

RODRIGO MIGUEL MARIN

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO
DE DERIVADOS ANILINOQUINAZOLÍNICOS NA
ATIVIDADE DA ADENOSINA QUINASE**

CAMPINAS

Unicamp

2007

RODRIGO MIGUEL MARIN

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO
DE DERIVADOS ANILINOQUINAZOLÍNICOS NA
ATIVIDADE DA ADENOSINA QUINASE**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Clínica Médica, área de concentração em
Ciências Básicas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

CAMPINAS

Unicamp

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M338c	Marin, Rodrigo Miguel Caracterização do efeito inibitório de derivados anilinoquinazolínicos na atividade da adenosina quinase / Rodrigo Miguel Marin. Campinas, SP : [s.n.], 2007. Orientador : Kleber Gomes Franchini Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Adenosina. 2. HPLC. 3. Atividade enzimática. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

Título em inglês : Characterization of the inhibitory effects of anilinoquinazoline derivates on adenosine kinase activity

Keywords: • Adenosine
• HPLC
• Enzyme activity

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona
Profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski
Prof. Dr. Edson Antunes
Prof. Dr. Gonçalo Guimarães Pereira

Data da defesa: 12 - 12 - 2007

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

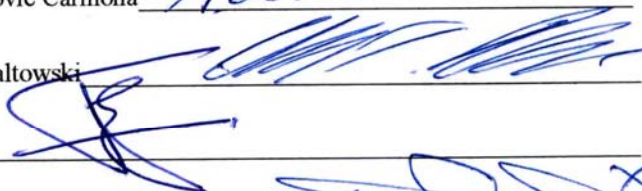
Orientador(a): Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) .Adriana Karaoglanovic Carmona



2. Prof(a). Dr(a). Alicia Juliana Kowaltowski



3. Prof(a). Dr(a). Edson Antunes

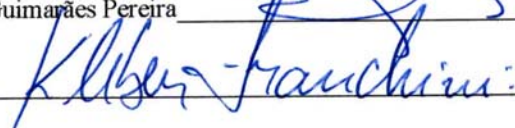


4. Prof(a). Dr(a)

Gonçalo Guimarães Pereira



5. Prof(a). Dr(a). Kleber Gomes Franchini



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 12/12/2007

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Mário Odilon e Maria Teresa e irmãs Daniela e Talita que sempre estiveram presente em todas as etapas de minha vida, mas principalmente à minha esposa Fernanda e à minha filha Maria Lívia, os meus maiores amores.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela confiança depositada em meu trabalho, pelo apoio, incentivo e ajuda profissional e intelectual que possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos técnicos Antônio Calixto, Jackeline de Lima e Thaís H. Theizen pela grande ajuda na realização dos experimentos e amizade.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, sempre dispostos a compartilhar as experiências profissionais e momentos de alegria e descontração, mas, sobretudo, à Dra. Silvana Aparecida Rocco, pelo grande auxílio, foste essencial para a realização deste trabalho, tanto pela ajuda nos experimentos, quanto pelo grande incentivo! Mas agradeço, principalmente, pela grande amizade. Que dure para sempre, pois tenho muito orgulho de ser seu amigo e poder conviver com sua alegria e exemplos de vida. Mais uma vez, muito obrigado.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo financiamento deste trabalho e de minha formação com a bolsa de Doutorado.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxiii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxvii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	31
2- OBJETIVOS.....	49
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4- RESULTADOS.....	73
5- DISCUSSÃO.....	103
6- CONCLUSÃO.....	113
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AK	Adenosina quinase
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CV	Coefficiente de variância (precisão)
DEV	Desvio da concentração nominal (exatidão)
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EGF	Fator de crescimento endotelial
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GMP	Guanosina monofosfato
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IMP	Inosina monofosfato
IPTG	Isoprípil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógeno
NAD	Nicotinamida adenine dinucleotídeo
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PDA	Arranjo de fotodiodos
PRPP	Fosforibosil-pirofosfato
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida sulfato dodecil sódico

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Variações inter-corridas cromatográficas (<i>inter-run</i>) - avaliação dos valores de precisão, exatidão e de linearidade das amostras de concentração de adenosina obtidas para cada curva padrão em seis experimentos diferentes.....	81
Tabela 2- Valores de concentrações do padrão nominal e calculada, de desvio padrão, de exatidão e de precisão intra- e inter-corridas, avaliados nas amostras dos controles de qualidade de adenosina.....	82
Tabela 3- Avaliação da estabilidade de adenosina em tampão TDM.....	84
Tabela 4- Valores de K_i dos compostos quinazolínicos sobre a atividade da adenosina quinase.....	90
Tabela 5- Variações inter-corridas cromatográficas (<i>inter-run</i>) - avaliação dos valores de precisão, exatidão e de linearidade das amostras de concentração de adenosina derivatizada obtidas para cada curva padrão em seis experimentos diferentes.....	94
Tabela 6- Valores de concentrações do padrão nominal e calculada, de desvio padrão, de precisão e de exatidão intra- e inter-corridas, avaliados nas amostras dos controles de qualidade de adenosina derivatizada.....	95
Tabela 7- Avaliação da estabilidade adenosina em amostras preparadas no tampão fosfato-citrato e após a derivatização com 2-cloroacetaldeído.....	97
Tabela 8- Valores representativos do perfil de adenosina de extratos de coração, fígado e cérebro de ratos controle (C) e tratados (T) com dose de 30mg/Kg de DMA.....	100
Tabela 9- Valores do perfil da concentração de adenosina de corações isolados de ratos controles e tratados com 100nM de DMA.....	101

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Estrutura química básica das purinas e de seus derivados, a adenina e guanina.....	34
Figura 2- Esquema representativo das vias de metabolização de adenosina no meio intracelular e extracelular.....	36
Figura 3- Representação esquemática da estrutura quaternária da adenosina quinase humana.....	41
Figura 4- Mecanismo de transferência do fosfato- γ do ATP para a hidroxila-5' da adenosina para formar o AMP.....	41
Figura 5- Estrutura química pirido, pirrolopirimidinas e 5-iodotubercidina.....	43
Figura 6- Estrutura básica da Quinazolina e de seus isômeros Cinolina e Quinoxalina.....	45
Figura 7- Estrutura química dos derivados de anilinoquinazolinas PD153035 e DMA.....	46
Figura 8- Estruturas químicas do anel quinazolínoico e de exemplos de compostos derivados de quinazolinas que exibem propriedades farmacológicas distintas.....	47
Figura 9- Esquema de reação de derivatização de adenil purina pelo 2-cloroacetaldeído.....	65
Figura 10- Esquema do sistema de perfusão de coração isolado e registro da pressão ventricular utilizado.....	69
Figura 11- Foto de gel de poliacrilamida para análise da expressão da enzima adenosina quinase recombinante AK-6XHis.....	76

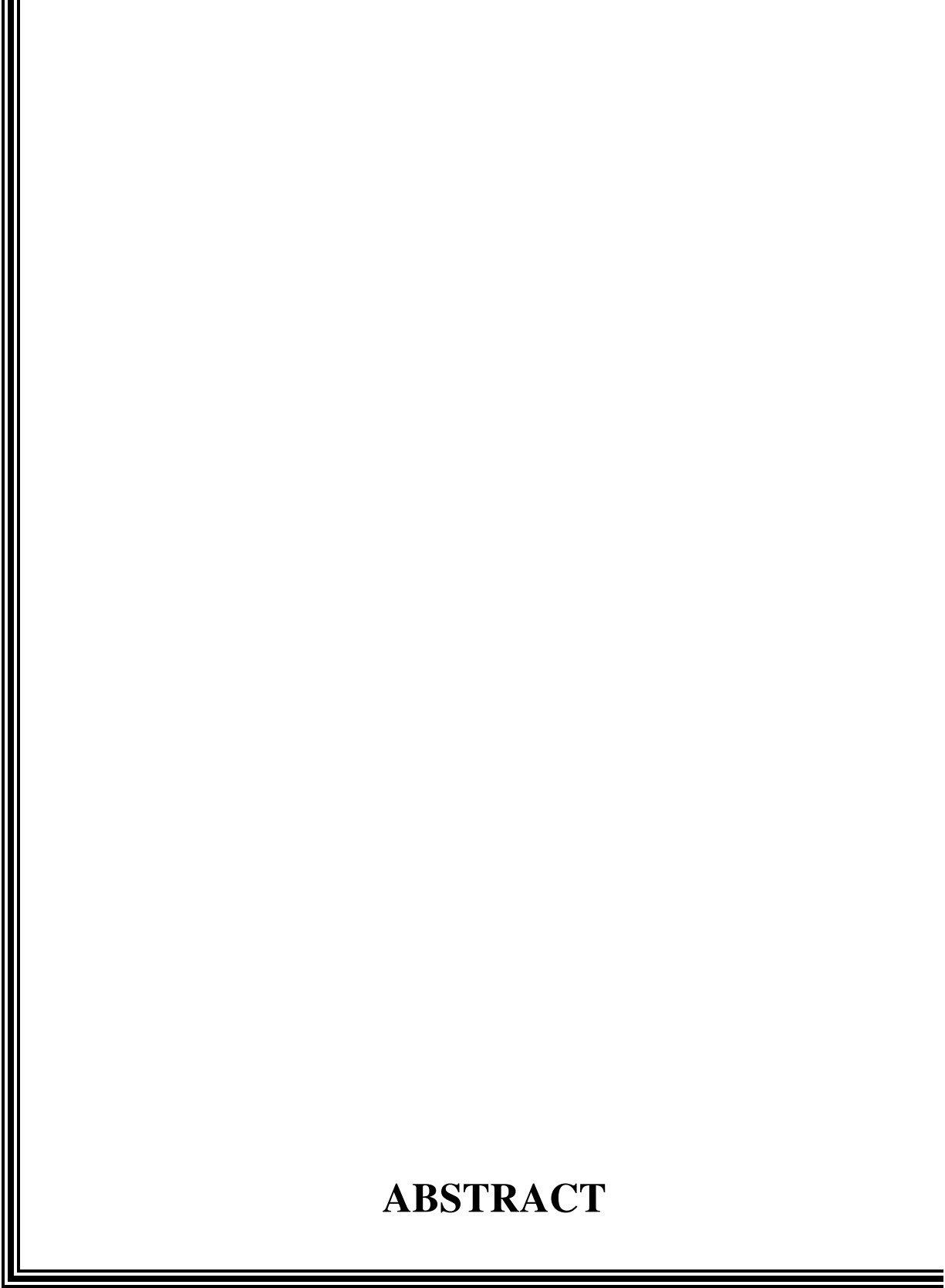
Figura 12-	Foto de gel de poliacrilamida 12%, obtido de SDS-PAGE contendo frações de eluição em experimentos de purificação da adenosina quinase recombinante.....	77
Figura 13-	Cromatogramas representativos da análise de amostra padrão de adenosina em tampão TDM pelo método de HPLC.....	79
Figura 14-	Gráfico representativo da curva de calibração obtida do valor nominal da concentração da solução padrão adenosina e da área dos picos de adenosina do cromatograma.....	80
Figura 15-	Cromatogramas representativos da análise, por HPLC, de adenosina de amostras controle e após a reação com a enzima adenosina quinase.....	86
Figura 16-	Gráfico representativo da dependência temporal (1, 2 e 3 minutos) do consumo de adenosina na reação da adenosina quinase.....	86
Figura 17-	Gráfico representativo da curva cinética da adenosina quinase	87
Figura 18-	Gráfico de concentração-resposta do composto 5-Iodotubercidina (5-IT) sobre a atividade da adenosina quinase.....	88
Figura 19-	Gráfico concentração-resposta dos compostos anilinoquinazolínicos DMA e PD153035 sobre a inibição da atividade da adenosina quinase.....	89
Figura 20-	Cromatogramas representativos das análises, por HPLC, do perfil dos derivados purínicos ATP, ADP, AMP e adenosina de extrato de coração de ratos controles.....	91
Figura 21-	Gráfico representativo da curva de calibração obtida do valor nominal da concentração da solução padrão de adenosina e da área dos picos de adenosina do cromatograma.....	92

Figura 22-	Cromatogramas representativos das análises, por HPLC, do perfil dos derivados purínicos ATP, ADP, AMP e adenosina de extrato de coração, fígado e cérebro de ratos controles.....	99
Figura 23-	Gráfico representativo do perfil de adenosina de coração, fígado e cérebro de ratos controle e tratados com DMA na dose de 30mg/Kg.....	100
Figura 24-	Gráfico representativo do perfil de adenosina de corações isolados de ratos controles e perfundidos com 100nM de DMA.....	102

