al, 2002).

As contrações transientes induzidas por FEN foram atenuadas de maneira significativa após a pré-incubação com AAL 195 (Gráfico 10). Esses dados indicam que o efeito vasodilatador de AAL 195 envolve a inibição dos  $\text{IP}_3\text{Rs}$ . Esses

resultados corroboram com os achados de Bai e Sanderson (2006), que, ao investigar o aumento de AMPc em células do músculo liso pulmonar, constataram um efeito relaxante devido a redução da frequência de oscilação de  $\text{Ca}^{2+}$  por redução da liberação desse íon dos estoques intracelulares, através de receptores de  $\text{IP}_3$ .

Já é bem descrito na literatura que os  $\text{IP}_3$ Rs também podem liberar  $\text{Ca}^{2+}$  induzido pelo  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do influxo destes pelos VOCs. De maneira similar, os RyRs também podem ser ativados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (ORALLO, 1996; PROLE; TAYLOR, 2016), promovendo uma contração transitória no MLV (SANDERSON, 2008). Neste sentido, decidiu-se avaliar a participação dos RyRs no efeito vasorrelaxante de AAL 195.

Considerando que a aplicação exógena da cafeína também é capaz de ativar os RyRs (SEI; GALLAGHER; DALY, 2001), AAL 195 foi pré-incubado, em meio livre de cálcio, e apenas a concentração de  $10^{-5}$  M foi capaz de atenuar de maneira significativa as contrações transientes induzidas pela cafeína (gráfico 11). Esse resultado sugere que em altas concentrações de AAL 195, parte do efeito promovido por esse composto pode ser devido à inibição dos receptores de rianodina.

Os resultados obtidos com AAL 195 após as contrações transientes de FEN ou da cafeína corroboram com o trabalho de FUJIMOTO e colaboradores (1998) em que a olprinona, um inibidor de PDE3, promoveu efeito vasorrelaxante em leitos mesentéricos de coelhos através da inibição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares. Além disso, Cuññas e colaboradores (2013) realizaram estudos em aorta de rato sem endotélio funcional e comprovaram que o vasorrelaxamento por AMPc é mediado, em parte, por depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares e pela inibição da entrada capacitiva de cálcio. Ademais, esse estudo ainda demonstrou que a inibição da PDE4 potencializa o efeito vasodilatador por agentes que elevam o AMPc intracelular.

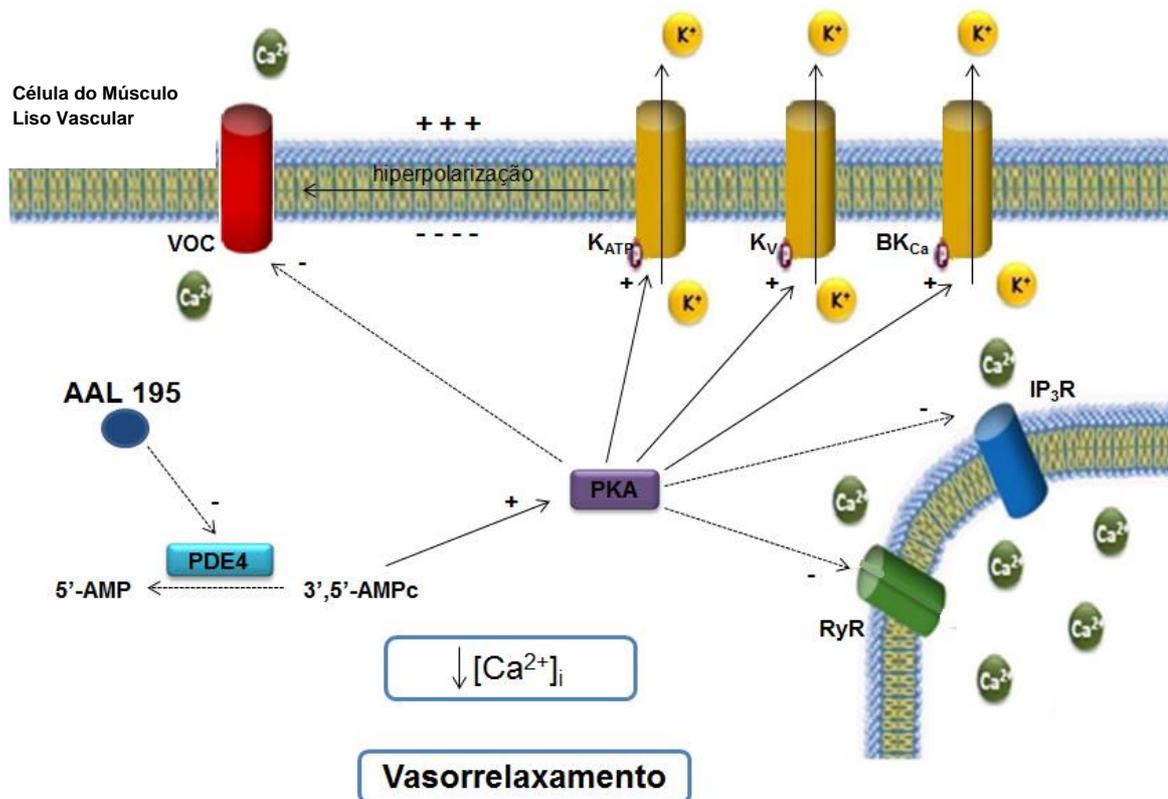
A inibição da PDE 4 promove o relaxamento da musculatura lisa através da elevação dos níveis de AMPc intracelular (LUGNIER, 2006). A concentração aumentada de AMPc, por sua vez, ativa a PKA para desempenhar suas funções celulares (MORGADO et al, 2012).

