



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

FERNANDA CARLOS NOBREGA

**EFEITO RELAXANTE DO CLORIDRATO DE (2,4-DICLOROFENIL) -2-
(ISOPROPILAMINO) ETANOL, ANÁLOGO DA CLORPRENalina, EM AORTA E
TRAQUEIA ISOLADAS DE RATO**

FORTALEZA

2018

FERNANDA CARLOS NOBREGA

EFEITO RELAXANTE DO CLORIDRATO DE (2,4-DICLOROFENIL) -2-
(ISOPROPILAMINO) ETANOL, ANÁLOGO DA CLORPRENALINA, EM AORTA E
TRAQUEIA ISOLADAS DE RATO

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N675e Nobrega, Fernanda Carlos.
Efeito relaxante do cloridrato de (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino) etanol, análogo da clorprenalina, em aorta e traqueia isoladas de rato / Fernanda Carlos Nobrega. – 2018.
39 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.

1. Clorprenalina. 2. Broncodilatadores. 3. Vasorelaxamento. 4. Adrenoreceptores. I. Título.

CDD 615

FERNANDA CARLOS NOBREGA

EFEITO RELAXANTE DO CLORIDRATO DE (2,4-DICLOROFENIL) -2-
(ISOPROPILAMINO) ETANOL, ANÁLOGO DA CLORPRENalina, EM AORTA E
TRAQUEIA ISOLADAS DE RATO

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

APROVADA EM: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Jacilane Ximenes Mesquita
Faculdade do Vale do Jaguaribe (FVJ)

Dr^ª. Patrícia Andréa da Fonseca Magalhães
Doutora em Ciências Farmacêuticas

À minha avó, Carmélia Menezes da Silva,
minha maior inspiração e exemplo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me proteger e guiar.

Aos meus pais, Fernando e Izanete, por sempre priorizarem minha educação, e por todo cuidado, dedicação e apoio ao longo da minha vida.

As minhas irmãs, Izabelly e Juliana, por estarem sempre presentes, me apoiando e incentivando, obrigada por tudo.

A Marina, minha irmã mais nova de coração, por sempre me ouvir nos momentos estressantes, de muitas provas e trabalhos, e por sempre me encorajar e motivar. Obrigada por toda sua positividade, amizade e apoio ao longo de toda a faculdade.

A minha avó, Carmélia, por sempre me apoiar e encorajar. Minha gratidão por tanto amor, cuidado e dedicação. Sua humildade e bondade me inspiram.

A minha tia Lisete, por sempre estar disposta a me ouvir e ajudar e por ter um papel tão importante na minha vida.

Ao meu primeiro orientador, Dr. Sócrates, por acreditar em mim quando eu estava no primeiro semestre na faculdade. Obrigada por todo conhecimento compartilhado e por tanto me encorajar a estar sempre estudando. Carrego sempre os seus ensinamentos.

Ao professor Rodrigo, por me apresentar ao LAFARMULI. Obrigada pela confiança depositada em mim.

Ao professor Pedro Magalhães, que tenho orgulho de chamar de orientador, por me receber no laboratório e por aceitar me orientar ao longo desses anos. Obrigada por ter se tornado um grande exemplo, não apenas acadêmico, mas pessoal, de honestidade, respeito e dedicação. Ainda me impressiono com tanto conhecimento e humildade em uma pessoa só. Obrigada professor por todo apoio e paciência.

Aos integrantes do LAFARMULI, que tive a oportunidade de conviver: Teresinha, Franzé, Thiago, Helder, Kalinne, Manu, Karine, Daniel, Carlos, Tatyane, Jacilane, Patrícia Magalhães, Patrícia Gonçalves e Gabrieli, obrigada por toda ajuda. Agradeço especialmente a Terezinha, por me ensinar e acompanhar nos primeiros experimentos com a beta, muito obrigada pela paciência e ao Alfredo, pela ajuda fundamental na realização desse trabalho.

Aos amigos que a faculdade me apresentou, em especial Amanda, Tatyane, Gabriela, Mariana, Fábio, Marcos e Felipe, por tornarem tudo mais leve e prazeroso. Por dividirem, literalmente, os trabalhos e sempre estarem nas comemorações. Obrigada por todo o companheirismo e incentivo, mesmo quando as provas pareciam intermináveis.

A banca examinadora, pela disponibilidade, tempo e considerações feitas nesse trabalho.

A Universidade Federal do Ceará e aos professores que tive ao longo do curso, por me proporcionarem uma excelente formação, obrigada por todo o conhecimento compartilhado.

Ao CNPq, pelo incentivo financeiro no fomento à iniciação científica.

RESUMO

O cloridrato de (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol (2CFOH), possui similaridade estrutural à clorprenalina, uma substância com ação broncodilatadora. Em razão disso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a atividade farmacológica do 2CFOH em aorta e traqueia de rato. Segmentos desses tecidos foram adicionados a sistema de banho para órgãos isolados e contrações isométricas foram obtidas e registradas por sistema de aquisição de dados. Em preparações de aorta com endotélio preservado, 2CFOH (1-1000 μ M) induziu relaxamento completo de contração de fenilefrina (1 μ M), com CE_{50} de 19,0 [10,1-35,8] μ M. A remoção do endotélio diminuiu a potência do efeito relaxante ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak). Em aorta contraída com potássio (60mM), 2CFOH (0,01-1000 μ M) induziu relaxamento dependente de concentração, com CE_{50} de 26,0 [7,6–88,2] μ M, sendo completa a reversão da contração. O antagonista β -adrenérgico não-seletivo propranolol (1 μ M) não influenciou significativamente o efeito relaxante do 2CFOH em aorta contraída com Potássio ($p > 0,05$, teste de Holm-Sidak). Por outro lado, propranolol (1 μ M) diminuiu a potência do 2CFOH (1-1000 μ M) em aorta contraída com fenilefrina (1 μ M) ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak), pois a CE_{50} na presença de propranolol foi de 32,7 [20,0-53,4] μ M, enquanto na ausência foi de 19,0 [10,1-35,8] μ M. Em anéis de traqueia contraídos com carbacol (1 μ M), 2CFOH (0,01-300 μ M) induziu relaxamento, com CE_{50} de 17,5 [11,9-25,8] μ M. Propranolol reduziu significativamente o efeito relaxante do 2CFOH em traqueia ($p < 0,05$; teste de Holm-Sidak), CE_{50} de 35,6 [11,6-109,0] μ M. Assim, 2CFOH provoca relaxamento tanto em aorta de rato contraída com fenilefrina e com potássio, quanto em traqueia contraída com carbacol. O endotélio parece influenciar nesse efeito vasorelaxante, sendo observado um efeito mais potente na presença de endotélio. Receptores β -adrenérgicos parecem estar envolvidos no mecanismo relaxante quando traqueia é contraída com carbacol e quando aorta é contraída com fenilefrina, mas não quando a contração em aorta é induzida por potássio.

Palavras-chave: Clorprenalina. Broncodilatadores. Vasorelaxamento, Adrenoreceptores.

ABSTRACT

(2,4-dichlorophenyl)-2-(isopropylamino)ethanol hydrochloride (2CFOH) has structural similarity to chlorprenaline, a substance with bronchodilator action. Therefore, the aim of this work was to characterize the pharmacological activity of 2CFOH in the rat aorta and trachea. Segments of these tissues were added to bath system for isolated organs and isometric contractions were obtained and recorded by data acquisition system. In preserved endothelium aorta preparations, 2CFOH (1-1000 μ M) induced complete relaxation of phenylephrine contraction (1 μ M), with EC_{50} of 19.0 [10.1-35.8] μ M. Removal of the endothelium decreased the potency of the relaxing effect ($p < 0.05$, Holm-Sidak test). In aorta contracted with potassium (60mM), 2CFOH (0.01-1000 μ M) induced concentration-dependent relaxation with EC_{50} of 26.0 [7.6-88.2] μ M, the reversal of the contraction being complete. The non-selective β -adrenergic antagonist propranolol (1 μ M) did not significantly influence the relaxing effect of 2CFOH on the aorta contracted with Potassium ($p > 0.05$, Holm-Sidak test). On the other hand, propranolol (1 μ M) decreased the potency of 2CFOH (1-1000 μ M) in aorta contracted with phenylephrine (1 μ M) ($p < 0.05$, Holm-Sidak test), because EC_{50} in the presence of propranolol was 32,7 [20.0-53.4] μ M, while in the absence it was 19.0 [10.1-35.8] μ M. In tracheal rings contracted with carbachol (1 μ M), 2CFOH (0.01-300 μ M) induced relaxation, with EC_{50} of 17.5 [11.9-25.8] μ M. Propranolol significantly reduced the relaxing effect of 2CFOH in trachea ($p < 0.05$; Holm-Sidak test), EC_{50} of 35.6 [11.6-109.0] μ M. Therefore, 2CFOH causes relaxation in both the rat aorta contracted with phenylephrine and potassium, and in trachea contracted with carbachol. The endothelium seems to influence this vasorelaxative effect, and a more potent effect is observed in the presence of endothelium. β -adrenergic receptors appear to be involved in the relaxing mechanism when trachea is contracted with carbachol and when aorta is contracted with phenylephrine but not when contraction in the aorta is induced by potassium.