RESUMO

A adenosina quinase tem um papel crítico no controle da disponibilidade tecidual de adenosina. Sua inibição provoca aumento da concentração local de adenosina, que, por sua vez, exerce efeitos em múltiplos aspectos da função celular. O desenvolvimento de bloqueadores farmacológicos da atividade da adenosina quinase tem, portanto, amplo potencial de aplicação terapêutica. O presente estudo foi planejado para caracterizar os efeitos inibitórios de derivados de 4-anilinoquinazolinas, **DMA** - cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(N,N'-3'-dimetilfenil)aminoquinazolina e **PD153035** - Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-bromofenil) aminoquinazolina na atividade da adenosina quinase, bem como sua ação sistêmica sobre a concentração de adenosina em órgãos e tecidos. Para avaliar a hipótese de inibição da adenosina quinase pelos compostos 4-anilinoquinazolínicos foram feitos ensaios *in vitro* com adenosina quinase recombinante (~42 kDa) clonada de fígado de camundongos. O ensaio para avaliar a atividade e a cinética da adenosina quinase recombinante constou de determinação do consumo de adenosina, obtido através de medidas da concentração de adenosina no meio com técnica de HPLC. Os estudos iniciais de cinética enzimática foram realizados sob condições saturantes, em relação ao substrato ATP, adicionado-se concentrações variadas de adenosina ao meio de reação. Nestas condições a reação foi ajustada ao modelo de Michaelis-Menten e os parâmetros K_m (Constante de dissociação que caracteriza a especificidade do substrato pela enzima) e V_{max} (Velocidade máxima da reação enzimática sob concentrações saturantes de substrato) utilizados para análise da cinética. Considerando-se o consumo de adenosina, os valores de K_m e V_{max} da adenosina quinase foram de $2,5 \pm 0,28 \mu M$ e $38 \pm 1,26 \text{ nmols/min}/\mu g$ de proteína, respectivamente. Experimentos realizados com o inibidor clássico de adenosina quinase, 5-Iodotubercidina, produziram inibição com IC_{50} de 100nM. Em seguida foram feitos experimentos *in vitro* para verificar os efeitos inibitórios dos compostos 4-anilinoquinazolínicos DMA e PD153035 na atividade da adenosina quinase. A avaliação da cinética enzimática na presença de várias concentrações de DMA e PD153035 permitiu confirmar a atividade inibitória desses compostos na adenosina quinase recombinante. Os valores de IC_{50} (a concentração do inibidor que exibe a metade do efeito inibitório máximo) foram de 0,8 nM e 1,2 pM para o PD153035 e DMA, respectivamente. Os valores de K_i (Constante de inibição) calculados com base nos valores de IC_{50} através da equação de Cheng-Prusoff foram estimados em 0,24 pM e 160 pM, para o DMA e o

PD153035, respectivamente. Confirmada a hipótese de que os compostos 4-anilinoquinazolínicos inibem a atividade da adenosina quinase *in vitro*, realizamos experimentos *in vivo* para avaliar se o DMA aumenta a disponibilidade de adenosina em coração, fígado e cérebro de ratos, bem como em corações isolados de ratos, em preparações de Langendorff. As dosagens de adenosina tecidual foram obtidas através de método baseado em HPLC. A análise revelou um aumento médio de 47% e 30% nos níveis de adenosina no coração e fígado, respectivamente, de ratos tratados por gavagem com DMA em relação aos controles. Nos experimentos de corações isolados, a análise das amostras mostrou um aumento médio de 64% da concentração de adenosina nos corações perfundidos com o composto em relação aos controles. **Conclusões:** Com base nos achados do presente estudo podemos concluir que 1) a adenosina quinase recombinante apresenta atividade enzimática *in vitro*; 2) os compostos derivados de 4-anilinoquinazolinas DMA e PD153035 inibem a atividade da adenosina quinase recombinante em baixas concentrações, sugerindo um efeito específico e 3) a administração sistêmica de DMA provocou aumento da disponibilidade de adenosina em tecidos e em órgão isolado de ratos, possivelmente em decorrência de inibição da atividade de adenosina quinase tecidual. Tendo em vista a importância dos efeitos da adenosina sobre o sistema biológico e a confirmação da potência e seletividade de compostos 4-anilinoquinazolínicos como inibidores de adenosina quinase, pode-se sugerir o potencial uso terapêutico desses compostos em doenças, cuja origem esteja relacionada com alterações da concentração de adenosina celular.



ABSTRACT

Adenosine kinase has a critical role in the control of bioavailability of tissue adenosine. Its inhibition increases the local concentration of adenosine that affects several aspects of cellular functions. The development of pharmacological agents with adenosine kinase inhibitory properties has attracted interest as a promising strategy for therapeutic application. The aim of the present work was to characterize the inhibition effects of 4-anilinoquinazolines derivatives, **DMA** – 4-*N*-(*N,N*-3'-dimethylphenylamino)-6,7-dimethoxyquinazoline hydrochloride and **PD153035** - 4-*N*-(3'-bromophenylamino)-6,7-dimethoxyquinazoline hydrochloride on adenosine kinase activity as well as its systemic actions on adenosine levels in tissues. To evaluate the hypothesis of adenosine kinase inhibition by 4-anilinoquinazoline compounds, we performed *in vitro* assays with recombinant adenosine kinase cloned from mouse liver (~42 KDa). The activity and enzymatic kinetic assay of recombinant adenosine kinase involved monitoring adenosine levels in the reaction mixture by HPLC. Adenosine kinase activity was assayed using saturated concentration of ATP and different concentrations of adenosine. Under these conditions, the reaction was adjusted for the Michaelis-Menten model and kinetics parameters (K_m and V_{max}) were determined. Considering the adenosine contents, the K_m and V_{max} values were $2.5 \pm 0.28 \mu M$ and $38.0 \pm 1.26 \text{ nmols /min/}\mu g$ of protein, respectively. Different concentrations of the standard inhibitor 5-iodotubercidin were used and the IC_{50} value obtained was 100 nM. *In vitro* enzymatic reactions were carried out to confirm DMA and PD153035 inhibitory effects on adenosine kinase activity. The kinetic reaction evaluation in presence of different DMA and PD153035 concentrations confirmed the inhibitory activity of these compounds on adenosine kinase. The IC_{50} values determined by the non-linear curve fitting program PRISM were 0.8 nM and 1.2 pM for PD153035 and DMA, respectively. The Cheng-Prusoff equation was used to calculate the K_i values from IC_{50} values, and they were estimated at 160.0 pM and 0.24 pM for PD153035 and DMA, respectively. We confirmed the hypothesis that the 4-anilinoquinazoline compounds have *in vitro* inhibitory effects on adenosine kinase activity. Then, we performed *in vivo* experiments to evaluate if DMA increases the adenosine levels in rat tissues such as heart, brain and liver as well as in the Langendorff preparations of isolated rat heart. An HPLC-based method was used to detect and quantify purine nucleoside adenosine and nucleosides derivatives in rat tissue samples. Adenosine levels in the heart and liver of rats

treated with DMA increased average of 47% and 30%, respectively, relative to controls. In experiments using isolated hearts, the sample analysis showed an average 64% increase of adenosine concentrations in the rat hearts perfused with DMA relative to control.

Conclusions: We conclude that 1) recombinant adenosine kinase presents enzymatic activity *in vitro*, 2) 4-anilinoquinazoline derivatives PD153035 and DMA inhibit the activity of recombinant adenosine kinase at low concentrations, suggesting a specific effect and 3) the systemic administration of DMA increases adenosine levels in tissues and isolated rat hearts, possibly due to inhibition of adenosine kinase activity. Considering the importance of adenosine effects on biological systems and adenosine kinase inhibition by 4-anilinoquinazoline compounds, a potential therapeutic use of these compounds in diseases related to cellular alterations of the adenosine levels is suggested.

1- INTRODUÇÃO

Doenças resultam, em geral, da interação complexa entre múltiplos fatores de natureza ambiental e genética. A influência patogênica dos diversos fatores se dá através de modificações de mecanismos de controle de funções celulares básicas. O melhor entendimento dos mecanismos moleculares específicos envolvidos na patogênese das doenças de maior frequência nos seres humanos (*e.g.* aterosclerose, hipertensão arterial, diabetes mellitus e neoplasias) resultou em avanços consideráveis na disponibilidade de agentes farmacológicos com utilidade terapêutica. No entanto, a despeito do grande avanço já alcançado no entendimento dos mecanismos moleculares de controle das funções celulares estima-se que sejam numerosos os mecanismos ainda desconhecidos. Assim, o esclarecimento de novos mecanismos moleculares deverá ter reflexo no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A eficiência e segurança dos agentes farmacológicos correlacionam-se, em geral, com sua especificidade de ação em moléculas que executam papel crítico no controle de funções celulares, cuja alteração contribui para o desarranjo estrutural e/ou funcional das células nos processos patológicos (Drews J, 2000; Zheng CJ et al., 2006). Estas moléculas, geralmente proteínas ou ácidos nucleicos, são definidas como alvos terapêuticos. Neste contexto, enzimas participam amplamente de processos metabólicos, sintéticos e de sinalização celular. O papel crítico das enzimas nas funções celulares deve-se à especificidade para substratos e também sua contribuição para o direcionamento e regulação das reações bioquímicas. Estas características, associadas ao grande número de vias bioquímicas intra e extra-celulares reguladas por processos catalisados por enzimas específicas, colocam essas proteínas como alvos potenciais para a ação de fármacos inibidores ou agonistas. É, portanto, crescente o interesse para o desenvolvimento de compostos orgânicos com propriedades inibitórias ou ativadoras enzimáticas que possibilitem o surgimento de novos agentes terapêuticos.

Pesquisas recentes desenvolvidas em nosso laboratório (Marin RM, 2003; Rolin Filho LA, 2005; Tornatore TF, 2006) demonstraram que uma classe de compostos químicos derivados de 4-anilinoquinazolininas tem efeitos sobre a função de corações isolados de ratos semelhantes àqueles da adenosina. Com base no fato conhecido de que a adenosina protege o miocárdio de isquemia (De Jong JW et al., 2000; Headrick JP et al., 2003; Donato M e Gelpi RJ, 2003; Quintana M et al., 2004) foi observado que tais compostos também protegem corações de ratos dos efeitos deletérios da agressão por isquemia/reperfusão

(Marin RM, 2003; Rolin Filho LA, 2005). Demonstrou-se que o efeito protetor de 4-anilinoquinazolininas foi abolido pela administração simultânea de inibidor inespecífico de receptores de adenosina, a sulfofenilteofilina (SPT). Com base nestes resultados e com base em informações disponíveis na literatura sobre o controle do metabolismo de purinas (Deussen A, 2000a; Mackiewicz M et al., 2003), suspeitamos que os referidos derivados de 4-anilinoquinazolininas tenham efeito inibitório na adenosina quinase.

1.1- Metabolismo de purinas

As purinas são compostos orgânicos aromáticos heterocíclicos e são formadas de um anel pirimidínico fundido a um anel imidazólico. Fazem parte, portanto, do grupo das bases nitrogenadas. A quantidade de purinas encontradas na natureza é enorme, visto que 50% das bases nitrogenadas encontradas nos ácidos nucleicos, a adenina e guanina (Figura 1), são purinas.

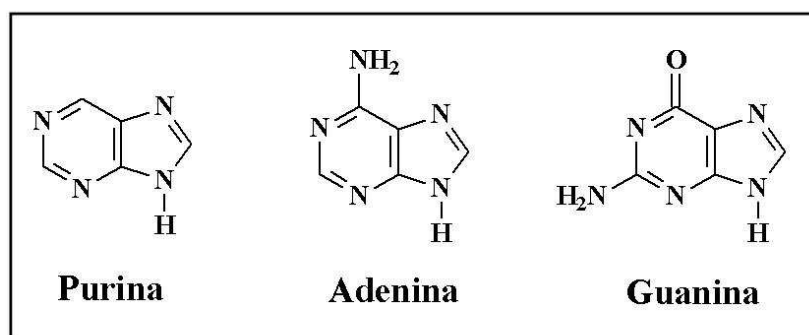


Figura 1- Estrutura química básica da purina e de seus derivados adenina e guanina.

Os nucleosídeos e nucleotídeos purínicos desempenham funções importantes em todas as células. São precursores do DNA e RNA, são transportadores essenciais de energia química (e.g. ATP) e são componentes dos cofatores NAD, FAD, S-adenosilmetionina e coenzima A, bem como de mensageiros celulares secundários, o AMP e GMP cíclico (Nelson DL, Cox MM, 2002).

A biossíntese e regulação de purinas no organismo são bem conhecidas e ocorrem principalmente no fígado. Existem dois tipos de vias que levam a formação do anel purínico: as vias de síntese “de novo” e as vias de salvamento ou recuperação. Na síntese “de novo” a estrutura do anel de purina é construída a partir do 5-fosforibosilpirofosfato (PRPP), derivado da ribose-5-fosfato, em um processo multienzimático de adição de átomos provenientes de aminoácidos (glutamina, glicina, aspartato), folato e CO₂, tendo como produtos finais o IMP (inosina monofosfato), o AMP (adenosina monofosfato) e o GMP(guanosina monofosfato). As vias de recuperação são mais simples, utilizando purinas livres (adenosina, guanina, hipoxantina), originadas da degradação metabólica dos nucleotídeos, as quais reagem com o PRPP para formar o nucleotídeo correspondente. Assim, a adenosina e outras bases purínicas são, em grande parte, recuperadas e empregadas novamente na síntese de nucleotídeos, mas uma outra porção, proveniente também da degradação de nucleosídeos dos ácidos nucléicos, assim como da própria alimentação, pode ser catabolizada em produtos de excreção final, o ácido úrico (Nelson DL, Cox MM, 2002).

A adenosina é encontrada no organismo tanto no meio intra quanto no meio extracelular (Fredholm BB, 2007). Um esquema das vias de metabolização da adenosina está representado na Figura 2. Existem duas principais vias de formação de adenosina no ambiente intracelular: a clivagem da S-adenosilhomocisteína pela enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase e, a degradação do AMP para adenosina por ação da 5'-nucleotidase citosólica, sendo esta a principal fonte de adenosina intracelular (Wagner et al., 1994). O fluxo de adenosina do meio intracelular para o extracelular ou vice-versa é feito, por difusão facilitada, através de transportadores especializados de nucleosídeos (Deussen A et al., 1999; Deussen A, 2000a; Borowiec A et al., 2006). Apesar da produção intracelular de adenosina (Lloyd HG et al., 1993), em condições fisiológicas, o equilíbrio entre as concentrações intra e extracelular é atingido principalmente pelo fluxo do meio extracelular para o intracelular, já que a adenosina é metabolizada em altas taxas por vias de metabolização de purinas intracelulares. As atividades da adenosina quinase, que fosforila a adenosina em AMP e da adenosina deaminase, que desamina a adenosina em inosina, são as principais responsáveis pelo alto consumo de adenosina intracelular (Deussen A et al., 1999).

basicamente restrita ao local onde é liberada, a adenosina é considerada como um autacóide [do grego *autos* – próprio e *akos* – alívio, cura].