No MLV a ativação da PKA promove efeito vasorrelaxante através de mecanismos, como: redução do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular através de canais iônicos; diminuição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares; redução

da sensibilidade dos filamentos contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e ativação de canais para  $\text{K}^+$  (CUÍÑAS et al, 2013; MORGADO et al, 2012). Portanto, os resultados até aqui demonstrados por AAL 195 confirmam que seu efeito vasorrelaxante envolve os mecanismos mediados pelo aumento do AMPc intracelular, consequência da inibição da PDE4.

A figura abaixo corresponde à representação esquemática do mecanismo de ação até aqui apresentado pelo AAL 195, em artéria mesentérica superior de ratos Wistar (Figura 14).

**Figura 13** – Representação esquemática da provável via de sinalização do efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em artéria mesentérica superior de ratos Wistar.



AAL 195 inibe a PDE4, promovendo o aumento dos níveis de AMPc intracelular. O AMPc ativa a PKA, que por sua vez promove a diminuição dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  através da redução do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos VOCs, inibição da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e ativação de canais para  $\text{K}^+$  (Fonte: AUTOR, 2017)

## 8 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que AAL 195 promove efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica superior de rato. Esse efeito mostrou-se inespecífico e independente de endotélio vascular. Além disso, esse efeito parece envolver a ativação de canais para  $K^+$ , a inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática, bem como a inibição da mobilização do  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, principalmente pelos receptores de  $IP_3$ .

A partir dos resultados demonstrados neste trabalho, observa-se que AAL 195 caracteriza uma molécula promissora para novos estudos farmacológicos a fim de melhor elucidar o seu mecanismo vasorrelaxante, bem como investigar seu potencial em tratar patologias relacionadas ao sistema cardiovascular.

## 9 PERSPECTIVAS

- Comparar o efeito de AAL 195 junto à curva padrão de outro inibidor de PDE4 já conhecido;
- Realizar histologia dos anéis de artéria mesentérica superior após tratamento com AAL 195 para avaliar a possível ocorrência de danos no vaso;
- Avaliar o efeito de AAL 195 sobre as correntes iônicas através dos canais para  $K^+$  em células de artéria mesentérica superior de ratos, utilizando a técnica de *patch clamp*;
- Avaliar a participação das Proteínas quinases no efeito de AAL 195 através de *Western Blot*;
- Avaliar o efeito vasorrelaxante de AAL 195 em um modelo animal de hipertensão – ratos espontaneamente hipertensos (SHR);
- Avaliar efeito anti-hipertensivo do AAL 195 em ratos Wistar e SHR.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, F. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase: important signaling modulators and therapeutics targets. **Oral Diseases**, v. 21, n. 1, p. 25-50, 2015.