Keywords: Chlorprenaline. Bronchodilators. Vasorelaxation, Adrenoreceptors.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Músculo liso	10
1.1.1	<i>Mecanismo Contrátil no Músculo Liso</i>	11
1.1.2	<i>Músculo Liso das Vias Aéreas</i>	12
1.2	Asma	13
1.3	Agonistas Beta-Adrenérgicos	15
1.4	Clorprenalina e (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol (2CFOH)	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Substância de estudo	21
3.2	Soluções e drogas	21
3.3	Animais	21
3.4	Experimentos com anéis de artéria aorta e anéis de traqueia isolada de rato	21
3.5	Protocolos experimentais	23
3.5.1	<i>Avaliação dos efeitos relaxantes do 2CFOH em aorta isolada de rato</i>	23
3.5.2	<i>Avaliação dos efeitos relaxantes do 2CFOH em traqueia isolada de rato</i>	23
3.5.3	<i>Avaliação da influência da remoção do endotélio nos efeitos relaxantes do 2CFOH em aorta isolada de rato</i>	24
3.6	Análise estatística	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Efeito relaxante do 2CFOH em anéis de aorta isolada de rato contraídos com fenilefrina	25
4.2	Influência da remoção do endotélio nos efeitos relaxantes do 2CFOH em anéis de aorta	26
4.3	Efeito relaxante do 2CFOH em preparações de aorta mantidas na presença ou ausência de propranolol, contraídas com Potássio	27
4.4	Efeito relaxante do 2CFOH em preparações de aorta mantidas na presença ou ausência de propranolol, contraídas com Fenilefrina	28
4.5	Efeito relaxante do 2CFOH em preparações de traqueia contraídas com carbacol, mantidas na presença ou ausência de propranolol	29

5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXO	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 Músculo liso

As células musculares lisas são o principal componente dos órgãos ocos, como o canal alimentar, as vias aéreas, a vasculatura e o trato urogenital. A contração do músculo liso altera as dimensões do órgão, o que resulta na propulsão do conteúdo deste ou no aumento da resistência ao fluxo (como na vasoconstrição). O mecanismo básico que fundamenta a contração do músculo liso envolve interação miosina-actina (como no músculo estriado), embora existam algumas diferenças importantes. Especificamente, a contração do músculo liso é regulada pelo filamento grosso e requer alteração da miosina, antes que ela possa interagir com a actina (BERNE; LEVY, 2009).

Essa contração do músculo liso ocorre em resposta a sinais elétricos ou hormonais e esse músculo exibe a capacidade de permanecer contraído por períodos extensos, em níveis baixos de consumo de energia, o que é importante para funções como a manutenção do tônus vascular e, portanto, da pressão sanguínea. A regulação dessa contração é complexa, envolvendo, algumas vezes, múltiplas cascatas de sinalização intracelular (BERNE; LEVY, 2009).

O músculo liso divide-se em unitário e em multiunitário. No unitário, as células musculares lisas são acopladas eletricamente, de modo que a estimulação elétrica de uma célula é seguida pela estimulação das células adjacentes. Isso leva à onda de contração, como na peristalse. Além disso, essa onda de atividade elétrica pode ser iniciada por célula marca-passo (célula muscular lisa que exibe despolarização espontânea). Já no multiunitário, as células musculares lisas não estão acopladas eletricamente, de maneira que a estimulação de uma célula não resulta, necessariamente, na ativação de células adjacentes. Alguns exemplos são o vaso deferente e a íris do olho. Contudo, o músculo liso é bastante diverso, sendo essa classificação bastante simplista, porque a maioria dos músculos lisos é modulada pela combinação de elementos neurais com, pelo menos, algum grau de ligação célula-célula e por ativadores ou inibidores produzidos localmente (BERNE; LEVY, 2009).

Em alguns órgãos, as células musculares lisas contraem-se rítmica, ou intermitentemente, sendo esse tipo de músculo liso denominado fásico, sendo encontrado nas paredes dos tratos gastrointestinal e urogenital. O músculo liso fásico corresponde à categoria de unitário, uma vez que as células musculares lisas contraem-se em resposta a potenciais de ação que se propagam de célula a célula. Já em outros órgãos, como é o caso das vias aéreas,

as células são continuamente ativas e mantêm o nível de seu “tônus”, sendo esse denominado músculo liso tônico (BERNE; LEVY, 2009).

1.1.1 Mecanismo Contrátil no Músculo Liso

O estímulo inicial para a contração do músculo liso é o aumento intracelular dos íons cálcio. Este aumento pode ser causado por estimulação nervosa da fibra muscular lisa, estimulação hormonal, estiramento da fibra ou até mesmo alteração química no ambiente da fibra. O músculo liso contém a proteína reguladora calmodulina, que inicia a contração ativando as pontes cruzadas da miosina. Inicialmente os íons cálcio se ligam à calmodulina. Em seguida o complexo calmodulina-cálcio junta-se à miosina quinase, ativando-a. Deste fenômeno, resulta a fosforilação das cadeias leves da miosina, chamada cadeia reguladora. Assim, a cabeça da miosina adquire a capacidade de se ligar repetidamente com o filamento de actina e de desenvolver os ciclos de trações intermitentes, e, desta forma, provocar a contração muscular (GUYTON; HALL, 2006).

Já quando a concentração de íons cálcio intracelular cai abaixo de um nível crítico, o processo é revertido, exceto pela fosforilação da cabeça da miosina. A desfosforilação é catalisada pela fosfatase da miosina, enzima localizada nos líquidos da célula muscular lisa, que cliva o fosfato da cadeia leve reguladora. Desta forma, o ciclo se interrompe e a contração cessa. O tempo necessário para o relaxamento da contração muscular é determinado em grande parte pela quantidade de fosfatase de miosina ativa na célula (GUYTON; HALL, 2006).

Alguns receptores hormonais na membrana do músculo liso abrem canais para íons sódio e cálcio e despolarizam a membrana, como ocorre após uma estimulação nervosa. Algumas vezes, o resultado é um potencial de ação, ou a amplificação de potenciais de ação que já estão ocorrendo. Em outros casos, a despolarização ocorre sem potenciais de ação, e esta despolarização permite que íons cálcio entrem na célula, promovendo a contração. A inibição ocorre quando o hormônio (ou outro fator tecidual) fecha os canais de sódio ou de cálcio e evita a entrada destes íons positivos. A inibição também ocorre quando canais de potássio, normalmente fechados, são abertos, permitindo que os íons potássio se difundam para fora da célula. Estas duas ações aumentam o grau de negatividade no interior da célula muscular, um estado chamado de hiperpolarização, que inibe fortemente a contração muscular (GUYTON; HALL, 2006).

Algumas vezes a contração ou a inibição do músculo liso é iniciada pelos hormônios sem causar nenhuma alteração direta no potencial de membrana. Nesses casos, o hormônio pode ativar um receptor de membrana que não abre os canais iônicos, mas que causa uma alteração interna na fibra muscular, tal como a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático intracelular. O cálcio então induz contração. Para inibir a contração, outros mecanismos receptores ativam as enzimas adenilato ciclase ou guanilato ciclase na membrana celular. As porções dos receptores que fazem protrusão para o interior das células estão acopladas a estas enzimas, levando à formação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) ou monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), os segundos mensageiros. Eles têm muitos efeitos, um dos quais é alterar o grau de fosforilação de várias enzimas que indiretamente inibem a contração. A bomba que move os íons cálcio do sarcoplasma para o retículo sarcoplasmático é ativada, bem como a bomba na membrana celular que move os íons cálcio para fora da própria célula. Estes efeitos reduzem a concentração de íons cálcio no sarcoplasma, inibindo a contração (GUYTON; HALL, 2006).

1.1.2 Músculo Liso das Vias Aéreas

O músculo liso das vias aéreas (MLVA) está localizado na parede da árvore traqueobrônquica, compreendendo desde a traqueia até os bronquíolos terminais. A sua contração reduz o diâmetro das vias aéreas e aumenta a resistência ao fluxo de ar. O estado contrátil está sob o controle de vários mensageiros extracelulares, que agem em receptores específicos de membrana. Os principais mensageiros são neurotransmissores do sistema nervoso autônomo (SNA), mediadores epiteliais e mediadores liberados por células inflamatórias. A ligação desses mensageiros aos seus receptores aumenta a concentração de Ca^{2+} citosólico, que ativa o aparato contrátil (OUEDRAOGO; ROUX, 2014).

O SNA parassimpático é o principal responsável pela broncoconstrição neural das vias aéreas, sendo a inervação colinérgica responsável pelo tônus basal. A acetilcolina (ACh), principal neurotransmissor parassimpático, é liberada nas sinapses ganglionares e nas junções pós-ganglionares. Nos gânglios, a ACh age nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos responsáveis pela neurotransmissão e age também nos receptores muscarínicos M1 envolvidos no feedback negativo. Na junção neuromuscular, a ACh ativa os receptores muscarínicos pós-juncionais M3, responsáveis pela contração, e os receptores pré-juncionais M2 envolvidos no feedback negativo da liberação de ACh (OUEDRAOGO; ROUX, 2014).