Em consequência de sua concentração aumentar em resposta a agressões e de exercer efeitos protetores locais a agressões tissulares, a adenosina tem sido denominada de metabólito retaliatório (Newby AC, 1984). Este papel protetor é operado por pelo menos dois mecanismos distintos: 1), diminuição da demanda energética, por um efeito inibitório direto da função celular (e.g. efeito inotrópico negativo no miocárdio) e 2) mobilização de reservas locais de nutrientes (e.g. vasodilatação). Desta forma, a adenosina exerce efeitos protetores amplos em situações como aquelas representadas por agressão por isquemia/reperfusão e por agentes inflamatórios (Moyer JD et al., 2001; Cross HR et al., 2002; Chen Y e Bache RJ, 2003; Headrick JP et al., 2003; Conlon BA et al., 2005)

A adenosina exerce seus efeitos celulares através da ativação de receptores específicos, denominados receptores purínicos P1, que são classificados em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Ralevic V e Burnstock G, 1998; Fredholm BB et al., 2001; Klinger M et al., 2002; Burnstock G, 2007). Estes receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G.

Os receptores do tipo A₁ e A₃ são receptores de alta e baixa atividade para a adenosina, respectivamente, e ambos inibem a atividade da adenilato ciclase. Em contrapartida, os receptores de alta e baixa afinidade, A_{2A} e A_{2B}, respectivamente, ativam a adenilato ciclase. Além de regular a atividade desta enzima, os subtipos de receptores de adenosina são também acoplados a distintas proteínas G, atuando em outros sistemas efetores, incluindo canais de cálcio e potássio, fosfolipase C, -D, -A2, GMP cíclico, fosfodiesterases, e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Kaiser SM e Quinn RJ, 1999; Jacobson KA e Gao ZG, 2006). Assim, a resposta final mediada pela adenosina pode variar de acordo com o subtipo de receptor ativado.

A adenosina possui uma meia-vida nos fluidos biológicos na ordem de segundos, o que determina que seus efeitos sejam, em geral, localizados (Deussen A et al., 1999; Deussen A, 2000a, 2000b; Fredholm BB, 2007). A concentração basal de adenosina nos tecidos é na faixa de nanomolar. Em condições de estresse, como

por exemplo, trauma, isquemia ou hipóxia, choque séptico, as concentrações plasmáticas de adenosina podem aumentar drasticamente, chegando a atingir concentrações de micromolar (Hagber H et al., 1987). A variação da concentração extracelular de adenosina e a ativação de seus receptores exercem importante efeito sobre funções biológicas, incluindo a regulação da contração de músculos lisos, neurotransmissão, secreção exócrina e endócrina, na resposta imune e inflamatória, na agregação plaquetária, dor e modulação da função cardíaca (Liao Y et al., 2003; Krett NL et al., 2004; Jacobson KA e Gao ZG, 2006).

No coração, como citado anteriormente, a adenosina provoca efeitos como vasodilatação coronária, bradicardia e ativa mecanismos celulares envolvidos na proteção do miocárdio contra a agressão isquêmica, tanto aguda quanto tardia (Gross ER e Gross GJ, 2006). No entanto, o subtipo exato de receptor envolvido, o mecanismo de sinalização detalhado e a interação desses dois fatores no desenvolvimento de diversos fenômenos fisiológicos nesse órgão ainda são pouco conhecidos. Ainda como agente protetor das células miocárdicas, possui um papel inibitório de fatores neurohumorais, como angiotensina-II, endotelina-1, catecolaminas e fatores de crescimento, os quais sabidamente estão envolvidos na gênese da hipertrofia cardíaca (Villarreal F et al., 2003; Adair TH, 2005; Peart JN e Headrick JP, 2007). Já no cérebro, por exemplo, esse nucleosídeo atua como um mensageiro intercelular, envolvido em processos normais e fisiopatológicos como regulação do sono, neuroproteção, epilepsia e isquemia (Jacobson KA e Gao ZG, 2006; Boison D, 2007).

O fato de a adenosina ser um catabólito imediato dos nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP), a torna uma molécula sinalizadora adequada tanto para situações fisiológicas como patológicas, que resultem em degradação dos nucleotídeos de adenina. Dessa forma, todos os fenômenos biológicos que sofrem interferência da adenosina podem ser modulados por agonistas e antagonistas de seu receptor ou por compostos capazes de interferir na concentração de adenosina tecidual. Os agonistas do receptor de adenosina são amplamente estudados (Yan L et al., 2003), no entanto, têm um emprego terapêutico limitado em função de seus efeitos colaterais, em particular, hipotensão, bradicardia, efeito anti-diurético, que são conseqüências da interação ampla nos receptores distribuídos pelo organismo (Kowaluk EA et al., 1998; Kowaluk EA e Jarvis MF, 2000,

Jarvis MF et al., 2002). Da mesma maneira, a administração de adenosina exógena na terapia de doenças tem aplicação prática restrita. Administrada sistemicamente, a adenosina exerce efeitos cardiovasculares que limitam seu uso (Ross AM et al., 2005).

1.2- Adenosina quinase

A adenosina quinase (adenosina 5'-fosfotransferase, EC 2.7.1.20) é a quinase de nucleosídeos mais abundante nos tecidos de mamíferos, inclusive em seres humanos. Esta enzima catalisa a fosforilação de adenosina em AMP, utilizando como doador de fosfato o ATP ou GTP (Figura 3). Outra enzima envolvida na metabolização de adenosina é a adenosina desaminase (EC 3.5.4.4), a qual transforma a adenosina em inosina por uma reação de desaminação. Recentemente, evidências experimentais forneceram dados quantitativos sobre o metabolismo intracelular da adenosina e o papel crítico das enzimas adenosina quinase e deaminase no controle da disponibilidade desse nucleosídeo no ambiente citosólico (Deussen A, 2000a). Experimentos realizados com inibidores enzimáticos de adenosina quinase e adenosina deaminase indicam que o aumento da adenosina citosólica é maior na presença de inibição da atividade da adenosina quinase que na de adenosina deaminase (Golembiowska K et al., 1996), indicando que o fluxo de metabolização da adenosina pela via mediada pela adenosina quinase é maior que aquele mediado pela desaminase. De acordo com estes dados, a adenosina quinase possui valor de K_m para a adenosina de aproximadamente $1\mu\text{M}$ enquanto que a adenosina deaminase exibe valores de K_m consideravelmente maiores (Schutz W et al., 1981). Como a concentração de adenosina intracelular é estimada entre $0,01\text{-}0,1\mu\text{M}$, a adenosina quinase trabalha sempre abaixo de seu valor de K_m , evidenciando que a via de fosforilação tem um comprometimento maior com o metabolismo e regulação da disponibilidade de adenosina nos tecidos (Lloyd HG e Fredholm BB, 1995). A adenosina deaminase, por sua vez, tem um papel importante na via de metabolização, principalmente quando os níveis intracelulares de adenosina se elevam, decorrentes, por exemplo, do aumento da demanda energética no tecido. Portanto, estima-se que concentrações maiores de adenosina intracelular favoreçam mais a reação de desaminação, para a formação de inosina do que a de fosforilação. Essa redistribuição do fluxo metabólico da adenosina para a reação com a

adenosina deaminase é aumentada pelo fato de que a adenosina quinase é inibida em situações que cursam com altas concentrações de adenosina (Palella TD et al., 1980, Maj M et al., 2000). Sendo assim, a adenosina quinase desempenha uma função muito importante no controle fino da disponibilidade intracelular de adenosina, enquanto que a adenosina deaminase o faz no sentido de restabelecer as condições fisiológicas de concentrações elevadas de adenosina do ambiente celular. Como consequência, pequenas alterações na atividade da adenosina quinase resultam em grandes modificações dos níveis locais de adenosina (Gomtsyan A e Lee CH, 2004). Deste modo, a inibição farmacológica da adenosina quinase produz aumentos sensíveis nas concentrações intra e extracelulares de adenosina (Kowaluk EA et al., 1998; McGaraughty S et al., 2001; Jarvis MF et al., 2002)

A adenosina quinase é um monômero cuja estrutura (Figura 3) consiste de um grande domínio α/β com nove fitas β e oito α -hélices e um domínio α/β menor com cinco fitas β e duas α -hélices (Mathews II et al., 1998). O sítio ativo está localizado ao longo da margem da fita β no domínio α/β maior, sendo este o local onde a adenosina se acopla, enquanto o domínio α/β menor obstrui a face superior do sítio ativo e um outro sítio próximo recebe o ATP. Um sítio de ligação do magnésio localiza-se entre os sítios de ligação da adenosina e do ATP, sendo este íon fundamental para a catálise da adenosina quinase. A reação de transferência de fosfato parece ser iniciada pela desprotonação da hidroxila-5' de adenosina por um resíduo de ácido aspártico localizado na posição 316 (Figura 4) que atua como base catalítica, o que também sugere que o pH da reação deve ser acima de 6. Além disso, a transferência do grupamento fosfato acontece diretamente entre os dois substratos sem a interferência covalente da enzima.



Figura 3- Representação esquemática da estrutura quaternária da adenosina quinase humana, com duas moléculas de adenosina ligadas aos sítios catalíticos (Mathews II et al., 1998).

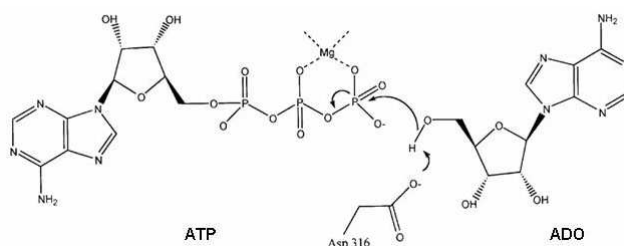


Figura 4- Mecanismo de transferência do fosfato- γ do ATP para a hidroxila-5' da adenosina para formar o AMP. O ácido aspártico 316 atua como uma base catalítica na desprotonação da hidroxila-5' de adenosina q. A figura foi baseada no dado cristalográfico de Mathews et al. (1998).

A primeira descrição da existência da adenosina quinase foi feita por Kornberg A e Pricer WE Jr. (1951) que demonstraram que extratos de leveduras eram capazes de metabolizar a adenosina, sugerindo a presença de uma enzima específica nesses extratos. Logo após, Caputto R (1951) descreveu a presença dessa enzima em células de mamíferos. No final da década de 70, Miller RL et al. e Andres CM et al. (1979) descreveram um processo de semi-purificação da adenosina quinase de fígado de coelho e placenta humana e também determinaram a especificidade de seus substratos, estabilidade e parâmetros cinéticos. No final da década de 80, os estudos das vias de metabolização de adenosina apontavam a importância da adenosina quinase para a regulação desse nucleosídeo no organismo. Lin BB et al. (1988), demonstraram que a atividade da adenosina quinase poderia ser regulada por compostos análogos da adenosina, surgindo assim as primeiras descrições de compostos inibidores da adenosina quinase. Mais recentemente, derivados pirrolo e piridopirimidínicos, bem como com análogos da adenosina mais potentes (e.g. aminoadenosina e iodotubercidina) foram descritos como inibidores da adenosina quinase (Cottam HB et al., 1993; Jarvis MF et al., 2000; Ugarkar BG et al., 2000; Cowart M et al., 2001; Lee CH et al., 2001; Gomtsyan A et al., 2004a).

1.3- Inibidores e efeitos farmacológicos da inibição da adenosina quinase

O desenvolvimento de inibidores específicos da adenosina quinase representa uma estratégia promissora para uso terapêutico (Kowaluk EA e Jarvis MF, 2000; McGaraughty S et al., 2001). Há dados experimentais indicando que a inibição da adenosina quinase tem efeito benéfico em situações de epilepsia, isquemia miocárdica, dor e processos inflamatórios (Cottam HB et al., 1993; Firestein GS et al., 1994; Gomtsyan A e Lee CH, 2004b; McGaraughty S et al., 2005 Boison D, 2006 e 2007). Assim, os inibidores de adenosina quinase são analgésicos potentes, anticonvulsivantes e antiinflamatórios.

Alguns estudos com inibidores nucleosídicos e não-nucleosídicos da adenosina quinase mostraram uma alta especificidade de interação com a enzima (Muchmore SW et al., 2006) e evidenciaram, *in vivo*, um aumento na ação endógena da adenosina em modelos animais de dor, inflamação e epilepsia (Golembiowska K et al., 1996; Boison D

et al., 1999; Ugarkar BG et al., 2000). Os derivados da tubercidina, como a 5-Iodo-Tubercidina (Figura 5), 5'-desóxi-5-iodo-tubercidina, foram considerados potentes inibidores competitivos, em relação ao sítio da adenosina, da adenosina quinase, com IC_{50} abaixo $0,01 \mu M$. No entanto, esses compostos apresentaram alto potencial citotóxico, uma curta meia-vida *in vivo*, baixa biodisponibilidade por via oral e pouca penetrabilidade celular (McGaraughty S et al., 2001; Ugarkar BG et al., 2003).

Por ser a adenosina quinase uma enzima exclusivamente citoplasmática, a absorção celular de inibidores é um fator crítico para seus efeitos *in vivo*. Nesse sentido, os inibidores não-nucleosídicos da adenosina quinase, representados pela classe das pirrolo e piridopirimidinas (Figura 5), demonstraram uma maior especificidade pela enzima, com melhor difusão em tecidos e células em relação aos derivados de tubercidina (Lee CH et al., 2001).