AKHTAR, W. et al. The therapeutic journey of pyridazinone. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 256-281, 2016.

ALAMGEER, P. et al. Endothelium-independent vasorelaxant effect of a *Berberis orthobotrys* root extract via inhibition of phosphodiesterases in the porcine coronary artery. **Phytomedicine**, v. 23, p. 793-799, 2016.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970.

ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. Structural optimization of 6-aryl pyridazin-3-ones as novel potent PDE4 inhibitors. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 744-751, 2015.

AZEVEDO, L. L.; KÜMMERLE, A. E. Inibidores da PDE4: da descoberta e fracasso anunciado ao seu ressurgimento. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 465-494, 2015.

AZEVEDO, M. F. et al. Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 2, p. 195-233, 2014.

BAI, Y; SANDERSON, M. J. Airway smooth muscle relaxation results from a reduction in the frequency of  $Ca^{2+}$  oscillations induced by a cAMP-mediated inhibition of the IP3 receptor. **Respiratory Research**, v. 7, n. 34, p. 1-20, 2006.

BANOGLU, E. et al. Amine derivatives of [6-(5-Methyl-3-phenylpyrazole-1-yl)-3(2H)-pyridazinone-2-yl]acetic acids as potential analgesic and anti-inflammatory compounds. **Arch der Pharmazie**, v. 337, p. 7-14, 2004.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

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

BARREIRO, E. J.; PINTO, A. C. Oportunidades e desafios para a inovação em fármacos: agora ou nunca! **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 6, p. 1059-1074, 2013.

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

BEAVO, J. A.; REIFSNYDER, D. H. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 11, n. 4, p. 150–5, abr. 1990.

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

BERROUGUE, H. et al. Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from *Peganum harmala* L. seed's in isolated rat aorta. **Pharmacological Research**, v. 54, p. 150-157, 2006.

BERRIDGE, M. J. Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1742, p. 3-7, 2004.

BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signaling. **Journal of Physiology**, v. 499, n. 2, p. 291-306, 1997.

BOBIN, P. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: a therapeutic perspective. **Archives of Cardiovascular Disease**, v. 109, p. 431-443, 2016.

BOSWELL-SMITH, V.; SPINA, D.; PAGE, C. Phosphodiesterase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S252-S257, 2006.

BUSSE, R. et al. EDHF: bringing the concepts together. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 374-380, 2002.

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

CAMPBELL, W. B.; GEBREMEDHIN, D.; PRAIT, P. F.; HERDER, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circulation Research**, v. 78, p. 415-423, 1996.

CHEN, C. H. et al. Effects of pimobendan and its active metabolite, UD-CG 212 Cl, on Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth-muscle cells. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 30, n. 6, p. 739-743, 1997.

CHONG, J.; LEUNG, B.; POOLE, P. Phosphodiesterase 4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, 2013.

CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 131, p. 1047-1058, 2007.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 3, p. 1473–1479, 1997.

CLEMENTS, R. T.; TARENTYEV, D.; SELLKE, F. W. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels as therapeutic targets for myocardial and vascular protection. **Circulation Journal**, v. 79, p. 455-462, 2015.

CONTI, M.; BEAVO, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 481-511, 2007.

CONTI, M. et al. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 370-389, 1995.

CONTI, M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 14, n. 9, p. 1317–27, set. 2000.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: Target of sildenafil. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 20, p. 13729–13732, 1999.

CRIBBS, L. L. T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in vascular smooth muscle: multiple functions. **Cell Calcium**, v. 40, n. 20, p.221-230, 2006.

CUÍÑAS, A. et al. Cyclic AMP relaxation of rat aortic smooth muscle is mediated in part by decrease of depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and inhibition of capacitative calcium entry. **Vascular Pharmacology**, v. 58, n. 1-2, p. 98–104, 2013.