Ao contrário da estimulação colinérgica, a estimulação adrenérgica relaxa as

vias aéreas. Os receptores adrenérgicos do tipo β -2 são largamente expressos no MLVA. Em adição a acetilcolina e a noradrenalina, o componente não-adrenérgico e não-colinérgico (NANC) do SNA pode liberar outros agonistas contraturantes (como o neuropeptídeo Y, substância P, ATP e neurocininas) ou relaxantes, como o peptídeo intestinal vasoativo. Contudo, esse sistema NANC não é muito desenvolvido em vias aéreas humanas e tem um pequeno efeito regulatório na funcionalidade dessas vias. Em adição ao SNA, vários tipos celulares localizados na parede das vias aéreas, como células epiteliais, células inflamatórias e os próprios miócitos podem liberar uma variedade de mediadores, como por exemplo histamina, endotelina, ATP e metabólitos do ácido araquidônico, que podem modular a contração das vias aéreas por meio de receptores específicos de membrana (OUEDRAOGO; ROUX, 2014).

Estudos sugerem que alterações nas propriedades intrínsecas do MLVA tem papel em promover uma hiperresponsividade não-específica das vias aéreas, como ocorre na asma. Usando cultura de células musculares lisas das vias aéreas e/ou preparações brônquicas isoladas, pesquisadores demonstraram que uma variedade de citocinas, como TNF α , IL-1 β , IL-5 e IL-13 podem modular o fenótipo contrátil do MLVA por induzir hiperresponsividade não-específica a agonistas de receptores acoplados a proteína G (RAPG). Embora os mecanismos permaneçam desconhecidos, citocinas podem afetar a expressão e os mecanismos de sinalização de RAPG, além de alterar a sensibilidade do aparato contrátil ao cálcio, possivelmente devido à ativação de mecanismos dependentes de Rho-quinase. O MLVA também parece orquestrar e perpetuar a inflamação devido à sua habilidade de secretar citocinas (IL-1, IL-5 e IL-6) e quimiocinas (IL-8, eotaxina e RANTES) e por expressar uma variedade de moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1, CD44 e integrinas). Além disso, o MLVA também secreta VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*, uma molécula importante na angiogênese (AMRANI; PANETTIERI, 2003).

O papel fisiológico da reatividade das vias aéreas ainda não está claro, mas parece controlar a distribuição do fluxo de ar intrapulmonar e conseqüentemente a relação ventilação/perfusão. A alteração da reatividade das vias aéreas tem um papel chave em várias doenças pulmonares. De fato, vários sintomas respiratórios são associados a obstrução das vias aéreas, como por exemplo o estreitamento das vias aéreas mediado pela contração das células do músculo liso contribui significativamente para a obstrução na asma (OUEDRAOGO; ROUX, 2014).

1.2 Asma

Asma é uma doença heterogênea, usualmente caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas. Ela é definida pela história de sintomas respiratórios, como sibilância, falta de ar, aperto no peito e tosse, que varia com o tempo e em intensidade, junto com uma limitação variável do fluxo de ar expiratório. Muitos fenótipos têm sido identificados, sendo a asma alérgica o mais comum e facilmente reconhecido. Esse fenótipo geralmente tem início na infância e está associado com história familiar ou pregressa de doenças alérgicas como eczema, rinite alérgica ou alergia a alimentos ou a medicamentos. Outros fenótipos incluem a asma não alérgica, asma de início tardio, asma com limitação fixa ao fluxo aéreo e asma com obesidade (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2018).

De acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma (2012), o diagnóstico clínico da asma é sugerido por um ou mais sintomas, como dispneia, tosse crônica, sibilância, opressão ou desconforto torácico. As manifestações que sugerem fortemente o diagnóstico de asma são a variabilidade dos sintomas, o desencadeamento de sintomas por irritantes inespecíficos (como fumaças, odores fortes e exercício) ou por aeroalérgenos (como ácaros e fungos), a piora dos sintomas à noite e a melhora espontânea ou após o uso de medicamentos específicos para asma.

Embora o diagnóstico clínico da asma em sua forma clássica de apresentação não seja difícil, a confirmação deve ser feita por um método objetivo, uma vez que os sinais e sintomas da asma não são exclusivos dessa condição. Os testes diagnósticos disponíveis na prática clínica incluem espirometria (antes e após o uso de broncodilatador), testes de broncoprovocação e medidas seriadas de PFE (Pico de Fluxo Expiratório). Em certos casos, a comprovação da reversibilidade da obstrução ao fluxo aéreo pode ser demonstrada apenas com o teste terapêutico com corticoide oral (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2012).

Em 2013, 2.047 pessoas morreram de asma no Brasil, isto é, aproximadamente 5 óbitos por dia e mais de 120.000 hospitalizações por ano. A taxa de mortalidade da asma em pacientes hospitalizados aumentou aproximadamente 25% de 2008 a 2013. (CARDOSO *et al.*, 2017). Apesar de serem apenas 5%-10% dos casos de asma, pacientes com asma grave apresentam maior morbimortalidade relativa, e são responsáveis por um consumo desproporcionalmente alto dos recursos de saúde em relação aos grupos de menor gravidade. Portadores de asma grave não controlada procuram 15 vezes mais as unidades de emergência médica e são hospitalizados 20 vezes mais que os asmáticos moderados (BRASIL, 2013).

Segundo os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde, a base do tratamento medicamentoso da asma persistente é o uso continuado de medicamentos

com ação anti-inflamatória, também chamados controladores, sendo corticosteroides inalatórios os principais deles, tanto em adultos como em crianças. Aos controladores se associam medicamentos de alívio, com efeito broncodilatador. A via de escolha é a inalatória. Na asma intermitente, o tratamento medicamentoso é direcionado para o alívio imediato dos eventuais sintomas decorrentes de obstrução (sintomas agudos), indicando-se broncodilatadores beta-adrenérgicos de curta ação (B2CA) para uso conforme necessidade. Nas exacerbações moderadas ou graves, além de B2CA e corticosteroides inalatórios recomenda-se curso de corticoterapia oral para a obtenção do estado de controle, e seguimento da terapêutica anti-inflamatória com corticosteroide inalatório (BRASIL, 2013).

1.3 Agonistas Beta-Adrenérgicos

Os receptores β adrenérgicos foram subclassificados em β_1 , β_2 e β_3 . Embora tanto o β_1 quanto o β_2 estejam localizados nos pulmões, a broncodilatação parece ser inteiramente uma função dos receptores adrenérgicos β_2 . Os agonistas do receptor β_2 -adrenérgico produzem seus efeitos através de interações com receptores β_2 específicos, localizados na membrana plasmática celular. Esses receptores estão ligados a uma proteína estimulatória (Gs). Assim, ao serem ativados, ocorre uma mudança de conformação no receptor, que leva à ativação da adenilato ciclase, que por sua vez catalisa a conversão de ATP em AMP cíclico (AMPC), responsável pela resposta fisiológica, que difere de acordo com o tipo de célula (NELSON, 1995).

Entre as três classes de broncodilatadores (agonistas do receptor adrenérgico β_2 , metilxantinas e agentes anticolinérgicos), os agonistas do receptor adrenérgico β_2 são os que produzem a maior broncodilatação em pacientes com asma brônquica (NELSON, 1995). Segundo Rizzo (1997), até meados dos anos 80, os broncodilatadores β -adrenérgicos eram considerados a base no tratamento da asma e os corticosteróides só estavam indicados quando o controle dos sintomas não era obtido com seu uso regular. A crescente compreensão e valorização do processo inflamatório como evento básico na patogênese da asma levou os corticosteróides, especialmente aqueles administrados por via inalatória, a serem recomendados cada vez mais precocemente, associados ou não aos broncodilatadores.

Agonistas β_2 -adrenérgicos são os mais efetivos broncodilatadores para o tratamento de episódios agudos de asma e para a prevenção de broncoconstrição induzida por exercício. Os de longa ação previnem a asma noturna e promovem proteção prolongada. Eles

devem ser administrados somente em intervalos prescritos e regulares, e doses adicionais não devem ser dadas para aliviar sintomas, sendo preferido agonistas β_2 de ação intermediária nesses casos. Embora exista preocupações sobre essa classe de fármacos, os efeitos adversos, como broncoespasmos severos e aumento da inflamação e da hiperresponsividade brônquica, são provavelmente mais associados à severidade da asma do que aos fármacos em si (NELSON, 1995). Em uma metanálise incluindo pacientes com asma persistente, o uso de terapia única de manutenção/alívio com corticosteroides inalatórios e β -agonistas de longa ação associados está relacionada com um risco menor de exacerbações, quando comparada a terapia combinada: de controle com corticosteróides inalatórios (com ou sem β -agonista de longa ação) e de alívio com β -agonista de curta ação (SOBIERAJ *et al.*, 2018). Logo, a terapia única de β -agonistas associados a corticosteroides parece ser mais vantajosa pois está associada a menores exacerbações da asma. Assim, agonistas β_2 -adrenérgicos continuam sendo a classe mais importante de broncodilatadores atualmente disponível. Quando usados de forma apropriada, promovem o alívio seguro e efetivo dos sintomas da obstrução do fluxo de ar (NELSON, 1995).