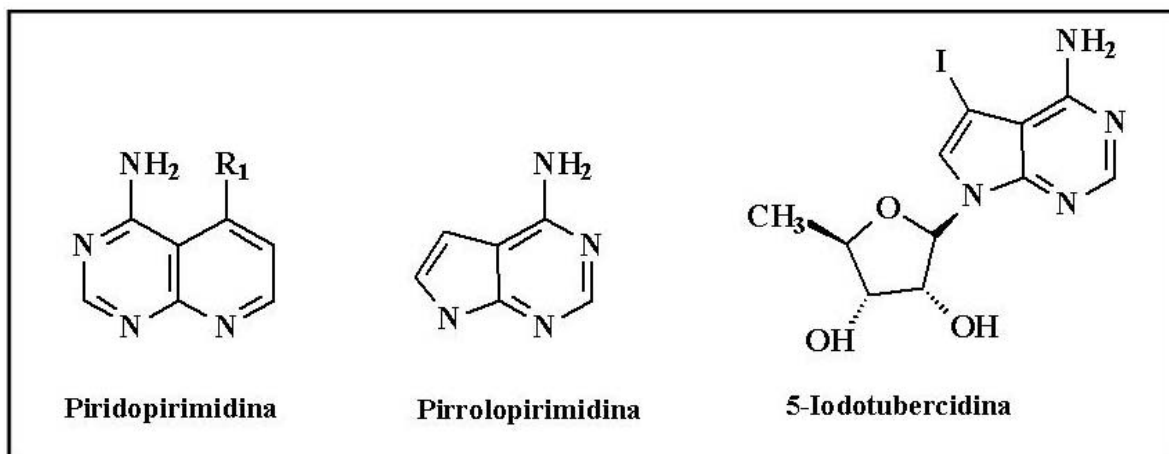


Figura 5- Estrutura química básica das piridopirimidinas, pirrolopirimidinas e da 5-Iodotubercidina.

O composto ABT-702 (classe das piridopirimidinas), por exemplo, apresentou alta potência ($ED_{50} = 0.7 \mu mol/Kg$) contra hiperalgesia em modelo experimental (Jarvis MF et al., 2000.). Em modelos experimentais de inflamação e dor, o ABT-702 se mostrou mais potente e com ação mais prolongada em comparação com a morfina ou antiinflamatórios não-esteroidais como o ibuprofeno (Kowaluk EA et al., 2000a;

Boyle DL et al., 2001). Modificações estruturais no anel piridopirimidínico permitiram a melhora da solubilidade, potência e maior resistência à degradação metabólica desses compostos (Zheng GZ et al., 2001; Gomtsyan A e Lee CH, 2004b).

1.4- Quinazolininas

Os derivados de 4-anilinoquinazolininas são amplamente descritos na literatura como inibidores potentes e seletivos da atividade tirosina quinase da família de receptores EGF (Fator de crescimento epidérmico) e apontados como uma estratégia atrativa no controle da proliferação tumoral (Fry DW et al., 1994; Rewcastle GW et al., 1995; Bridges AJ et al., 1996; Gazit A et al., 1996; Woodburn JR et al., 1996; Barker AJ et al., 2001; Ballard P et al., 2006). A quinazolina (Figura 6, Estrutura 1) é uma 1,3-benzodiazina com a mesma estrutura das bases pirimidínicas (uracila, timina e citosina) presentes nos ácidos nucleicos. O nome quinazolina (Alemão: Chinazoline) foi proposto devido a estes compostos serem isômeros com as cinolinas e quinoxalinas (Figura 6, Estrutura 2 e 3). Esses compostos foram descobertos há mais de 13 anos, sendo que a 6,7-dimetóxi-4-(*N*-3'-bromofenil)aminoquinazolina (PD153035) (Figura 7) foi o primeiro composto identificado como inibidor competitivo do ATP em células A-431 (Fry DW et al., 1994). Os numerosos estudos de relações estrutura-atividade (SAR) envolvendo várias séries de derivados quinazolinínicos conduziram a avanços na potência, especificidade e nas propriedades farmacocinéticas desses inibidores (Gazit A et al., 1996; Fry DW, 1999; Toledo LM 1999; Levitzki A, Raymond E et al., 2000). Os dados pré-clínicos (IC_{50} na ordem de $pmol.L^{-1}$) sustentam a possibilidade desses compostos serem usados na quimioterapia convencional como potenciais agentes antitumorais (Dutta PR e Maity A, 2007; Sartore-Bianchi A et al., 2007; Sequist LV, 2007). Por exemplo, os testes clínicos iniciados com o composto Iressa (ZD1839) para o tratamento de pacientes com câncer demonstraram inibição ativa quando administrado por via oral e com alta especificidade sobre as tirosinas quinases, sem afetar outras quinases (Ranson M e Wardell S, 2004). Atualmente, este último, ZD1839 (Iressa) (Barker AJ et al., 2001) e o CI1033 (Tarcerva) (Janne PA et al., 2007) já são comercializados como medicamentos para o tratamento de câncer de pulmão. O

conhecimento do processo de inibição de enzimas tirosina quinases parece ser o caminho para a terapia de muitas doenças, tais como câncer, “psoríasis”, diabetes, doenças cardiovasculares etc (Sadoshima J e Izumo S, 1997; Rapundalo ST, 1998; Kim SK e Novak RF, 2007). A partir dessa evidência, surgiram estudos mais detalhados sobre a função biológica de uma série de derivados dessa classe estrutural (Levitzki A e Gazit A, 1995; Takase Y et al., 1994; Toledo LM et al., 1999; Shewchuk L et al., 2000; Ukita T et al., 2001;

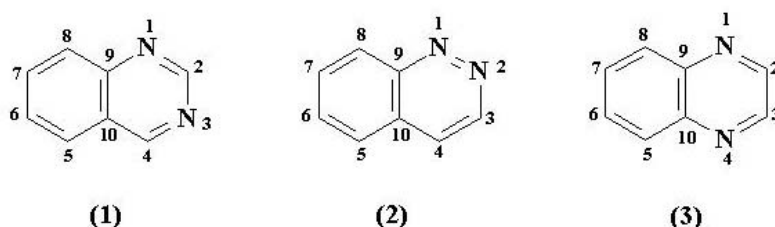


Figura 6- Estrutura básica da Quinazolina (1) e de seus isômeros Cinolina (2) e Quinoxalina (3).

Os estudos com derivados de quinazolininas não têm se limitado apenas à investigação da atividade da tirosina quinase da família do receptor EGF (Nomoto Y et al., 1990). Outros exemplos de compostos derivados de quinazolininas com propriedades farmacológicas distintas estão apresentados na Figura 8. O prazosin é uma quinazolina com propriedades antagonistas de receptores α 1-adrenérgicos (Bolognesi ML et al., 2001). Este composto tem efeito vasodilatador sendo utilizado na terapêutica anti-hipertensiva, assim como alguns de seus derivados estruturais como o ciclazosim, que possui uma afinidade maior para os receptores α 1-adrenérgicos e tem aplicação no tratamento da hiperplasia prostática benigna (Minarini A et al., 1998). A metaqualona (Ionescu-Pioggia M et al., 1988) faz parte da categoria de medicamentos sedativos/hipnóticos não-barbitúricos. Atualmente sabe-se que as metaqualonas possuem grande potencial de overdose e de vício, embora há alguns anos, a droga fosse considerada segura e incapaz de formar hábito. Somam-se a esta variada lista de propriedades

farmacológicas das quinazolininas, os antagonistas do receptor de serotonina (Ketanserina) (Glennon RA et al., 2002) e do ácido fólico (Trimetrexato) (Hempel A et al., 2000), diurético (Metalazona) (Rosenberg J et al., 2005) bem como, os já mencionados, inibidores de tirosina quinase (Tarcerva).

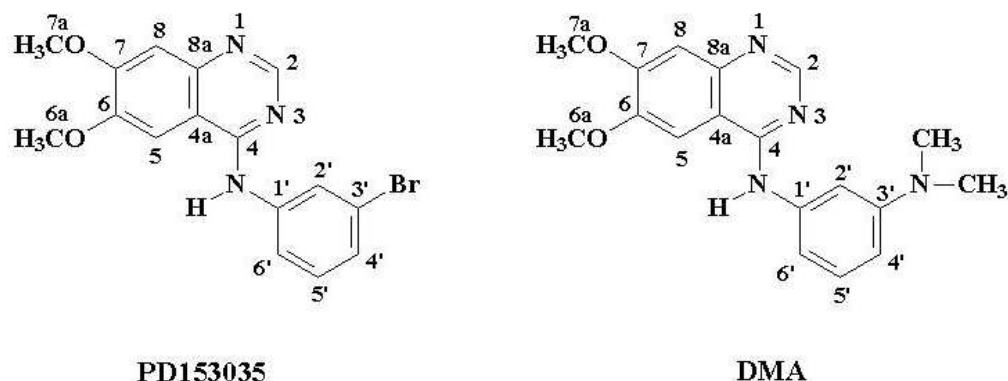


Figura 7- Estrutura química do cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-*N*-(3'-bromofenil)aminoquinazolina (PD153035) e do cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-*N*-(*N,N'*-3'-dimetilfenil)aminoquinazolina (DMA).

1.5- Justificativa

A disponibilidade de compostos 4-anilinoquinazolininas em nosso laboratório permitiu propor estudos com o intuito de avaliar seus efeitos farmacológicos e o possível uso terapêutico em diversas doenças. Nossos resultados iniciais, utilizando os derivados de 4-anilinoquinazolininas DMA e PD153035 (Figura 7), indicaram efeitos sobre a função de corações isolados de ratos semelhantes àqueles da adenosina (Marin RM, 2003).

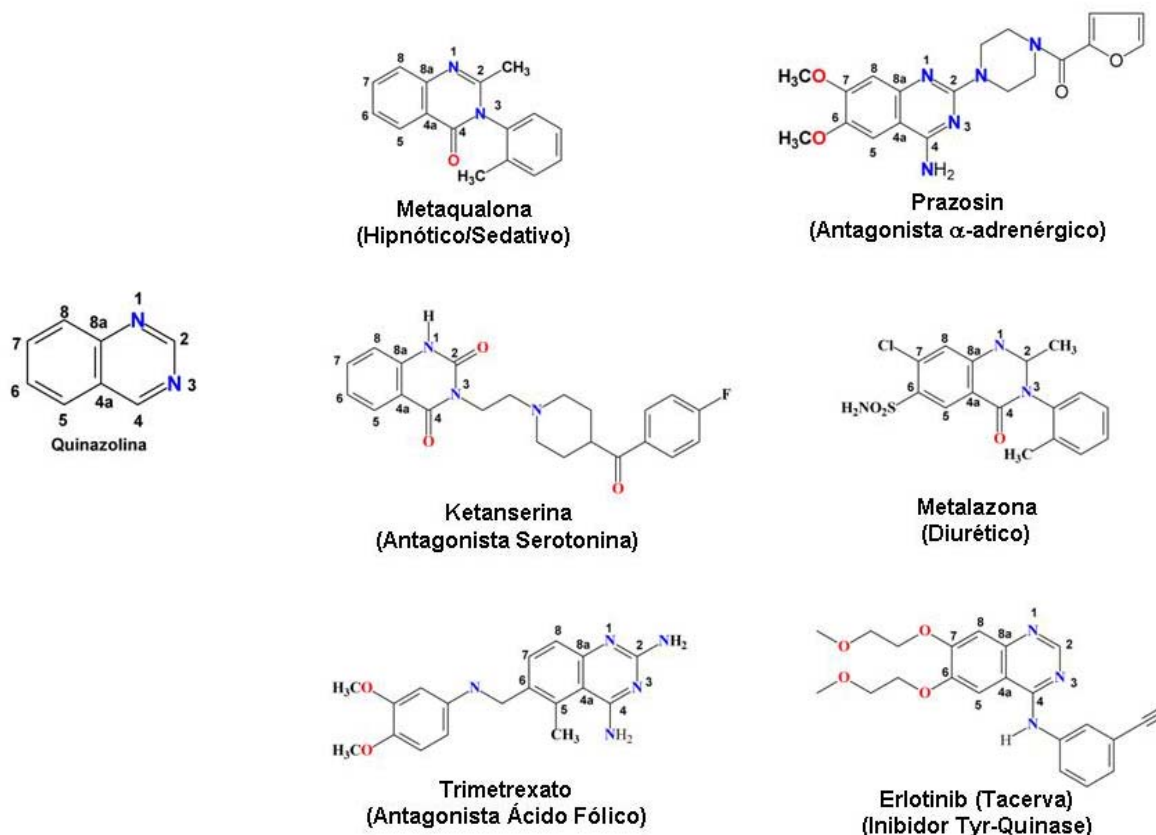


Figura 8- Estruturas químicas do anel quinazolínico e de exemplos de derivados de quinazolinas que exibem propriedades farmacológicas distintas.

Observamos que os compostos DMA e PD153035 provocam aumento da pressão sistólica do ventrículo de corações isolados e bradicardia, proporcional à dose utilizada (Marin RM, 2003). Através de experimentos realizados com frequência controlada, verificamos que o efeito pressor destes compostos é dependente de seu efeito bradicárdico. Este fenômeno ocorre neste tipo de preparação devido aos limites estreitos entre oferta e consumo de oxigênio de corações perfundidos com solução cristalóide (Marin RM, 2005). Com base no fato conhecido de que a adenosina protege o miocárdio de isquemia, foram realizados experimentos para avaliar o efeito de compostos quinazolínicos sobre a viabilidade miocárdica após agressão por isquemia/reperfusão. Em experimentos de isquemia-reperfusão de corações isolados de ratos, a infusão contínua do composto

quinazolínico protegeu o coração dos efeitos isquêmicos, mantendo, na reperfusão, os níveis de pressão sistólica e diastólica para aqueles observados no período de pré-isquemia. O bloqueio com o inibidor inespecífico da ação da adenosina em seus receptores, 8-sulfofenil-teofilina (8-SFT), aboliu completamente o efeito protetor do composto, indicando ser este efeito dependente de adenosina (Marin RM, 2003).

Assim, os estudos com a adenosina quinase *in vitro* são essenciais para confirmar esse possível novo efeito farmacológico de derivados 4-anilinoquinazolinas. Experimentos de cinética enzimática mais específicos, para a avaliação do efeito inibitório do DMA e do PD153035 sobre a atividade da adenosina quinase purificada, fornecerão dados sobre a especificidade e potência farmacológica das anilinoquinazolinas.

2- OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo:

Avaliar se os derivados de 4-anilinoquinazolinás são inibidores da adenosina quinase.

Objetivo Específico 1: Desenvolver e validar um método de HPLC para avaliar o consumo de adenosina na reação com a enzima adenosina quinase.

Objetivo Específico 2: Expressar e purificar a adenosina quinase recombinante e determinar seus parâmetros cinéticos enzimáticos de K_m e V_{max} , em relação ao substrato natural adenosina.

Objetivo Específico 3: Avaliar o efeito dos derivados de 4-anilinoquinazolina DMA e PD153035 sobre a atividade da enzima adenosina quinase.

Objetivo Específico 4: Desenvolver e validar um método de HPLC para a quantificação de adenosina em tecidos de ratos.

Objetivo Específico 5: Avaliar o efeito do derivado de 4-anilinoquinazolina DMA sobre os níveis de concentração de adenosina em tecidos de ratos.

Objetivo Específico 6: Avaliar o efeito do derivado de 4-anilinoquinazolina DMA sobre os níveis de concentração de adenosina em corações isolados de ratos.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Compostos 4-Anilinoquinazolínicos

Os compostos anilinoquinazolínicos **DMA** - cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-*N*-(*N,N*-3'-dimetilfenil)aminoquinazolina e **PD153035** - Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-*N*-(3'-bromofenil)amino-quinazolina – (Figura 7) foram sintetizados pela Dra Silvana Aparecida Rocco no Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

3.2- Expressão e purificação da adenosina quinase recombinante

A construção da adenosina quinase recombinante (adkpQe60) foi cordialmente cedida pelo Dr Detlev Boison do Laboratório de Neurobiologia Robert S Dow, Legacy Research, Portland, Oregon, EUA.. De acordo com os autores (Boison D et al., 1999), a construção foi obtida a partir de cDNA de fígado de camundongo, utilizando-se os pares de Primers 5'- CCAATGCATCCGAAGAACGTTGCTGC-3'(5'RACE) e 5'- GTGAACTCGAAGAGGCAGAGGACCG-3' (3' RACE) para amplificação em PCR. O produto de PCR foi digerido com a enzima EcoRV para obtenção de uma sequência de 1865 pares de base, a qual foi ligada ao vetor pBluescriptIIKS (Stratagene, La Jolla, CA) e sequenciado para confirmação no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). A sequência sub-clonada em plasmídeo pQE60, que contém cauda de histidina (6 x His), é homóloga à sequência da adenosina quinase humana, extraída de placenta e codifica proteína de 38,7 KDa (Gouder N et al., 2004).

Para expressão e obtenção da proteína adenosina quinase recombinante, a construção adkpQe60 foi inserida por eletroporação em bactéria de expressão *E. coli* M15[pREp4]. O mesmo foi feito com o plasmídeo pQE32 para controle negativo da expressão. Brevemente, as bactérias de expressão transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar-ampicilina para obtenção de colônias isoladas. Foi feito então um pré-inóculo das colônias em meio líquido LB-ampicilina, permanecendo em crescimento “overnight”, sob agitação, a 37°C. No dia seguinte verteu-se um pequeno volume (1-2 mL) do pré-inóculo em 500 mL de meio líquido de cultura LB-ampicilina e este incubado a 37°C por

aproximadamente 2 horas. A monitoração do crescimento ótimo das bactérias foi feita pela leitura da densidade óptica (OD), em espectrofotômetro (600nm), de pequenos volumes retirados de hora em hora do meio. Atingida a OD de 0,5-0,6 (representativo de crescimento ótimo bacteriano), a temperatura de incubação foi reduzida para 25°C e adicionado 1mM de IPTG (agente indutor) pra indução da expressão da proteína recombinante, permanecendo por mais 5 horas sob agitação. Após esse tempo, o meio de cultura foi então resfriado em banho de gelo a 4°C e centrifugado à 5000 rpm por 10 minutos para separação do pellet bacteriano. Toda comprovação da indução e expressão da proteína foi obtida por eletroforese de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% de amostras resultantes de cultura bacteriana não induzidas e induzidas com IPTG. A proteína recombinante expressa em *E. coli* apresentou-se na forma solúvel após a lise da célula bacteriana.

A purificação das proteínas que possuem cauda de histidina (6 x His) foi feita em condições nativas, ou seja, sem desnaturação, por cromatografia de afinidade, utilizando coluna HisTrap HP, 5 mL (Amersham Biosciences, Sweden). Todos os passos da purificação foram feitos a 4°C. O pellet de bactérias obtido por centrifugação do caldo de cultura foi suspenso em tampão fosfato (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 3mM imidazol, pH 8,0) adicionado de lisozima (100 µg/mL) e pepstatina (10 µg/mL). Após 30 minutos, procedeu-se a lise das células de *E. coli* da suspensão com seis ciclos intercalados de congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento a 40°C em banho-maria. Após essa etapa, o lisado foi submetido à sonicação e, então, centrifugado a 30.000xg por 30 minutos. O sobrenadante límpido foi passado em 5 mL de coluna His Trap HP, 5 mL (Amersham Biosciences, Sweden), pré-equilibrada com tampão fosfato. A coluna foi lavada com cinco volumes de tampão fosfato acrescido de 3mM de imidazol e dois volumes de tampão fosfato acrescido de 50mM de imidazol. A proteína retida foi eluída com tampão fosfato acrescido de 150 mM de imidazol e as frações coletadas foram dialisadas em tampão TDM (Tris HCl 100mM, MgCl₂ 0,8mM, β-mercaptoetanol 2mM, pH 7,4) e armazenadas a -80°C com 20% de glicerol.

3.3- Método de detecção de adenosina por HPLC

3.3.1- Reagentes

Todos os solventes e reagentes usados nesse estudo atendiam ao grau de pureza para HPLC. Adenosina Calbiochem (1160, Darmstadt, Germany), Adenosina 5'-trifosfato Sigma (A-7699, Steinheim, Germany), Acetonitrila Tedia (AS-1122, São Paulo, Brasil), Tris hidroximetil aminometano (Calbiochem, Steinheim, Germany), $MgCl_2$ heptahidratado (Merck, Steinheim, Germany), β -mercaptoetanol (M-6250, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

3.3.2- Condições Cromatográficas

Para determinar a atividade cinética da enzima adenosina quinase purificada, optamos por desenvolver e validar um método de HPLC para detecção de adenosina. As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento Alliance série Waters 2695 (Milford, Mass, USA), equipado com bomba quaternária, injetor e desgaseificador automáticos, e detector de absorvância (PDA) série Waters 2996. O comprimento de onda de absorvância máxima usado para a detecção do nucleosídeo foi de 260nm. A separação de adenosina foi realizada à temperatura de 25°C, utilizando coluna de fase reversa OmniSpher C18 (250 mm x 4.6 mm de diâmetro interno e 5 μ m de tamanho de partículas) protegida com uma pré-coluna ChromoSep SS (10 mm x 3 mm) (ambas obtidas da Varian, CA, USA). A fase móvel usada para promover a separação cromatográfica foi composta de 7% de acetonitrila e 93% água Milli-Q. A fase móvel foi preparada diariamente e filtrada em um sistema a vácuo através de um filtro de 0,45 μ m (Millipore, Milford, Mass, USA). A coluna foi equilibrada e eluída sob condições isocráticas, utilizando uma faixa de fluxo de 0,8 mL/min. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 8 minutos.

O controle do sistema, a aquisição e o processamento dos dados foram realizados através de um computador PC-Pentium IV da Dell, que operou com o programa Microsoft Windows XP Professional versão 2003 e com o programa cromatográfico Empower 2002.

3.3.3- Validação do método cromatográfico

O método de HPLC para determinação de adenosina na reação cinética da adenosina quinase foi validado em relação ao limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), linearidade, controles de qualidades, precisão (CV) e reprodutibilidade e/ou exatidão (DEV).

3.3.4- Preparo da solução padrão

A solução estoque de adenosina foi preparada pela dissolução de 2,70 mg em 1 mL de tampão TDM (Tris-HCl 100mM pH 7,4, MgCl₂ 0,8mM e β-Mercaptoetanol 2mM), obtendo a concentração de 10mM. A partir desta solução, diluições seriadas, em tampão TDM, geraram as seguintes amostras usadas para preparar os pontos da curva de calibração: 0,10 (LOD); 0,25 (LOQ); 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 10,00; 25,00; 50,00 e 100,00 μM. Estes padrões de calibração foram preparados em triplicatas. Grupos de amostras de controles de qualidade (CQs) também foram preparados, independentemente, em valores de concentrações de 0,25 (LOQ), 2,70; 9,00; 45,00 e 90,00 μM. No entanto, estes controles de qualidade foram preparados a partir de uma solução estoque diferente (pesagem separada de adenosina) daquela usada para gerar as amostras da curva padrão. Estas amostras foram utilizadas para monitorar as variações *intra*- e *inter*-corridas analíticas.

3.3.5- Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estabelecidos a partir da análise das áreas dos picos dos cromatogramas e calculados como sendo as concentrações em que o pico de adenosina se apresentava com valores 3 vezes e 10 vezes maior do que o ruído da linha base, respectivamente.

3.3.6- Linearidade da curva de calibração

Para determinar a linearidade da curva de calibração, foram analisadas as amostras do padrão nominal de adenosina e feito um gráfico com o valor da área do sinal obtido no cromatograma contra o valor de concentração (μM) do padrão nominal correspondente. A reta foi construída pela análise de regressão linear, utilizando programa Prisma GraphPad (Versão 4.0, GraphPad Software, Inc).

3.3.7- Precisão e reprodutibilidade

Toda a avaliação correspondente a este item foi baseada de acordo com o manual de validação publicado pelo FDA (US Department...2001). A reprodutibilidade e precisão do método foram avaliadas em função do desvio percentual relativo (DEV), em relação à concentração nominal, e pelo valor do coeficiente de variância (CV) de cada ponto da curva de calibração. A precisão (CV) e reprodutibilidade (DEV) foram calculadas de acordo com as fórmulas 1 e 2, respectivamente.

$$\text{C.V. (\%)} = \left(\frac{\text{DP}}{\text{Média concentração calculada}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{DEV (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Média concentração calculada}}{\text{Concentração nominal}} \right) \times 100 \quad (2)$$

DP – desvio padrão da média.

3.3.8 – Estabilidade

A estabilidade da adenosina, em tampão TDM, foi testada considerando as concentrações de 2,70; 9,00; 45,00 e 90,00 μM , em quadriplicatas. Foram realizados os procedimentos seguintes:

Dois ciclos consecutivos de congelamento-descongelamento, sendo que as amostras foram mantidas à temperatura ambiente (25°C) antes de cada congelamento.

As amostras de adenosina, em tampão, foram mantidas a 25°C por 6 horas e, então, analisadas.

A estabilidade de adenosina foi determinada após 24 horas de permanência no carrossel do HPLC, em uma temperatura de 25°C. Este período foi superior àquele utilizado em uma corrida analítica completa.

3.4- Avaliação temporal do consumo de adenosina pela adenosina quinase

A atividade da adenosina quinase recombinante purificada foi avaliada por método de HPLC, conforme as condições cromatográficas descritas no item 3.2.2. Todos os ensaios foram feitos à 37°C, em um volume final de 1 mL. A reação foi feita em tampão TDM (100 mM de Tris-HCl, 0.8 mM de MgCl_2 e 2 mM de β -mercaptoetanol, pH 7,4) e continha 0,8 mM de ATP, 10 μM de adenosina e $\sim 0,1$ μg de adenosina quinase purificada. A reação foi iniciada após a adição de adenosina e ATP à mistura e, após 1, 2 e 3 minutos, paralisada por aquecimento em banho-maria à 90°C, durante 2 minutos. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e, em seguida, filtradas por centrifugação a 14.000 rpm, em sistema de filtro Microcon YM-3 (Millipore Corporation, USA). Logo após, 25 μL do filtrado foram injetados no sistema de cromatografia líquida. A atividade da adenosina quinase foi avaliada de acordo com o consumo ou redução da área do pico de adenosina obtido no cromatograma. Foram realizadas triplicatas para cada tempo de reação e os dados foram obtidos de três experimentos realizados em dias diferentes.

3.4.1- Análise dos dados

Para a avaliação curso temporal do consumo de adenosina pela adenosina quinase, foi feito um gráfico com o valor de concentração (μM) de adenosina (eixo y) das amostras no tempo zero e nos tempos de 1, 2 e 3 minutos (eixo x) após reação com a AK. A curva foi construída pela análise de regressão não-linear, utilizando programa Prisma GraphPad (Versão 4.0, GraphPad Software, Inc).

3.5- Determinação dos parâmetros cinéticos da adenosina quinase recombinante, K_m e V_{max} , em relação ao substrato adenosina.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da adenosina quinase em relação ao substrato adenosina, as concentrações de ATP e enzima foram mantidas constantes, enquanto que a concentração de adenosina foi variada. A reação foi feita em 1 mL de tampão TDM (100 mmol L^{-1} de Tris-HCl, 0.8 mmol L^{-1} de MgCl_2 e 0.8 mmol L^{-1} de β -mercaptoetanol, pH7,4) e continha $\sim 0,1 \mu\text{g}$ de adenosina quinase purificada. As concentrações de adenosina utilizadas no experimento foram: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0 μM . A reação foi iniciada com a adição de adenosina e 0,8 mM de ATP e, após 1 minuto, bloqueada por aquecimento em banho-maria à 90°C , durante 2 minutos. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e, em seguida, filtradas por centrifugação a 14.000 rpm, em sistema de filtro Microcon YM-3 (Millipore Corporation, USA). Logo após, 25 μL do filtrado foram injetados no sistema de cromatografia líquida. Foram realizadas triplicadas para cada concentração de adenosina testada e os dados foram obtidos de três experimentos realizados em dias diferentes.