DINIZ-FILHO, A. et al. Efeitos cardiovasculares e midriáticos da fenilefrina tópica a 2,5 e a 10,0% em voluntários saudáveis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 6, p. 961-966, 2007.

DUBEY, S.; BHOSLE, P. A. Pyridazinone: an important element of pharmacophore possessing broad spectrum of activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 10, p. 3379-3598, 2015.

ESKANDARI, N. et al. A short review on structure and role of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase 4 as a treatment tool. **Journal of Research in Pharmacy Practice**, v. 4, p. 175-181, 2015.

FOSTER, M. N.; COETZEE, W. A.  $\text{K}_{\text{ATP}}$  Channels in the cardiovascular system. **Physiology Review**, v. 96, p. 177-252, 2016.

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.

FRANCIS, S. H.; TURKO, I. V.; CORBIN, J. D. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 65, p. 1-52, 2001.

FUJIMOTO, S. et al. Vasorelaxant effect of olprinone, an inhibitor of phosphodiesterase 3, on mesenteric small artery and vein of rabbits. **European Journal of Pharmacology**, v. 353, p. 239-246, 1998.

GARCIA, M. L.; KACZOROWSKI, G. J. High conductance calcium activate potassium channels: molecular pharmacology, purification and regulation. In: Weston, A. H., Hamilton, T. C. **Potassium Channel Modulators**. Blackwell, Oxford, 76-109, 1992.

GIEMBYCZ, M. A. Life after PDE4: overcoming adverse events with dual-specificity phosphodiesterase inhibitors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 238-244, 2005.

GRGIC, I. et al. Endothelial Ca<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in normal and impaired EDHF-dilator responses—relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 4, p. 509-526, 2009.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilatation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242-251, 1994.

GURNEY, A. M.; ALLAM, M. Inhibition of calcium release from the sarcoplasmic reticulum of rabbit aorta by hydralazine. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 238-244, 1995.

HAYABUCHI, Y. The action of smooth muscle cell potassium channels in the pathology of pulmonary arterial hypertension. **Pediatric Cardiology**, v. 38, p. 1-14, 2017.

HIRANO, K. et al. Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 248, p. 105-114, 2003.

HIRANO, K.; HIRANO, M.; KANAIDE, H. Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in vascular smooth muscle. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 40, n. 6, p. 219-236, 2004.

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, p. 950-966, 2007.

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.

HU, C. M. et al. Mechanisms underlying the induction of vasorelaxation in rat thoracic aorta by sanguinarine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, p. 47-53, 2001.

HUANG, Y.; KWOK, K. H. Effects of putative K<sup>+</sup> channel blockers on beta-adrenoceptor-mediated vasorelaxation of rat mesenteric artery. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 515-519, 1997.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, parte 2, p. 173-178, 2000.

JOHNSON, J. D.; SNYDER, C. H. Calcium regulation of smooth muscle contractile proteins. **Advances in Second Messenger Phosphoprotein Research**. Philadelphia, v. 30, p. 153-174, 1995.

JULIFS, D. M., et al. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 135, p. 67-104, 1999.

KATZ, A. M. Calcium channel diversity in the cardiovascular system. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 28, p. 522-529, 1996.

KE, H. Implications of PDE4 structure on inhibitor selectivity across PDE families. **International journal of impotence research**, v. 16 Suppl 1, p. S24-S27, 2004.

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, p. 1288-1305, 2012.

KHALIL, R. A. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction in hypertension. **High Blood Pressure Council Newsletter**, v. 2, n. 1, Spring, 2001.

KLUSSMANN, E. Protein-protein interactions off PDE4 family members – functions, interactions and therapeutic value. **Cellular Signalling**, v. 28, p. 713-718, 2016.

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

KO, E. A. et al. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

KO, E. A. et al. Pathophysiology of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells: Modulation by protein kinases. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 103, p. 95–101, 2010.

KOMAS, N.; LUGNIER, C.; STOCLET, J. Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, p. 495-503, 1991.