1.4 Clorprenalina e (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol (2CFOH)

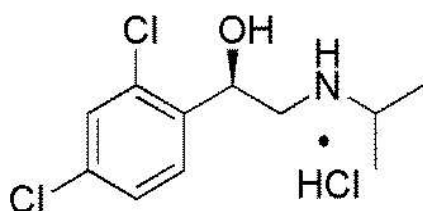
Desde que publicações começaram a ser divulgadas, relatando que a efedrina e substâncias relacionadas eram capazes de causar broncodilatação, Powell, Gibson e Swanson (1956) pesquisaram continuamente por um substituto sintético que também tivesse essa propriedade. O principal propósito dessa pesquisa era a síntese de uma substância com ação broncodilatadora mais longa que a da epinefrina e mais específica que a da efedrina. Uma substância sintetizada na divisão de química orgânica desses pesquisadores, 1-*o*-clorofenil-2-isopropilaminoetanol, relacionada com a epinefrina, posteriormente denominada clorprenalina, foi alvo de estudos farmacológicos e toxicológicos, sendo demonstrado uma ação broncodilatadora notável. Brônquios de cães descerebrados contraídos com pilocarpina eram rapidamente relaxados pela clorprenalina, que mantinha sua ação por mais tempo que a epinefrina (POWELL; GIBSON; SWANSON, 1956). Em traqueias de cobaias e pulmões isolados de coelhos a clorprenalina também demonstrou ação broncodilatadora em constrição induzida pela pilocarpina (POWELL; GIBSON; SWANSON, 1956). Powell e Slater (1958 *apud* MAXWELL; ECKHARDT, 1990) notaram que era difícil obter um relaxamento completo com epinefrina após o tecido ter sido exposto à clorprenalina.

Segundo Aviado *et al.* (1958), a clorprenalina é capaz de provocar, em cães anestesiados, uma vasodilatação sistêmica, similar à induzida pelo isoproterenol, porém necessitando de doses maiores, acompanhada de uma redução da força de contração do miocárdio e redução da pressão arterial sistêmica. Assim, Aviado e colaboradores demonstraram que a clorprenalina é capaz de induzir broncodilatação, sendo esta não seletiva, causando também efeitos cardiovasculares sistêmicos, como a hipotensão. Assim, essa desvantagem dificultou seu uso na clínica, visto que seu uso em doenças respiratórias fica comprometido devido aos efeitos colaterais sistêmicos.

Heimlich, Harris e Smith (1960), em um estudo duplo cego, compararam o efeito da clorprenalina a um placebo em 71 crianças com asma. Nenhuma diferença foi encontrada em relação ao alívio ou prevenção de sintomas entre os grupos tratados com clorprenalina e com o placebo. Em 1962, novamente Heimlich e Smith estudaram os efeitos da clorprenalina e do metapirileno em um estudo duplo cego em 28 crianças com asma e rinite alérgica. Nenhum efeito da clorprenalina na profilaxia ou tratamento foi observado. Já em 1963, Wang e Shipley demonstraram em um estudo duplo cego que a clorprenalina foi efetiva no alívio da dispneia em pacientes com asma brônquica, com uma duração de ação maior que os outros broncodilatadores em estudo, incluindo efedrina, isoproterenol, aminofilina e metoxifenamina.

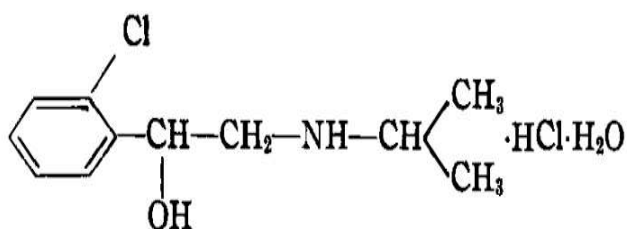
A substância do presente estudo, o cloridrato de (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol (2CFOH), possui estrutura molecular semelhante à clorprenalina, com apenas a substituição de um átomo de hidrogênio por um átomo de cloro no anel benzênico (Figuras 1 e 2). Ele foi sintetizado no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) por meio de síntese quimioenzimática, através do emprego de lipases como biocatalisadores, já que elas são ambientalmente aceitas e mais viáveis economicamente, além de apresentarem características regio-, quimio-, e enantiosseletivas (AHMED; KELLY; GHANEM, 2012). A lipase que será utilizada para as reações será a lipase da *Candida antarctica* do tipo B (CAL-B). Essa lipase é capaz de funcionar como catalisador frente a uma gama de substratos, proporcionando excelentes resultados (SILVA *et al.*, 2014).

Figura 1 - Estrutura química do cloridrato de (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol (2CFOH).



Fonte: Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) da Universidade Federal do Ceará.

Figura 2 - Estrutura química do cloridrato de clorprenalina.



Fonte: POWELL; GIBSON; SWANSON, 1956.

Devereaux *et al.* (2016) demonstraram que a substituição de grupos metil por cloro ou bromo aumentam significativamente a potência e a afinidade de um fármaco em estudo, o *sobetirome*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Fricke, Klaus e Stein (1988) demonstraram que derivados halogenados de diidropiridinas apresentavam maior seletividade vascular, possivelmente devido a diferença na lipofilicidade. Assim, a modificação molecular da clorprenalina, formando um análogo halogenado possivelmente pode aumentar a potência, afinidade e seletividade desse fármaco. Dessa forma, é relevante o estudo do 2CFOH devido a semelhança estrutural entre ele e a clorprenalina, substância que possui atividade broncodilatadora. Assim, é possível que o 2CFOH possua propriedades semelhantes e importante ação na via adrenérgica.

Acreditamos que os análogos da clorprenalina podem exercer importantes atividades farmacológicas, seja atuando como agonistas beta-adrenérgicos (como é o caso da clorprenalina) ou antagonizando receptores beta-adrenérgicos (como por exemplo, o nifenalol e sotalol). Nesse estudo, pretendemos caracterizar farmacologicamente o análogo cloridrato de (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol, obtido por métodos quimioenzimáticos, em preparações isoladas de rato. O análogo foi escolhido pela similaridade estrutural em relação à

clorprenalina e por ainda não ter sido avaliado por estudos científicos. Verificaremos seus efeitos *in vitro* em preparações isoladas de aorta e traqueia de rato, para analisar seu possível potencial no tratamento de doenças respiratórias ou cardiovasculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Caracterizar a atividade farmacológica do cloridrato de (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol em aorta e traqueia isoladas de ratos.

2.2 Específicos

- Investigar o provável mecanismo de ação farmacológica do cloridrato de (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol em aorta e traqueia isoladas de ratos Wistar.
- Investigar os possíveis efeitos do cloridrato de (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol em receptores beta-adrenérgicos, em aorta e traqueia isoladas de ratos Wistar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Substância de estudo

O cloridrato de (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol foi obtido através de síntese quimioenzimática e fornecido pelo Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) da Universidade Federal do Ceará (UFC), localizado no Campus do Pici, Fortaleza, Ceará. A substância foi preparada e dissolvida em solução fisiológica de Krebs, na concentração de 10 mM, e homogeneizada em agitador vortex imediatamente antes do uso.

3.2 Soluções e drogas

O meio de perfusão utilizado no estudo foi a solução de Krebs-Henseleit modificada, mantida em pH de 7,4, com a seguinte composição (mM): NaCl 118, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, CaCl₂ 2,5, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25 e glicose 11,1. Os sais foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Fenilefrina (Phe), acetilcolina (ACh), propranolol, todos de grau de pureza analítica, foram adquiridos da Sigma Co. (St. Louis, EUA).

3.3 Animais

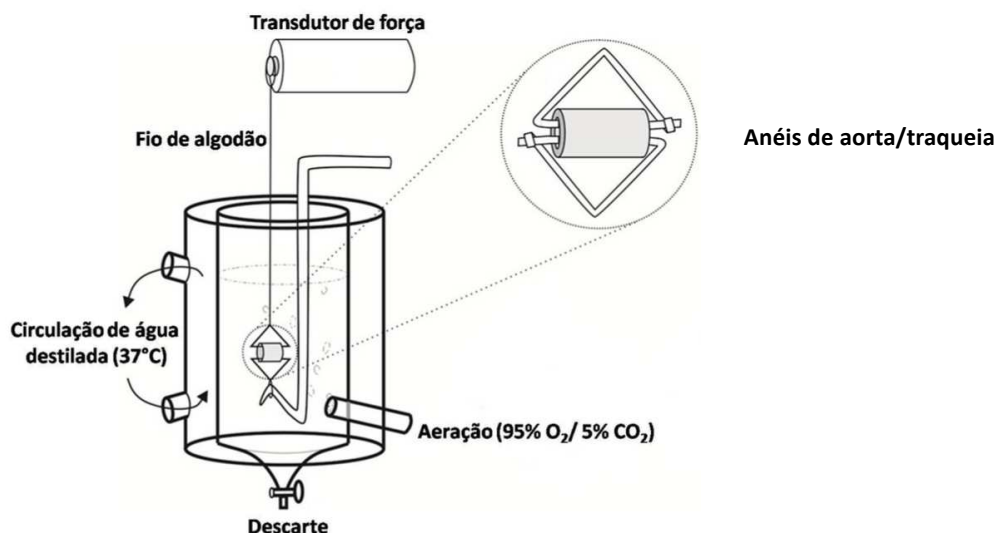
Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 220-300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina. Os animais foram mantidos em temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com um ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro e livre acesso à comida e água.