3.5.1- Análise dos dados

Para a avaliação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} , foi feito um gráfico com o valor das velocidades iniciais de reação da adenosina quinase (nmoles de adenosina/minuto/ μg de enzima) (eixo y) contra os respectivos valores de concentração inicial de adenosina (μM) (eixo x). A curva foi construída pela análise de regressão não

linear, baseado em um modelo de equação de Michaelis-Menten fornecido pelo programa Prisma GraphPad (Versão 4.0, GraphPad Software, Inc).

3.6- Avaliação da inibição da atividade da adenosina quinase recombinante.

Inicialmente, para a avaliação da inibição da atividade da adenosina quinase, foram feitos ensaios utilizando o inibidor clássico da sua atividade, 5-Iodotubercidina (5-IT). A reação foi feita em tampão TDM (100 mmol L^{-1} de Tris-HCl, 0.8 mmol L^{-1} de MgCl_2 e $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -mercaptoetanol, pH 7,4), contendo aproximadamente $0,1 \text{ }\mu\text{g}$ de adenosina quinase purificada. Essa mistura foi previamente incubada, durante 5 minutos, com DMSO (veículo) ou com o inibidor 5-IT, em concentrações variando de 300 pM a $10 \mu\text{M}$. Findo este tempo, a reação foi iniciada após a adição de $10 \text{ }\mu\text{M}$ de adenosina e $0,8 \text{ mM}$ de ATP à mistura. Após 1 minuto, a reação foi bloqueada por aquecimento em banho-maria à 90°C , durante 2 minutos. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e, em seguida, filtradas por centrifugação a 14.000 rpm , em sistema de filtro Microcon YM-3 (Millipore Corporation, USA). Logo após, $25 \text{ }\mu\text{L}$ do filtrado foram injetados no sistema de cromatografia líquida. Foram realizadas triplicadas para cada concentração de inibidor testada e os dados foram obtidos de três experimentos realizados em dias diferentes.

Finalmente, foram feitos ensaios enzimáticos na presença dos compostos quinazolínicos DMA e PD153035. Neste caso, a mistura reacional foi previamente incubada, durante 5 minutos, com DMSO (veículo) ou com DMA ou PD153035, em concentrações variando de 100 fM a $1 \mu\text{M}$. A reação com a adenosina quinase e o tratamento das amostras para análise em HPLC seguiu as mesmas condições descritas acima. Também foram realizadas triplicatas para cada concentração de DMA ou PD153035 testada e os dados foram obtidos de três experimentos feitos em dias diferentes.

3.6.1- Análise dos dados

As curvas de concentração-efeito (efeito de inibição da atividade da adenosina quinase) da 5-IT e dos compostos quinazolínicos DMA e PD153035 foram obtidas em relação a porcentagem de inibição da atividade da adenosina quinase na presença do

inibidor (eixo *y*) contra o logaritmo da concentração do inibidor (eixo *x*). A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros E_{max} , $\log IC_{50}$ e coeficiente angular foi obtida utilizando-se o programa Prisma GraphPad (Versão 4.0, GraphPad Software, Inc). A equação de Cheng-Prusoff (Cheng Y e Prusoff WH, 1973) foi usada para o cálculo de K_i , o qual deriva-se do IC_{50} .

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[ADO]}{K_m(ADO)}}$$

3.7- Método de detecção de adenosina em tecidos de ratos por HPLC

3.7.1- Reagentes

Todos os solventes e reagentes usados nesse estudo atendiam ao grau de pureza para HPLC. Adenosina (Calbiochem, Darmstadt, Germany), adenosina 5'-trifosfato, adenosina 3', 5'-difosfato, adenosina 3' monofosfato, 2-cloroacetaldeído K_2HPO_4 , ácido cítrico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), metanol (Tedia Company, USA).

3.7.2- Condições Cromatográficas

Optamos novamente em desenvolver e validar um método de HPLC para detecção de adenosina em tecidos de ratos. As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento Alliance série Waters 2695 (Milford, Mass, USA), equipado com bomba quaternária, injetor e desgaseificador automáticos, e detector de fluorescência série Waters 2475. Nesse método, foi introduzida uma etapa de derivatização dos derivados de adenina, utilizando o reagente derivatizante 2-cloroacetaldeído (Katayama M et al., 2001) A reação da adenina e de seus compostos correlatos (ATP, ADP, AMP e adenosina) com 2-cloroacetaldeído produziu os derivados N^7,N^6 -etenopurínicos, que são altamente fluorescentes. Os detalhes dos procedimentos para a reação de derivatização desses compostos serão descritos mais adiante. Os comprimentos de onda para a excitação e

emissão foram 280/420 nm para os derivados N^I, N^6 -etenopurínicos (ATP, ADP, AMP e adenosina) após a derivatização com 2-cloroacetaldeído. A separação dos compostos foi realizada, à temperatura ambiente, em uma coluna cromatográfica de fase reversa Cosmosil 5C18-MS (150 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m de tamanho das partículas) protegida com uma pré-coluna (Cosmosil 5C18-MS 10 x 4,6 mm) (ambas adquiridas da Phenomenex). A fase móvel usada para promover a separação cromatográfica foi composta por K_2HPO_4 (50 mmol L⁻¹), ácido cítrico (25 mmol L⁻¹) em pH 4,5 e de metanol, preparada diariamente e filtrada em um sistema a vácuo através de um filtro de 0,45 μ m (Millipore, Milford, Mass, USA). A coluna foi eluída com uma solução gradiente em um fluxo de 1.0 mL/min. O gradiente foi o seguinte: fase isocrática em 2% de metanol por 4 minutos, 15% de metanol por 12 minutos e, finalmente, 2% de metanol por 4 minutos para voltar às condições iniciais. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 20 minutos. O controle do sistema, a aquisição e o processamento dos dados foram realizados através de um computador PC-Pentium IV da Dell, que operou com o programa Microsoft Windows XP versão 2003 e com o programa cromatográfico Empower 2002.

3.7.3- Derivatização de compostos de adenina

O objetivo desse estudo é a análise do perfil de adenosina nas amostras de tecidos de animais controles e tratados com o composto DMA. O processo de extração também recupera os outros derivados purínicos ATP, ADP, AMP, que também apresentam excelente afinidade pelo tampão de extração e, portanto, são também derivatizados. Para a obtenção de derivados N^I, N^6 -etenopurínicos (Figura 9), foram adicionados 10% de 2-cloroacetaldeído (v/v) à solução aquosa de amostras de tecidos contendo os nucleosídeos ATP, ADP, AMP e adenosina. A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 80°C por 20 minutos, sendo a reação bloqueada por imersão do frasco de reação em banho de gelo.

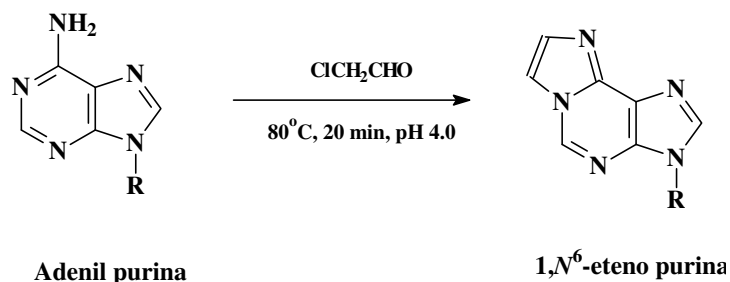


Figura 9- Esquema de reação de derivatização de adenil purina pelo 2-cloroacetaldeído.

3.7.4- Validação do método cromatográfico

O método de HPLC para a quantificação de adenosina em tecidos de ratos foi validado em relação aos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), linearidade, controles de qualidades, precisão (CV) e exatidão (DEV%). O processo de extração também recupera os outros derivados purínicos ATP, ADP e AMP. No entanto, os dados de validação apresentados no método se referem à adenosina.

3.7.5- Preparo das soluções padrão

As soluções estoques de adenosina (2,70 mg) foram preparadas, independentemente em duplicatas, pela dissolução em uma solução aquosa de K_2HPO_4 (50 mM) e ácido cítrico (25 mM) e pH 4.5, para se obter uma concentração de 10 mM de cada. O tampão fosfato-citrato foi usado para diluir as soluções estoques dos nucleosídeos para uma concentração de trabalho de 10,00 μM . A partir da solução de 10,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, diluições seriadas geraram as seguintes amostras usadas para preparar os pontos da curva de calibração: 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.250, 0.500, 1.000 e 3.000 μM . Estes padrões de calibração foram preparados em triplicatas. Grupos de amostras de controles de qualidade (CQs) também foram preparados, independentemente, em valores de concentrações de adenosina de 0.031, 0.060, 0.200, 1.500 e 2.500 μM . No entanto, estes controles de qualidade foram preparados a partir de uma solução estoque diferente (pesagens separadas de adenosina) daquela usada para gerar as amostras da curva padrão. Estas amostras foram utilizadas para monitorar as variações *intra*- e *inter*-corridas analíticas.

3.7.6- Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estabelecidos a partir da análise das áreas dos picos dos cromatogramas e calculados como sendo as concentrações em que o pico de adenosina se apresentava com valores de 3 vezes e 10 vezes maiores do que o ruído da linha base, respectivamente.

3.7.7- Linearidade da curva de calibração

Para determinar a linearidade da curva de calibração, foram analisadas amostras padrões de adenosina e foram feitos gráficos com os valores de concentrações do padrão nominal (μM) contra os valores correspondentes das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas. A reta foi construída pela análise de regressão linear, utilizando o programa Prisma GraphPad (Versão 4.0, GraphPad Software, Inc).

3.7.8- Precisão e reprodutibilidade

Toda a avaliação correspondente a este item foi baseada de acordo com o manual de validação publicado pelo FDA (US Department...2001). A reprodutibilidade e precisão do método foram avaliadas em função do desvio percentual relativo (DEV), em relação à concentração do padrão nominal, e pelo valor do coeficiente de variância (CV) de cada ponto da curva de calibração. A precisão (CV) e a reprodutibilidade (DEV) foram calculadas de acordo com as fórmulas 1 e 2 (ver Material e Métodos 3.3.7), respectivamente.

3.7.9- Estabilidade

A estabilidade do derivatizado de adenosina, em tampão fosfato-citrato, foi testada considerando as concentrações de 0.125, 0.250, 0.500 e 1,500 μM , em quadruplicatas. Foram realizados os procedimentos seguintes:

- Estabilidade a curto prazo e tempo de permanência no auto-amostrador

As amostras de adenosina, em tampão, foram mantidas a 25°C por 4 horas e, então, analisadas.

A estabilidade de adenosina foi determinada após 24 horas de permanência no carrossel do HPLC, em uma temperatura de 25°C. Este período foi superior àquele utilizado em uma corrida analítica completa.

3.8- Avaliação do efeito do DMA sobre o perfil de adenosina de tecidos de ratos.

3.8.1- Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 200-250 g fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

3.8.2- Gavagem de ratos

Os ratos, submetidos ao jejum de 12 horas antes do experimento, foram colocados individualmente em gaiolas e receberam dose única de DMA (30 mg/Kg) por gavagem, suspensa em 1 mL de goma arábica (10% m/v). O grupo controle foi tratado somente com a goma. Nesse período, os animais tiveram acesso à água *ad libitum*.

3.8.3- Preparação das amostras de tecido

Os animais foram sacrificados, após serem anestesiados com éter, e os tecidos tais como coração e fígado foram coletados no tempo de 1 hora após a gavagem. As amostras de cérebro, por sua vez, foram coletadas somente após 3 horas ao tratamento. Os tecidos selecionados, inicialmente coração, fígado e cérebro foram lavados com salina e imediatamente imersos em um gral com nitrogênio líquido para congelamento e

homogeneização. Em seguida, deixou-se o nitrogênio do gral secar e rapidamente transferiu-se o homogenato para um tubo plástico (Eppendorf) previamente congelado. Estas amostras de tecidos foram mantidas a -80°C , não ultrapassando o tempo de armazenagem de sete dias para utilização da amostra. Antes da injeção no cromatógrafo, os nucleotídeos (ATP, ADP, AMP e adenosina) foram extraídos dos tecidos de acordo com o procedimento seguinte: pesou-se aproximadamente entre 1,5 a 4,5 mg do homogenato de cada tecido em um tubo de ensaio que continha 1 mL de solução de K_2HPO_4 (50 mM) e ácido cítrico (25 mM) em pH 4,5. A mistura foi colocada em banho-maria a 80°C durante 2 minutos para desativar qualquer processo biológico que pudesse degradar os nucleotídeos e, então, foram adicionados mais 3 mL de tampão fosfato-citrato. 1 mL desta solução foi centrifugado a 8000 rpm por 4 minutos. Retirou-se 200 μL do sobrenadante e a derivatização foi conduzida acrescentando-se 20 μL de 2-cloroacetaldeído (agente de derivatização). A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 80°C por 20 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, foram injetados 25 μL para análise no cromatógrafo.

3.8.4- Análise Estatística

Os dados foram apresentados em forma de médias e erro padrão (E.P). Diferenças entre valores médios de grupos controle e tratados foram testadas através do Teste T de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.9- Avaliação do efeito do DMA sobre o perfil de adenosina de corações isolados de ratos

3.9.1- Sistema de perfusão de coração isolado (Técnica de Langendorff)

O sistema de perfusão de coração isolado foi constituído com um sistema católicas de vidro e envolvido por jaqueta de água conectada a um circulador para aquecimento do tampão de perfusão a 37°C , como indicado no esquema da Figura 10.