KUKOVETZ, W. R.; PÖCH, G. Inhibition of cyclic-3',5'-nucleotide-phosphodiesterase as a possible mode of action of papaverine and similarly acting drugs. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 267, p. 189-194, 1970.

KRIER, M. et al. Design of small-sized libraries by combinatorial assembly of linkers and functional groups to a given scaffold: Application to the structure-based optimization of a phosphodiesterase 4 inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 3816–3822, 2005.

LEDOUX, J. et al. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 69-78, 2006.

LEE, J. S. et al. Efficacy and safety of roflumilast in Korean patients with COPD. **Yonsei Medical Journal**, v. 57, n. 4, p. 928-935, 2016.

LEE, L. C. Y.; MAURICE, D. H.; BAILLIE, G. S. Targeting protein-protein interactions within the cyclic AMP signaling system as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 451-464, 2013.

LI, Q. et al. Pharmacokinetics of roflumilast and its active metabolite roflumilast-n-oxide in healthy Chinese subjects after single and multiple oral doses. **Europe Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, p. 1-11, 2016

LIPWORTH, B. J. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**. v. 365, p. 167-175, 2005.

LO, Y. et al. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxation by a theophylline derivative MCPT: roles of cyclic nucleotides, potassium channel opening and phosphodiesterase inhibition. **Life Sciences**, v. 76, p. 931-944, 2005.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacology and**

**Therapeutics**, v. 109, n. 3, p. 366–398, 2006.

LUGNIER, C. PDE inhibitors: a new approach to treat metabolic syndrome? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, p. 698-706, 2011.

MACHADO, N. T. **Efeitos cardiovasculares de um novo doador de óxido nítrico, 12-nitrato-*cis*-9-octadecanoato de etila (NCOE), em ratos**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2013.

MANI, B. K. et al. K<sub>v</sub>7.5 potassium channel subunits are the primary targets for PKA-dependent enhancement of vascular smooth muscle K<sub>v</sub>7 currents. **Molecular Pharmacology**, v. 89, p. 323-334, 2016.

MAURICE, D. H. et al. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, p. 290-314, 2014.

MCFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British journal of pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 1–13, 2002.

McHALE, N. et al. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 570, p. 23-28, 2006.

MOCHIDA, H. et al. Sildenafil and T-1032, phosphodiesterase type 5 inhibitors, showed a different vasorelaxant property in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 440, p. 45-52, 2002.

MOMBOULI, J.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 252-256, 1997.

MORGADO, M. et al. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 247-266, 2012.

MUNZEL, T. et al. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by cyclic guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. **Circulation**, v. 108, p. 2172-2183, 2003.

MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n. 1, p. 1-5, 1986.

NAKAMURA, T. et al. Endothelium-dependent relaxation by cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 69, p. 1709-1715, 2001.

NELSON, M. T. et al. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K<sup>+</sup> channels. **Nature**, v. 344, p. 770-773, 1990.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American Journal of Physiology*. v. 268, p. C799–C822, 1995.

NEWTON, R. P.; SMITH, C. J. Cyclic nucleotides. **Phytochemistry**, v. 65, n. 17, p. 2423–2437, 2004.

OGUT, O.; BROZOVICH, F. V. Regulation of force in vascular smooth muscle. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, n. 4, p. 347–355, 2003.

OKABE, K.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 409, p. 561-568, 1987.

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

ORALLO, F. et al. Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 370, n. 6, p. 452-463, 2004.

ORALLO, F. et al. Implication of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition in the vasorelaxant activity of the citrus-fruits flavonoid (+/-)-naringenin. **Planta medica**, v. 71, n. 2, p. 99–107, fev. 2005.

ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, p. 153-171, 1996.

OTERO, C. et al. Temporal and spatial regulation of cAMP signaling in disease: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, p. 593-607, 2014.

PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Mecanismos de contração do músculo liso vascular. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005.

PERRY, M. J.; HIGGS, G. A. Chemotherapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors. **Current opinion in chemical biology**, v. 2, n. 4, p. 472–81, 1998.