Os animais foram tratados em conformidade com as normas de manipulação de animais de laboratório preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com respeito às normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC. Todos os procedimentos aqui descritos foram analisados e tiveram a aprovação prévia da referida comissão local sob o número de protocolo #83/2016 (em anexo).

3.4 Experimentos com anéis de artéria aorta e anéis de traqueia isolada de rato

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg) e em seguida eutanasiados por exsanguinação. A aorta torácica e a traqueia foram removidas e transferidas para uma placa de Petri contendo o meio de perfusão à temperatura ambiente. Após a remoção dos tecidos adjacentes, aorta e traqueia foram cortadas transversalmente em segmentos cilíndricos em forma de anel (1 x 5mm), os quais foram presos a peças triangulares de fio de aço (0,3mm de diâmetro) e posteriormente suspensos em um sistema de banho para órgãos isolados contendo 5mL de solução fisiológica de Krebs-Henseleit modificada, pH 7,4, oxigenadas continuamente com mistura carbogênica (O₂ 95%; CO₂ 5%) e aquecidas a 37°C (Figura 3). Anéis de aorta e traqueia foram mantidos sob tensão de 1g e a tensão foi registrada por meio de um transdutor de força isométrico conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, AD Instruments, Austrália). A retirada do endotélio foi realizada por raspagem cuidadosa da luz vascular, onde os segmentos de artéria aorta isolada, presos a peças triangulares de fio de aço, eram friccionados levemente em papel toalha. Para confirmação da integridade do endotélio, as preparações foram tratadas, no início dos experimentos, com fenilefrina (0,1 µM), e após o estabelecimento de um platô de contração foi adicionado 1 µM de acetilcolina. A ausência de efeito vasorelaxante induzido por acetilcolina foi tomada como evidência de que a preparação estava funcionalmente desprovida de endotélio. Após um período de estabilização (60 minutos), para a adaptação dos tecidos às novas condições, contrações controles foram induzidas pelo aumento da concentração de KCl para 60mM na solução no banho. As preparações foram consideradas equilibradas quando duas contrações sucessivas mostraram amplitudes semelhantes. Após o equilíbrio os protocolos se iniciavam. O antagonista β-adrenérgico não-seletivo propranolol foi adicionado às cubas e esperou-se 10 minutos após sua adição para realizar a contração dos tecidos. Após a contração atingir um platô, a curva concentração-efeito era iniciada.

Figura 3 – Representação esquemática do sistema para órgão isolado utilizado para estudo da contratilidade de anéis de aorta e traqueia de rato.



Uma das extremidades dos anéis de aorta ou traqueia é presa a uma haste fixa e a outra extremidade a um transdutor de força. Alterações na luz vascular ou traqueal, devido a contração ou relaxamento do tecido, causam o estreitamento ou o aumento da luz vascular ou traqueal, respectivamente, sendo detectadas pelo transdutor. Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI).

3.5 Protocolos experimentais

3.5.1 Avaliação dos efeitos relaxantes do 2CFOH em aorta isolada de rato

Para avaliar o efeito relaxante do 2CFOH, anéis de aorta isolada de rato foram previamente contraídos com fenilefrina (Phe; 1 μ M) e com potássio (KCl 60mM) e, em seguida, expostos às concentrações cumulativas de 2CFOH (1-1000 μ M) e (0,01-1000 μ M), respectivamente, adicionadas ao banho e mantidas a uma mesma concentração por 5 minutos.

3.5.2 Avaliação dos efeitos relaxantes do 2CFOH em traqueia isolada de rato

Para avaliar o efeito relaxante do 2CFOH, anéis de traqueia isolada de rato foram previamente contraídos com carbacol (CCh; 1 μ M) e expostos às concentrações cumulativas de 2CFOH (0,01-300 μ M), adicionadas ao banho e mantidas a uma mesma concentração por 5 minutos.

3.5.3 Avaliação da influência da remoção do endotélio nos efeitos relaxantes do 2CFOH em aorta isolada de rato

Com o objetivo de investigar a influência do endotélio no efeito relaxante do 2CFOH, anéis de aorta com endotélio removido foram previamente contraídos com fenilefrina (1 μ M) e em seguida expostos à concentrações cumulativas de 2CFOH (1-1000 μ M) adicionadas ao banho e mantidas em uma mesma concentração por 5 minutos. Em seguida, foi realizado o mesmo protocolo em anéis de aorta com endotélio intacto para comparação.

3.6 Análise estatística

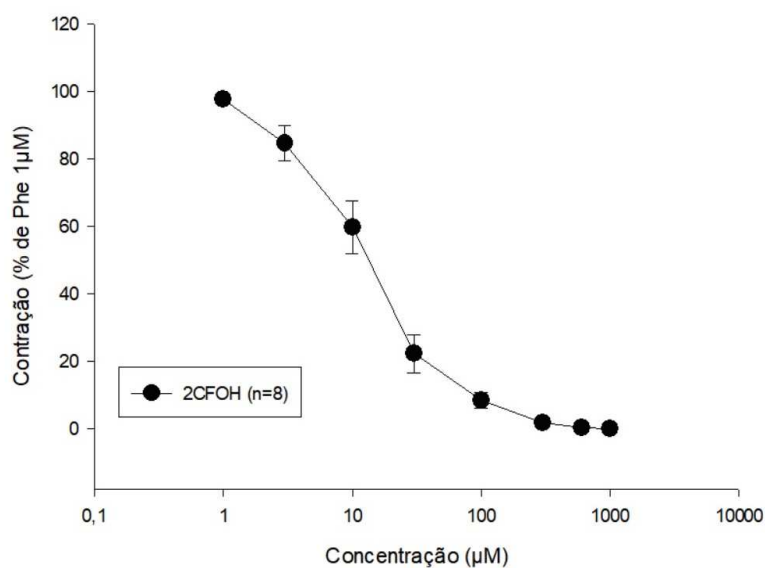
Os resultados foram expressos como médias aritméticas \pm erro padrão da média (E.P.M.), com a representação do número de observações experimentais (n). Alguns parâmetros, como os valores de concentração efetiva (CE₅₀) calculados por interpolação semi-logarítmica, estão expressos como a média geométrica e o intervalo de confiança de 95%. A significância estatística foi considerada quando a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade foi menor que 5% ($p < 0,05$). A significância dos resultados foi avaliada por teste de Mann-Whitney ou análise de variância (ANOVA). Quando o teste ANOVA foi significativo, foi utilizado o teste posterior de múltipla comparação de Holm-Sidak. Os testes foram aplicados e os gráficos confeccionados utilizando o programa SigmaPlot (Systat Software Inc, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito relaxante do 2CFOH em anéis de aorta isolada de rato contraídos com fenilefrina

Curvas concentração-efeito foram obtidas a partir de concentrações cumulativas de 2CFOH (1-1000 μM) adicionadas aos anéis de aorta com endotélio intacto e previamente contraídos com fenilefrina (1 μM). A adição do 2CFOH foi realizada no platô de contração induzida por fenilefrina. O relaxamento observado foi dependente de concentração, com CE_{50} de 19,0 [10,1 - 35,8] μM . Foi observado um relaxamento completo da contração de fenilefrina (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Curva concentração-efeito ao 2CFOH em anéis de aorta previamente contraídos com Fenilefrina 1 μM .