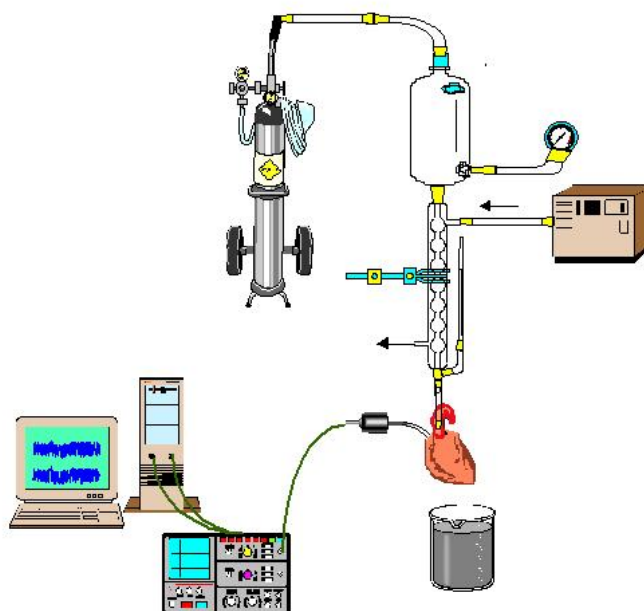


Figura 10- Esquema do sistema de perfusão de coração isolado e registro da pressão ventricular utilizado.

A extremidade superior do cata-bolhas foi conectada a um reservatório constituído de um frasco de Mariotti contendo a solução tampão de perfusão. Neste reservatório, o tampão era oxigenado com O₂ a 100% com fluxo controlado de forma a manter a pressão no frasco próxima a 70mmHg. A extremidade inferior do cata-bolhas foi conectada a uma cânula de vidro que por sua vez, era conectada à aorta ascendente para perfusão retrógrada. Em paralelo, foi montado um balão de látex, preenchido com salina e conectado a uma seringa de Hamilton para controle de seu volume e também a um transdutor de pressão para registro contínuo da pressão intraventricular.

3.9.2- Canulação e acoplamento do coração ao sistema

Ratos Wistar foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (50mg/Kg) e receberam injeção intraperitoneal de heparina sódica (1000 UI). Os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C, entubados por via orotraqueal com tubo

plástico de GelcoR e submetidos a ventilação controlada com ventilador Harvard e ar enriquecido com oxigênio a 100%. A temperatura corpórea e a ventilação permaneceram controladas durante o período de retirada do coração da cavidade torácica.

A cavidade torácica foi aberta através de secção sagital do esterno; a aorta ascendente foi identificada, seccionada e conectada ao sistema de perfusão, onde foi fixada com fio de algodão 3.0, sendo iniciada imediatamente a perfusão com solução tampão de HEPES: Tampão HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico) 20 mM, NaCl 137 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,5 mM e Glicose 6 mM, com pH 7,4, acrescentando insulina (100 UI), xilocaína (1000 UI) e heparina (1000 UI), enriquecido com 100% de oxigênio a uma pressão hidrostática de 70 mmHg e temperatura a 37°C.

3.9.3- Sistema de Registro e monitoração da pressão intraventricular

A monitoração da pressão intraventricular esquerda foi realizada com balão de látex, inserido no ventrículo esquerdo (VE) através do átrio esquerdo (AE). Este cateter foi conectado a um transdutor de pressão (COBE, ARVADA, USA) para registro contínuo de pressão intraventricular. Para tanto, utilizou-se sistema de registro Dataq (USA) com programa de aquisição e análise Windaq PRO.

O sinal da onda de pulso da pressão foi amplificado em amplificador GP4A Steamtech, USA, convertido em sinal digital (frequência de amostragem de 300 Hz) e gravado em computador para análise posterior. A onda de pressão ventricular foi analisada quanto ao pico máximo (Pressão Sistólica), nadir (Pressão Diastólica), derivada da pressão em relação ao tempo ($\pm dP/dT$) e frequência cardíaca.

3.9.4- Experimentos de perfusão de corações isolados de ratos com DMA

Os corações foram isolados, conectados ao sistema e perfundidos durante uma hora e meia e registradas as pressões ventriculares e frequência cardíaca como parâmetros basais de manutenção da preparação durante esse tempo. Na situação controle foi

adicionado DMSO (veículo) ao tampão e, em corações considerados tratados, foi adicionado 100nM de DMA, ambos antes do início da perfusão. Logo após, os corações foram removidos do sistema, lavados com salina, homogeneizados em nitrogênio líquido com o auxílio de grau e pistilo e armazenados a -80°C para posterior análise do nível de adenosina pelo método de HPLC.

3.9.5- Preparo das amostras de tecido

Para a análise, pesou-se aproximadamente entre 1,5 a 4,5 mg do homogenato de coração controle e tratado com DMA em um tubo de ensaio que continha 1 mL de solução de K_2HPO_4 (50 mM) e ácido cítrico (25 mM) em pH 4,5. A mistura foi colocada em banho-maria a 80°C durante 2 minutos para desativar qualquer processo biológico que pudesse degradar os nucleotídeos e, então, foram adicionados mais 3 mL de tampão fosfato-citrato. 1 mL desta solução foi centrifugado a 8000 rpm por 4 minutos. Retirou-se 200 μL do sobrenadante e a derivatização foi conduzida acrescentando-se 20 μL de 2-cloroacetaldeído (agente de derivatização). A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 80°C por 20 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, foram injetados 25 μL para análise no cromatógrafo.

3.9.6- Análise Estatística

Os dados foram apresentados em forma de médias e erro padrão. Diferenças entre valores médios de grupos controle e tratados foram testadas através do Teste T de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4- RESULTADOS

4.1- Expressão e Purificação da adenosina quinase recombinante

A adenosina quinase é a quinase de nucleosídeos mais abundante nos tecidos de mamíferos, inclusive em seres humanos e desempenha papel fundamental no controle da adenosina intracelular. Pequenas alterações em sua atividade resultam em grandes modificações dos níveis locais de adenosina. Deste modo, a inibição farmacológica da adenosina quinase produz aumentos sensíveis nas concentrações intra e extracelulares de adenosina. Esta ação dos inibidores da adenosina quinase resulta em efeitos farmacológicos múltiplos decorrentes da ação da adenosina, tais como, proteção celular à agressão por isquemia e trauma, modulação da resposta inflamatória, modulação da atividade neural e diversos efeitos metabólicos (Cottam HB et al., 1993; Firestein GS et al., 1994; Kowaluk EA et al., 1998; McGaraughty S et al., 2001; Jarvis MF et al., 2002; Gomtsyan A e Lee CH, 2004a e 2004b; McGaraughty S et al., 2005; Boison D, 2006 e 2007). É nesse contexto que, possivelmente, se dá a participação do DMA nos efeitos de proteção miocárdica observados em corações isolados submetidos a eventos de isquemia-reperfusão, resultando assim, na hipótese de seu efeito inibitório sobre a atividade da adenosina quinase.

Sistemas isolados utilizando enzimas clonadas e purificadas para reações cinéticas *in vitro* constituem uma importante ferramenta para a caracterização de efeitos farmacológicos de novos compostos químicos. É nesse sentido que, neste trabalho, optamos por avaliar os efeitos dos compostos quinazolínicos em um sistema de reação enzimática com a adenosina quinase recombinante.

Como observado na Figura 11, a expressão da adenosina quinase recombinante, utilizando a construção *adkpQe60*, foi realizada com sucesso em nosso laboratório. A proteína é revelada como uma banda única, com massa entre 40 e 55 KDa na fração do lisado induzido (I) com IPTG de cultura M-15adkpQE60. Podemos visualizar também nesta figura que as frações dos lisados induzidos (I) e não-induzidos (NI) com IPTG de culturas contendo o controle negativo da construção da adenosina quinase, M-15pQE32, bem como a fração não-induzida (NI) de M-15adkpQE60, não apresentaram qualquer expressão significativa da proteína de interesse.

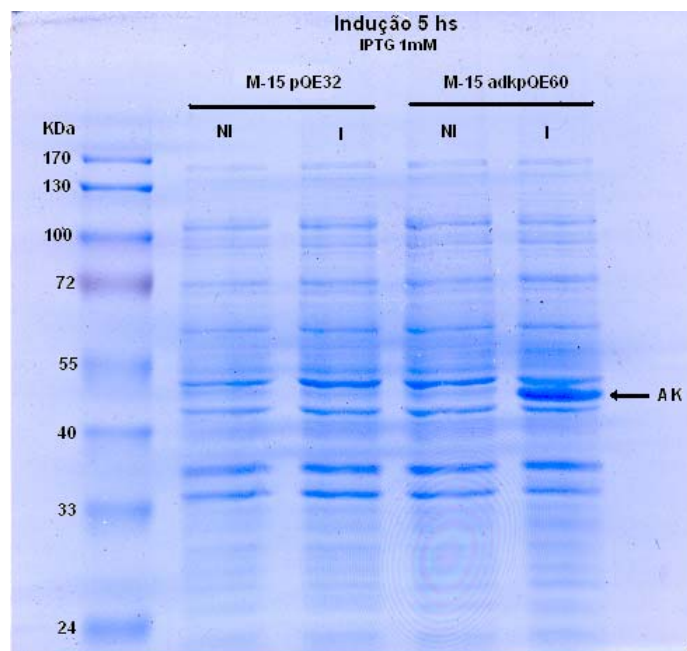


Figura 11- Foto de gel de poliacrilamida a 12% utilizado em experimentos de SDS-PAGE para análise da expressão da enzima adenosina quinase recombinante. M-15pQE32: fração solúvel do lisado bacteriano de *E. coli* M-15[pREp4] não induzido (NI) e induzido (I) contendo plasmídeo pQE32; M-15adkpQE60: fração solúvel do lisado bacteriano de *E. coli* M-15[pREp4] não induzido (NI) e induzido (I) contendo a construção adkpQE60; AK – adenosina quinase recombinante.

As condições de cultura e a indução da expressão têm grande efeito sobre a maneira de como a proteína é expressa e, nesse sentido, influenciar diretamente na estratégia para purificá-la. A proteína recombinante expressa em *E. coli* apresentou-se na forma solúvel após a lise da célula bacteriana. A purificação da adenosina quinase recombinante, expressa com uma cauda N- terminal de seis resíduos de Histidina (6 x His), foi feita em condições nativas, ou seja, sem desnaturação, por cromatografia de afinidade, utilizando coluna HisTrap HP, 5 mL (Amersham Biosciences, Sweden).

A massa molecular aparente e a pureza das frações de proteínas eluídas no processo de purificação foram comprovadas em gel de SDS-PAGE 12% (Figura 12). Nesta figura podemos observar que as frações eluídas (colunas 1-3) contêm proteínas oriundas da lise de células bacterianas, bem como uma banda mais espessa, que evidencia a alta expressão da adenosina quinase recombinante. A coluna 4 (Figura 12) do gel revelou uma banda intensa e mais isolada da proteína adenosina quinase, confirmando, assim, o êxito do método de purificação. Esse método mostrou ser bastante eficiente para a seleção da proteína recombinante, obtendo-se frações da adenosina quinase relativamente puras.

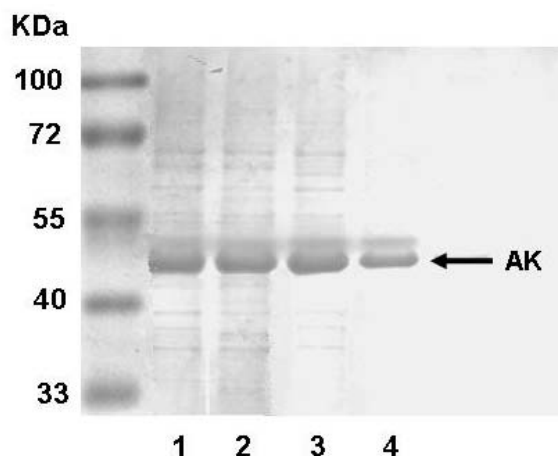


Figura 12- Foto de gel de poliacrilamida 12%, obtido de SDS-PAGE contendo frações de eluição da coluna HisTrap HP em experimentos de purificação da adenosina quinase recombinante. Colunas 1-2 - frações de lavagem com tampão fosfato acrescido de 3mM de imidazol; Coluna 3 – fração de lavagem com tampão fosfato acrescido de 50mM de imidazol; Coluna 4 – fração de eluição da proteína adenosina quinase recombinante com tampão fosfato acrescido de 150mM de imidazol. AK – adenosina quinase.

4.2- Método 1 de detecção de adenosina por HPLC

Para determinar os parâmetros cinéticos da enzima purificada, optamos por desenvolver e validar um método de HPLC para a detecção de adenosina. De maneira geral, os estudos de atividade da adenosina quinase empregam métodos radioquímicos para a medida dos dados enzimáticos. Assim, foi possível ter uma nova alternativa de método, mais seguro, rápido e econômico para a avaliação cinética da adenosina quinase em nosso laboratório (Marin RM et al., 2007).

4.2.1- Determinação dos parâmetros de exatidão, precisão e linearidade do método de HPLC para detecção de adenosina.

O método de análise de adenosina por HPLC mostrou-se rápido e reprodutível, usando coluna de sílica de fase reversa e fase móvel isocrática composta por acetonitrila e água, pH 4 (7:93%, v/v) e detecção por UV a 260nm. A Figura 13 apresenta dois cromatogramas sobrepostos, um obtido da análise de amostra de tampão TDM sem adenosina e outra contendo amostra padrão de adenosina. A seletividade e especificidade do método para a adenosina são indicadas pela boa resolução e simetria do pico, bem como pela separação das substâncias do tampão TDM na análise. O tempo de retenção (T_r) para a ADO foi de $6,55 \pm 0,04$ minutos ($n=20$).