PONTES, L. B. et al. Vasodilatory activity and antihypertensive profile mediated by inhibition of phosphodiesterase type 1 induced by a novel sulfonamide compound. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 26, p. 690-700, 2012.

PROLE, D. L.; TAYLOR, C. W. Inositol 1,4,5-triphosphate receptors and their protein partners as signalling hubs. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 11, p. 2849-2866, 2016.

RAHIMI, R. et al. A review of the herbal phosphodiesterase inhibitors; Future perspective of new drugs. **Cytokine**, v. 49, n. 2, p. 123–129, 2010.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BARANY, M. **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. Academic Press, p. 227-237, 1996.

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

RYBALKIN, S. D. et al. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. **Circulation Research**, v. 93, p. 280-291, 2003.

ROGLIANI, P. e al. Drug safety evaluation of roflumilast for the treatment of COPD: a meta-analysis. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 20, p. 1-14, 2016

RUTH, P. Cyclic GMP-dependent protein kinases understanding in vivo functions by gene targeting. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, n. 2-3, p. 355–372, 1999.

SAH, P.; FABER, E. S. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 345-353, 2002.

SANDERSON, M. J. et al. Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca<sup>2+</sup> signaling and sensitivity. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 5, n. 1, p. 23–31, 2008.

SEI, Y., GALLAGHER, K. L.; DALY, J. W. Multiple effects of caffeine on Ca<sup>2+</sup> release and influx in human B lymphocytes. **Cell Calcium**, v. 29, n. 3, p. 149-160, 2001.

SIEGEL, G. **Comprehensive Human Physiology**, v. 2. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

SOMLYO, A. V; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 159, n. 1, p. 129–45, jan. 1968.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231–6, 17 nov. 1994.

SONKUSARE, S. et al. Vascular calcium channel and high pressure: Pathophysiology and therapeutic implications. **Vascular Pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 131-142, 2006.

STANKEVICIUS, E. et al Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina**, v. 39, n. 4, p. 333-341, 2003.

TANAKA, T. et al. Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. **Pharmacology**. v. 36, n. 5, p. 313-320, 1988.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; SHIGENOU, K. Significant role neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1602-1608, 1999.

TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 572, p. 617-624, 2006.

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

TSAI, E. J.; KASS, D. A. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, p. 216-238, 2009.

VAN DER MEY, M. et al. Synthesis and structure-activity relationships of cis-tetrahydrophthalazinone/pyridazinone hybrids: a novel series of potent dual PDE3/PDE4 inhibitory agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 2008-2016, 2003.

WALDKIRCH, E. S. et al. Expression of Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Isoforms in Human Cavernous Arteries: Functional Significance and Relation to Phosphodiesterase Type 4. **The Journal of Sexual Medicine** v. 7, p. 2104-2111, 2010.

WANG, G. J. et al. Ca<sup>2+</sup> channel blocking effect of iso-S-petasin in rat aortic smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 445, p. 239-245, 2002.

WATRAS, J. M. Músculo liso. In: KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy: Fisiologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 1-4, p. 201-6, 2003.

WEI, A. D. et al. International union of pharmacology. LII. Nomenclature and molecular Relationships of calcium-activated potassium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 463-472, 2005.

WRAY, S.; BURDYGA, T. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. **Physiological reviews**, v. 90, n. 1, p. 113-178, 2010.

**ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Utilização em Animais da UFAL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

Projeto n. 06/2013

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DO EFEITO VASORRELAXANTE DE AAL 195, UM INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE IV, EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA.

**Responsável:** Êurica Adélia Nogueira Ribeiro

**Objetivo:** Avaliar o efeito relaxante de um inibidor de fosfodiesterase em artéria mesentérica de resistência isolada de ratos Wistar.

**Situação:** APROVADO

Maceió, 16 de agosto de 2013.



Robinson Sabino da Silva

Coordenador da CEUA/UFAL

**Robinson Sabino da Silva**  
Coordenador da CEUA-UFAL  
Comissão de Ética no Uso de Animais