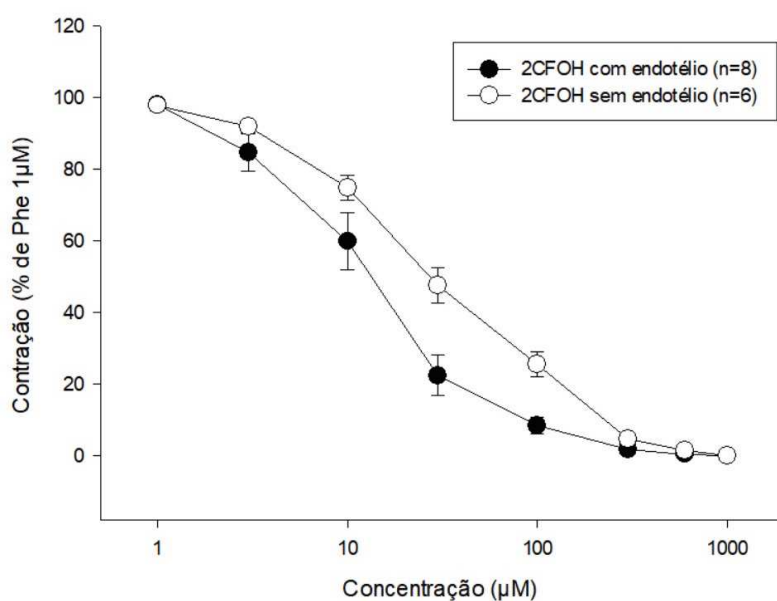


Representação gráfica mostrando uma curva concentração-efeito ao 2CFOH (1-1000 μM) (n=8) após contração induzida por fenilefrina (1 μM), CE_{50} de 19,0 [10,1 - 35,8] μM ; média e intervalo de confiança 95%. O (n) representa o número de observações experimentais. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

4.2 Influência da remoção do endotélio nos efeitos relaxantes do 2CFOH em anéis de aorta

Em aorta contraída com fenilefrina 1 μM , a remoção mecânica do endotélio alterou significativamente o efeito relaxante do 2CFOH (1-1000 μM) ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak). A curva foi deslocada para direita na ausência de endotélio (Gráfico 2). A curva concentração-efeito ao 2CFOH (Gráfico 1) é mostrada novamente no Gráfico 2 para efeitos de comparação.

Gráfico 2 - Curvas concentração-efeito ao 2CFOH em preparações de aorta previamente contraídas com Fenilefrina 1 μM , com e sem endotélio preservado.



Representação gráfica mostrando curvas concentração-efeito ao 2CFOH (1-1000 μM) após contração induzida por fenilefrina (1 μM), em preparações de aorta na presença (\bullet , n = 8) e ausência de endotélio (\circ , n = 6). A remoção do endotélio reduziu a potência do 2CFOH ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak). O (n) representa o número de observações experimentais. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

4.3 Efeito relaxante do 2CFOH em preparações de aorta mantidas na presença ou ausência de propranolol, contraídas com Potássio

Curvas concentração-efeito foram obtidas a partir de concentrações cumulativas de 2CFOH (0,01-1000 μM) adicionadas aos anéis de aorta contraídos com KCl (60mM). O relaxamento foi dependente de concentração, sendo completa a reversão da contração de potássio, CE_{50} de 26,0 [7,6 – 88,2] μM (Gráfico 3).

O antagonista β -adrenérgico não-seletivo propranolol (1 μM) não influenciou significativamente o efeito relaxante do 2CFOH em aorta contraída com Potássio ($p > 0,05$, teste de Holm-Sidak) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Curvas concentração-efeito ao 2CFOH em preparações de aorta previamente contraídas com KCl 60mM na presença e ausência de propranolol

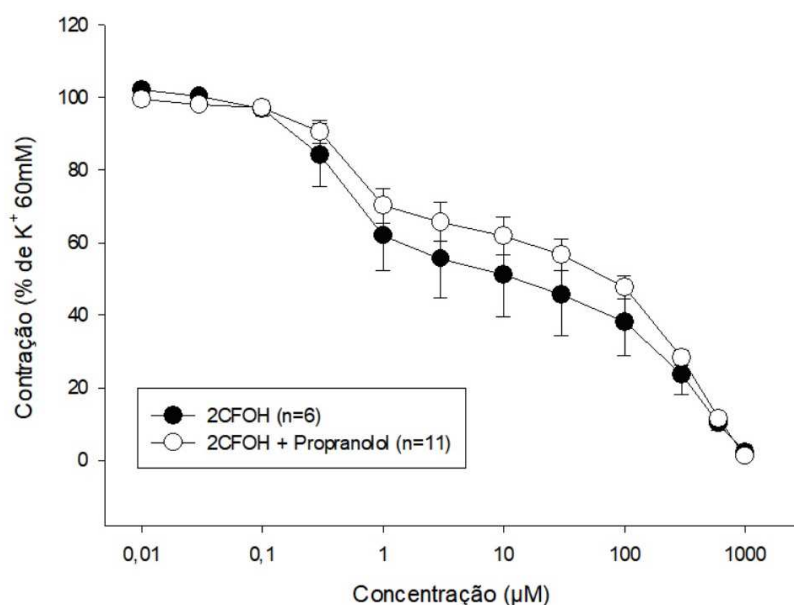


Gráfico mostrando a curva concentração-efeito ao 2CFOH na ausência (\bullet , $n = 6$) e presença (\circ , $n = 11$) de propranolol 1 μM . O tratamento com propranolol (1 μM) não alterou significativamente o efeito relaxante do 2CFOH ($p > 0,05$, Teste de Holm-Sidak). O (n) representa o número de observações experimentais. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

4.4 Efeito relaxante do 2CFOH em preparações de aorta mantidas na presença ou ausência de propranolol, contraídas com Fenilefrina

Em anéis de aorta contraídos com fenilefrina ($1\mu\text{M}$) na presença de propranolol ($1\mu\text{M}$), a potência do 2CFOH (1-1000 μM) ao relaxar a contração foi reduzida ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak). A CE_{50} na presença de propranolol foi $32,7 [20,0-53,4] \mu\text{M}$, enquanto na ausência foi $19,0 [10,1-35,8] \mu\text{M}$, observando-se um aumento da CE_{50} na presença de propranolol (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Curvas concentração-efeito ao 2CFOH em preparações de aorta previamente contraídas com Fenilefrina $1\mu\text{M}$ na presença ou ausência de propranolol

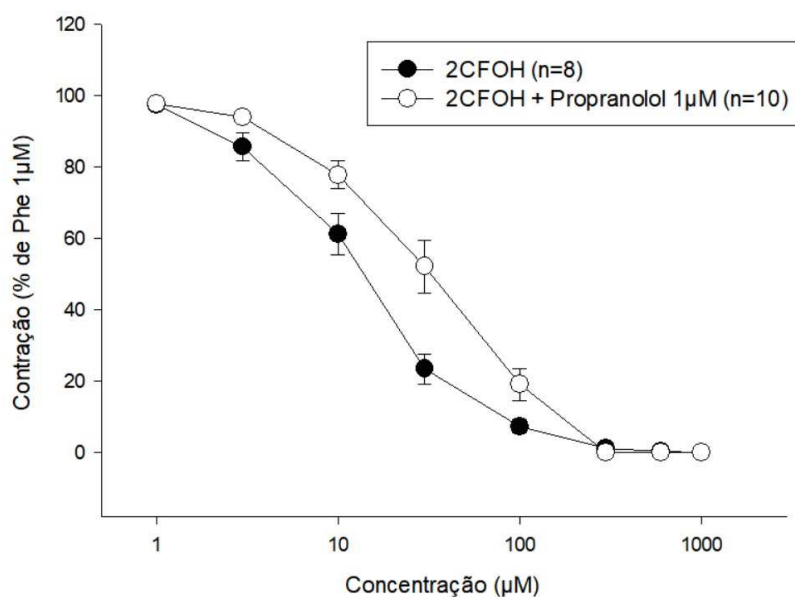


Gráfico mostrando a curva concentração-efeito ao 2CFOH na ausência (●, $n = 8$) e presença (○, $n = 10$) de propranolol $1\mu\text{M}$. O tratamento com propranolol alterou significativamente o efeito relaxante do 2CFOH ($p < 0,05$, Teste de Holm-Sidak), sendo a CE_{50} aumentada de $19,0 [10,1 - 35,8] \mu\text{M}$ para $32,7 [20,0-53,4] \mu\text{M}$. O (n) representa o número de observações experimentais. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

4.5 Efeito relaxante do 2CFOH em preparações de traqueia contraídas com carbacol, mantidas na presença ou ausência de propranolol

Em anéis de traqueia contraídos com carbacol (CCh) 1 μ M, 2CFOH (0,01-300 μ M) induziu relaxamento, com CE₅₀ de 17,5 [11,9 - 25,8] μ M. O antagonista não seletivo propranolol reduziu significativamente o efeito relaxante do 2CFOH ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak), apresentando CE₅₀ de 35,6 [11,6 - 109,0] μ M. Assim, a CE₅₀ foi aumentada na presença de propranolol (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Curvas concentração-efeito ao 2CFOH em preparações de traqueia, na ausência e presença de propranolol e previamente contraídas com Carbacol 1 μ M.

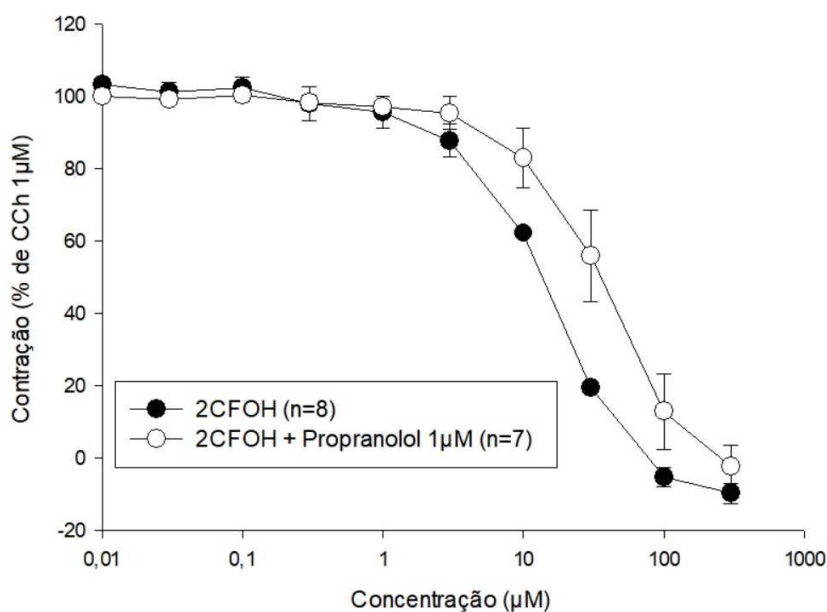


Gráfico mostrando a curva concentração-efeito ao 2CFOH na ausência (\bullet , $n = 8$) e presença (\circ , $n = 7$) de propranolol 1 μ M. O tratamento com propranolol alterou significativamente o efeito relaxante do 2CFOH ($p < 0,05$, Teste de Holm-Sidak), aumentando a CE₅₀. O (n) representa o número de observações experimentais. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

5 DISCUSSÃO

O cloridrato de (2,4-diclorofenil)-2-(isopropilamino)etanol (2CFOH) é um análogo da clorprenalina, uma substância com notável ação broncodilatadora (POWELL; GIBSON; SWANSON, 1956). O 2CFOH, objeto de estudo nesse trabalho, foi obtido através de síntese quimioenzimática e aqui procurou-se demonstrar sua atividade relaxante e o envolvimento de receptores β -adrenérgicos nos seus efeitos, em anéis de traqueia e aorta isoladas de rato.

Inicialmente experimentos foram feitos em preparações de aorta isoladas de rato. Concentrações crescentes (1-1000 μ M) de 2CFOH foram adicionadas a anéis de aorta contraídos com fenilefrina (1 μ M), agonista adrenérgico α_1 -seletivo. Assim, as concentrações cumulativas de 2CFOH induziram vasorelaxamento que reverteu completamente a contração de fenilefrina.

O antagonista β -adrenérgico não seletivo propranolol (1 μ M) foi usado para investigar a influência de receptores β -adrenérgicos no efeito relaxante do 2CFOH. Foi evidenciado uma influência desse antagonista no efeito relaxante do 2CFOH em aorta contraída com fenilefrina, alterando a CE_{50} de aproximadamente 19,0 μ M para 32,7 μ M, deslocando a curva para a direita. Assim, o tratamento com propranolol parece reduzir o efeito relaxante do 2CFOH, pois ele aumentou a CE_{50} , a concentração eficaz para produzir 50% de resposta (GOODMAN; GILMAN, 2012). Logo, pode-se inferir o possível papel de β -receptores no efeito relaxante do 2CFOH em aorta, visto que o uso de um β -antagonista reduz o seu efeito.

Quando anéis de aorta foram contraídos com potássio (KCl 60 mM) e depois foram adicionadas concentrações cumulativas de 2CFOH, também foi observado um relaxamento completo da contração induzida pelo potássio, com CE_{50} de aproximadamente 26,0 μ M. Ao comparar esse resultado com o que foi visto em aorta contraída com fenilefrina (CE_{50} de 19,0 μ M), observa-se que o efeito relaxante é mais potente em contrações induzidas por fenilefrina do que em contrações por K^+ , pois a CE_{50} é menor quando Phe é usada como agente contrátil.

Na presença de propranolol (1 μ M), não se observa diferença significativa no efeito relaxante do 2CFOH em aorta contraída com K^+ . Assim, o β -antagonista propranolol parece não ter influência nos efeitos relaxantes do 2CFOH após uma contração induzida por potássio, diferentemente do que ocorre em uma contração induzida pela fenilefrina, em que o propranolol tem influência.

O mecanismo de contração por essas duas substâncias é diferente, pois a contração induzida pelo íon potássio ocorre pelo mecanismo do acoplamento eletromecânico, que consiste na despolarização da membrana plasmática devido à entrada de íons K^+ , o que altera o gradiente eletroquímico e promove a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. Assim, o cálcio extracelular se difunde para o interior da célula, obedecendo o gradiente de concentração, sendo responsável pela contração celular (PAIVA; FARIAS, 2005).

Por outro lado, a contração causada pelo agonista adrenérgico α_1 -seletivo, fenilefrina, é resultante de outro mecanismo: o acoplamento farmacomecânico. Ela ocorre independentemente da despolarização celular, envolvendo a interação de agonistas com os seus receptores acoplados à proteína G situada na membrana. Essas proteínas G possuem três subunidades, alfa, beta e gama. Durante a sua ativação, a subunidade alfa se dissocia das demais e passa a ativar uma série de eventos. As diferenças entre as subunidades alfa conferem especificidade à resposta da proteína G. Por exemplo, a subunidade α_q induz vasoconstrição principalmente por ativar as fosfolipases celulares (PAIVA; FARIAS, 2005). Assim, o 2CFOH parece provocar relaxamento em anéis de aorta por meio de mecanismos que podem envolver o acoplamento farmacomecânico de contração celular.

Em preparações de traqueia contraídas com o agonista colinérgico carbacol, concentrações crescentes de 2CFOH (0,01-300 μ M) induziram relaxamento, com CE_{50} de aproximadamente 17,5 μ M. Novamente o β -antagonista propranolol foi usado para investigar a influência de receptores β -adrenérgicos no efeito relaxante do 2CFOH, agora em preparações de traqueia. Esse β -bloqueador reduziu significativamente o efeito relaxante do 2CFOH, aumentando a CE_{50} para aproximadamente 35,6 μ M, deslocando a curva novamente para a direita. Sendo assim, em traqueia, os receptores β -adrenérgicos também parecem estar envolvidos no relaxamento induzido pelo 2CFOH.

Powell, Gibson e Swanson (1956), no primeiro estudo sobre a clorprenalina, demonstraram que em traqueia de cobaias a clorprenalina era capaz de relaxar espasmos induzidos pela pilocarpina, sendo estimada que a potência de 1mg de clorprenalina era equivalente a potência de 9 μ g de epinefrina em reduzir os espasmos. Em pulmões isolados de coelhos, foi demonstrado que a clorprenalina possuía uma ação mais potente: era 47% tão ativa quanto a epinefrina em relaxar contrações induzidas pela pilocarpina. Assim, ficou evidenciada que a sua ação era mais potente na árvore brônquica do que na estrutura muscular traqueal. O 2CFOH também possui ação na traqueia, promovendo relaxamento de contrações induzidas pelo carbacol, um agente parassimpaticomimético. Estudos para inferir a ação do 2CFOH em brônquios e outros tecidos respiratórios são necessários e importantes para

analisar os efeitos dessa substância de forma mais aprofundada.

Em um estudo com traqueia isolada de cobaia, Gomi e colaboradores (1979) demonstraram que o propranolol na concentração de $1\mu\text{M}$ era capaz de inibir completamente o relaxamento induzido pela clorprenalina. Além disso, verificaram que o propranolol na concentração de $10\mu\text{M}$ aboliu o efeito cronotrópico positivo e na concentração de $1\mu\text{M}$ aboliu o efeito inotrópico positivo, induzidos pela clorprenalina em preparações de átrio direito isolado de cobaia.

No presente estudo, a concentração de propranolol usada em experimentos com o 2CFOH em traqueia foi a mesma usada por Gomi e colaboradores, em estudos com a clorprenalina em traqueia: $1\mu\text{M}$. Contudo, diferentemente do que ocorreu no estudo de Gomi, o propranolol não foi capaz de inibir completamente o relaxamento induzido pelo 2CFOH em traqueia de rato, mas ele influenciou no efeito. Assim, é possível inferir que os efeitos relaxantes do 2CFOH podem não envolver os mesmos mecanismos da clorprenalina, visto que essas substâncias não respondem da mesma forma ao propranolol.

Para avaliar a influência de fatores endoteliais no relaxamento induzido pelo 2CFOH, o endotélio de aorta foi removido por meio de uma raspagem da luz vascular. Ao comparar os efeitos de concentrações cumulativas de 2CFOH ($1-1000\mu\text{M}$) em aorta contraída com fenilefrina em preparações com e sem endotélio, foi observada uma redução do efeito relaxante do 2CFOH em preparações sem endotélio, sendo a curva deslocada para a direita. Desse modo, supõem-se que o endotélio tem um papel nos mecanismos que levam ao relaxamento vascular induzido pelo 2CFOH.

A integridade do endotélio é essencial à regulação do tono vascular e estrutura dos vasos, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e à proteção contra espasmo, trombose e aterogênese (BATLOUNI, 2001). A descoberta da importância do endotélio para o relaxamento de aorta de coelhos por Furchgott e Zawadzki (1980) e da hipótese de uma substância liberada pelo endotélio responsável por causar esse relaxamento e sua posterior denominação como fator relaxante derivado do endotélio (do inglês, EDRF), sendo identificada por Ignarro e colaboradores e caracterizada por Murad em 1977 como sendo o óxido nítrico, abriram as portas para uma série de estudos que demonstraram que o endotélio libera outros EDRF, como a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), além de fatores constritores derivados do endotélio (EDCF), como a endotelina, produtos da via da ciclo-oxigenase como por exemplo o tromboxano A_2 e espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)³. Essas descobertas, associadas à caracterização do endotélio como um sensor biológico capaz de detectar e responder a

qualquer estímulo mecânico, físico ou químico, elevou-o ao posto de um tecido multifuncional que desempenha importante papel na homeostasia de todos os sistemas fisiológicos (DIAS *et al.*, 2011).

Em vista dessa complexidade do endotélio, é necessário um maior estudo quanto a esses diversos fatores que podem estar envolvidos no vasorelaxamento induzido pelo 2CFOH, tendo em vista que a presença de endotélio influencia nos seus efeitos relaxantes.

6 CONCLUSÃO

O 2CFOH é capaz de induzir relaxamento em aorta de rato contraída com fenilefrina e com potássio, sendo também capaz de induzir relaxamento em traqueia de rato contraída com carbacol. O endotélio parece influenciar nesse efeito vasorelaxante, sendo observado um efeito mais potente na presença de endotélio. Receptores β -adrenérgicos parecem estar envolvidos no mecanismo relaxante quando traqueia é contraída com carbacol e quando aorta é contraída com fenilefrina, mas não quando a contração em aorta é induzida por potássio.

REFERÊNCIAS

AHMED, M.; KELLY, T.; GHANEM, A. Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. **Tetrahedron**, v. 68 (34), p. 6781-6802, aug 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402012007570?via%3Dihub>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

AMRANI, Y.; PANETTIERI, R.A. Airway smooth muscle: contraction and beyond. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35(3), p. 272-276, mar 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272502002595?via%3Dihub>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

AVIADO, D.M.; WNUCK, A.L.; DE BEER, E.J. Cardiovascular Effects of Sympathomimetic Bronchodilators: Epinephrine, Ephedrine, Pseudoephedrine, Isoproterenol, Methoxyphenamine and Isoprophenamine. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v. 122 , p. 406-417, mar. 1958. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/122/3/406.long>>. Acesso em: 21 fev. 2018.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens.**, v. 8, p. 328-38, 2001. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/8-3/endotelio.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2018.

BLUMENTHAL, D.K.; GARRISON, J.C. Farmacodinâmica: mecanismos de ação dos fármacos. *In*: GOODMAN, L.S; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 12. ed. Porto Alegre: McGrallHill, 2012. p. 44.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas**. 2. ed. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/11/livro-pcdt-vol-ii-2014---.pdf>>. Acesso em: 9 maio 2017.

CARDOSO, T.A. *et al.* Impacto da asma no Brasil: análise longitudinal de dados extraídos de um banco de dados governamental brasileiro. **J Bras Pneumol**, vol. 43(3), p. 163-168, 2017.

Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v43n3/pt_1806-3713-jbpneu-43-03-00163.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2018.

DEVEREAUX, J. *et al.* Increasing Thyromimetic Potency through Halogen Substitution. **ChemMedChem**, v. 11, p. 2459-2465, nov. 2016. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.201600408/full>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

DIAS, R.G.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, M.H. Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular: Ativação Celular, Reatividade Vascular e Variante Genética. **Arq Bras Cardiol**, v. 96(1), p. 68-75, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abc/v96n1/v96n1a12.pdf>>. Acesso em: 14 maio 2018.

FRICKE, U., KLAUS, W., STEIN, B. Novel Halogenated Dihydropyridine Derivatives With High Vascular Selectivity. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 338 (4), p. 449-454, 1988. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/3244387/#affiliation-1>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–376, nov 1980. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/288373a0>>. Acesso em: 3 maio 2018.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention**. 2018. Disponível em: <<http://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>>. Acesso em: 26 abr. 2018.

GOMI, Y.; SHIRAHASE, H.; FUNATO, H. Effects of 1-(2-Chloro-4-Hydroxyphenyl)-*T*-Butyl-Aminoethanol (Hoku-81), a new bronchodilator, on isolated trachea and atria of guinea pig. **Japan. J. Pharmacol**, v. 29 (4), p. 515-524, 1979. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs1951/29/4/29_4_515/_article>. Acesso em 13 mar. 2018.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Contração e Excitação do Músculo Liso. *In*: _____. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 92-99.

HEIMLICH, E.M.; HARRIS, R.C.; SMITH, R.E. A double blind study of isoprophenamine in childhood asthma. **Ann Allergy**, v. 18(7), p. 774-777, 1960. Disponível em: <<https://eurekamag.com/research/029/645/029645509.php>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

HEIMLICH, E.M.; SMITH, R.E. Effects of isoprophenamine and methapyrilene in childhood asthma. **Ann Allergy**, v. 20(8), p. 517-522, 1962 Disponível em: <<https://eurekamag.com/research/024/580/024580575.php>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

MAXWELL, R.A.; ECKHARDT, S.B.; The Scientific Departure Leading to Propranolol: Dichloroisoproterenol (DCI). *In: _____*. **Drug Discovery: a casebook and analysis**. New York: Springer Science & Business Media, 1990. p. 6-11.

NELSON, H.S. β -Adrenergic Bronchodilators. **N Engl J Med**, v. 333, n. 8, p. 499-507, ago. 1995. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199508243330807>>. Acesso em: 26 abr. 2018.

OUEDRAOGO, N.; ROUX, E. Physiology of Airway Smooth Muscle Contraction: An Overview. **J Pulm Respir Med**, v. 4, p. 221, 2014. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/physiology-of-airway-smooth-muscle-contraction-an-overview-2161-105X.1000221.pdf>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

PAIVA, T.B.; FARIAS, N.C. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **Rev Bras Hipertens**, v. 12(2), p. 89-92, 2005. Disponível em: <[http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/Vol%2012%20\(2\)%202005.pdf](http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/Vol%2012%20(2)%202005.pdf)>. Acesso em: 12 maio 2018.

POWELL, C.E.; GIBSON, W.R.; SWANSON, E.E. The pharmacological action of 1-o-chlorophenyl-2-isopropylaminoethanol (isoprophenamine); a bronchodilator. **J Am Pharm Assoc**, v. 45(12), p. 785-7, 1956. Disponível em: <<https://dokumen.tips/documents/the-pharmacological-action-of-1-o-chlorophenyl-2-isopropylaminoethanol.html>> Acesso em: 17 maio 2018.

RIZZO, J.A. Broncodilatadores beta-adrenérgicos de longa duração: segurança, eficácia e indicações. **J Pneumol**, v. 23, 1997. Disponível em:

<http://www.jornaldepneumologia.com.br/audiencia_pdf.asp?aid2=223&nomeArquivo=1997_23_2_8_portugues.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2018.

SILVA, M.R. *et al.* Asymmetric chemoenzymatic synthesis of N-acetyl- α -amino esters based on lipase-catalyzed kinetic resolutions through interesterification reactions. **Tetrahedron**, v. 70(13), p. 2264-2271, apr 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402014001707#!>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

SOBIERAJ, D.M. *et al.* Association of Inhaled Corticosteroids and Long-Acting β -Agonists as Controller and Quick Relief Therapy With Exacerbations and Symptom Control in Persistent Asthma: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA**, v. 319, p. 1485-1496, mar. 2018. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2675737>>. Acesso em: 29 abr. 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. 2012. **J Bras Pneumol**, v. 38, supl.1, p. S1-S46, abr. 2012. Disponível em: <http://www.jornaldepneumologia.com.br/pdf/suple_200_70_38_completo_versao_corrigida_04-09-12.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2018.

WANG, R.I.H.; SHIPLEY, R.E. Evaluation of bronchodilator preparations with special reference to isoprophenamine, a new oral bronchodilator. **J New Drugs**, v. 3, p. 172-177, 1963. Disponível em: <<https://eurekamag.com/research/024/638/024638907.php>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

WATRAS, J.M. Músculo Liso. *In*: BERNE, R. M. **Fisiologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 269-286.

ANEXO

ANEXO 1 – Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará.



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

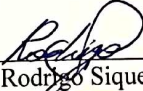
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**AValiação da Atividade Farmacológica do Análogo Cloridrato de (2,4-Diclofenil) -2-(Isopropilamino) Etanol Derivado da Clorprenalina [(R) – Cloridrato de Clorprenalina] em Aorta Isolada de Ratos**”, protocolo N°83/16, sob responsabilidade de Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de n° 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 13/09/2016.

Vigência do projeto	01/09/2016 a 01/09/2018
Espécie/Linhagem	Ratos heterogênicos/Wistar
N° de Animais	48
Peso/Idade	280-340g/ adultos
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734

Fortaleza, 14 de setembro de 2016


Rodrigo Siqueira
Coordenador do CEUA UFC