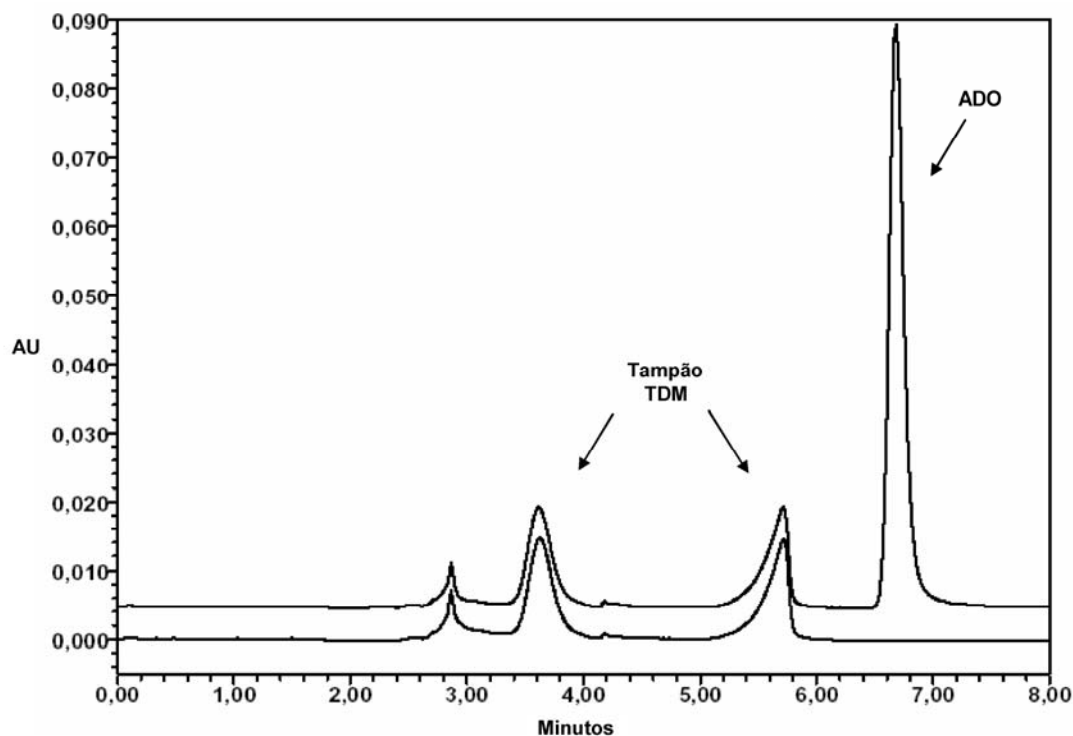


Figura 13- Cromatogramas representativos da análise de amostra padrão de adenosina em tampão TDM pelo método de HPLC.

Os valores médios de seis curvas de calibração de amostras padrões de adenosina estão mostrados na Tabela 1. Cada experimento da Tabela 1 foi realizado em dias diferentes e cada valor de concentração calculado corresponde à média das análises em triplicatas. A curva de calibração apresentou um coeficiente de regressão (R^2) de 0,999 entre os pontos, os quais foram obtidos da relação entre o valor do padrão nominal da solução de adenosina (0,25, 0,50, 1,00, 2,50, 5,00, 10,00, 25,00, 50,00 e 100,00 μM) e o valor da área dos picos de adenosina do cromatograma correspondente. A reta pode ser descrita pela equação de regressão linear: $y = 0,0249x - 0,00033$, na qual “x” representa a concentração calculada de adenosina, em μM , e “y” a área do pico de adenosina do cromatograma. A Figura 14 mostra o gráfico representativo da curva de calibração obtida. A validação das amostras dos padrões de calibração da adenosina (0,25 até 100,00 μM) e dos controles de qualidade de ADO (0,25; 2,70; 9,00; 45,00 e 90,00 μM) do método

analítico em termos de porcentagem de exatidão (DEV) e precisão (C.V.) estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Ainda em relação aos padrões de calibração (Tabela 1), pode-se verificar que oito amostras (0,50-100,00 µM) apresentaram valores de porcentagem de DEV e C.V. abaixo de $\pm 11,00\%$. A Tabela 2 apresenta os valores médios das concentrações dos controles de qualidade calculados a partir da curva de calibração. Além disso, apresenta também os valores médios do percentual de desvio da concentração nominal (DEV%, exatidão) e de precisão, obtidos para 4 amostras de cada concentração, que foram analisadas no mesmo dia (intra-corrida) e 24 amostras analisadas em dias diferentes (inter-corrida). Os valores de DEV ficaram entre 1,47 a 2,76% para intra-corrida e 0,78 a 3,04% para a inter-corridas e os valores de C.V. ficaram na faixa de 0,22 a 0,84% para a precisão intra-corrida e de -1,29 a -3,09% para a inter-corrida. De acordo com a literatura (Shah VP et al., 2000; US Department...2001), estes resultados estão dentro dos limites de exatidão e precisão aceitáveis.

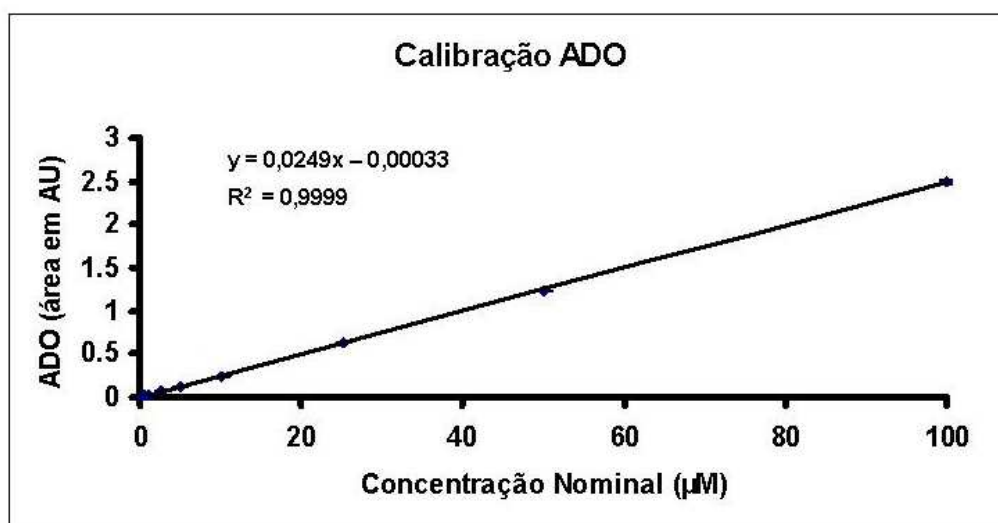


Figura 14- Gráfico representativo da curva de calibração obtida do valor do padrão nominal de adenosina (0,25 até 100,00µM) e da área (Unidades arbitrárias - AU) dos picos de adenosina do cromatograma. Dados apresentados como Média $\pm$ EP (n=6).

Tabela 1- Variações inter-corridas cromatográficas (*inter-run*) - avaliação dos valores de precisão, exatidão e de linearidade das amostras de concentração de adenosina obtidas para cada curva padrão em seis experimentos diferentes^a.

Concentração	Concentração calculada de adenosina (µM)						Média	D.P ^a	DEV ^b	C.V. ^c
Nominal	(triplicata de cada concentração)							(µM)	(%)	(%)
(µM)										
Ensaio	1	2	3	4	5	6				
0,25 (LOQ)	0.21±0.016	0.22±0.014	0.19±0.009	0.18±0.021	0.23±0.016	0.30±0.022	0,22	0,043	- 11,33	- 19,23
0.5	0.47±0.014	0.51±0.011	0.45±0.007	0.46±0.016	0.48±0.016	0.42±0.016	0,47	0,030	- 7,00	- 6,49
1.00	0.98±0.014	1.00±0.020	0.97±0.004	0.98±0.014	1.00±0.023	0.94±0.014	0,98	0,022	- 2,17	- 2,28
2.50	2.52±0.018	2.48±0.031	2.50±0.021	2.51±0.018	2.49±0.011	2.43±0.025	2,49	0,032	- 0,47	- 1,28
5.00	5.06±0.069	4.97±0.074	5.01±0.058	5.03±0.059	5.00±0.053	4.97±0.055	5,01	0,035	+ 0,13	+ 0,70
10.00	10.02±0.074	9.92±0.116	10.03±0.040	10.04±0.062	10.02±0.053	10.07±0.061	10,02	0,051	+ 0,17	- 0,51
25.00	24.98±0.201	25.08±0.164	25.05±0.150	25.04±0.254	25.06±0.207	25.30±0.231	25,09	0,111	+ 0,34	+ 0,44
50.00	50.02±0.150	50.06±0.332	49.62±0.491	50.07±0.239	50.00±0.144	50.06±0.147	49,97	0,174	- 0,057	- 0,35
100.00	99.99±0.771	99.96±0.512	100.30±0.234	99.95±0.512	99.98±0.550	99.95±0.673	100,02	0,137	+ 0,022	- 0,14
R	0.99987	0.99988	0.99999	0.99995	0.99998	0.99995	0.99994	0.00005	- 0.006	0.005

^a Desvio Padrão

^b Exatidão (DEV). Cálculo de acordo com a fórmula descrita no item 3.3.7.

^c Coeficiente de Variação ou Precisão (C.V.). Cálculo de acordo com a fórmula descrita no item 3.3.7.

Tabela 2- Valores de concentrações do padrão nominal e calculada, de desvio padrão, de exatidão e de precisão intra- e inter-corridas, avaliados nas amostras dos controles de qualidade de adenosina.^a

	Concentração Nominal (µM)	Concentração Calculada (µM)	D.P. (µM)	DEV (%)	C.V.(%)
Intra-corrid (n=4)	0.25 (LOQ)	0.27	0.016	7.07	6.05
	2.7	2.76	0.021	2.21	0.76
	9.0	9.13	0.077	1.47	0.84
	45.0	46.03	0.372	2.25	0.81
	90.0	92.45	0.208	2.76	0.22
Inter-corrida (n=24)	0.25 (LOQ)	0.21	0.039	- 15.0	-18.25
	2.7	2.72	0.056	0.78	-2.03
	9.0	9,08	0.136	0.84	-1.49
	45.0	45.90	1.421	1.99	-3.09
	90.00	92.74	1.198	3.04	-1.29

^a Os dados estão apresentados como médias das concentrações, DP (desvio padrão), exatidão ou DEV (desvio da percentagem) e precisão (C. V. coeficiente de variação). Os cálculos de exatidão e precisão foram feitos conforme as Fórmulas 1 e 2, respectivamente, descritas no item 3.3.7.

4.2.2- Determinação do limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) do método de HPLC para a adenosina.

O limite de detecção (LOD) do método analítico, definido como a menor concentração que pode ser distinguida do nível do ruído no cromatograma, cuja razão sinal/ruído (S/N) for maior do que 3, foi estabelecido para a concentração de adenosina de 0,10 μM . Por outro lado, o limite de quantificação (LOQ), que é definido como a concentração que apresenta a razão S/N maior do que 10, foi estabelecido para a concentração de adenosina de 0,25 μM . As Tabelas 1 e 2 apresentam valores médios de DEV e C.V. para o LOQ na faixa de 6,00 a 20,00%, o que significa que estão dentro dos limites estatísticos aceitáveis [61,62].

4.2.3- Estabilidade das amostras

Os testes de estabilidade de adenosina foram determinados nas amostras com concentrações iguais a 2,70; 9,00; 45,00 e 90,00 μM , em quadriplicatas. Os resultados médios das concentrações calculadas e estatísticos estão compilados na Tabela 3. Portanto, os valores de desvio da porcentagem nominal (DEV%) e dos coeficientes de variância (C.V. %) na faixa de $\pm 3,6$ e 1,2 %, respectivamente, indicam que não houve evidência de degradação de adenosina nos ciclos de congelamento-descongelamento das amostras. Além disso, o teste da estabilidade de adenosina à temperatura ambiente, durante 6, horas e no autoinjeter durante 24 horas, mostrou que não houve degradação da amostra. Isto indica que várias amostras podem ser analisadas em uma mesma corrida e também que não houve qualquer influência dos componentes da fase móvel sobre a adenosina da amostra.

Tabela 3 – Avaliação da estabilidade (média $\pm$ D.P.) de adenosina em tampão TDM (n=4).^a

Concentração Nominal (μ M)	2,70	9,00	45,00	90,00
Ciclos de congelamento-descongelamento				
1	2,70 $\pm$ 0,042	9,12 $\pm$ 0,113	45,30 $\pm$ 0,410	93,48 $\pm$ 0,648
2	2,76 $\pm$ 0,021	9,13 $\pm$ 0,086	46,01 $\pm$ 0,372	92,48 $\pm$ 0,208
6 h à 25°C	2,69 $\pm$ 0,032	9,12 $\pm$ 0,083	45,35 $\pm$ 0,359	93,39 $\pm$ 0,223
Autoinjeter (24 h)	2,71 $\pm$ 0,028	9,15 $\pm$ 0,061	45,41 $\pm$ 0,472	93,44 $\pm$ 0,794
Média ($\pm$ D. P.)	2,72 $\pm$ 0,031	9,13 $\pm$ 0,014	45,52 $\pm$ 0,331	93,20 $\pm$ 0,480
C. V. (%)	1,15	0,16	0,73	0,51
DEV (%)	+ 0,56	+ 1,44	+ 1,15	+ 3,55

^a Os dados estão apresentados como médias das concentrações, DP (desvio padrão), exatidão ou DEV (desvio da percentagem) e precisão (C. V. coeficiente de variação). Os cálculos de exatidão e precisão foram feitos conforme as Fórmulas 1 e 2, respectivamente, descritas no item 3.3.7.

4.3- Ensaio enzimático com adenosina quinase recombinante

4.3.1- Avaliação temporal do consumo de adenosina pela adenosina quinase.

A validação do método de HPLC para análise de adenosina permitiu utilizá-lo como ferramenta para a avaliação dos parâmetros cinéticos da adenosina quinase recombinante expressa e purificada em nosso laboratório.

Os ensaios iniciais de reação enzimática com a adenosina quinase foram conduzidos no sentido de se determinar uma condição ótima da atividade catalítica da enzima. Sabe-se que o Mg^{2+} é co-fator essencial para a adenosina quinase. Na verdade, o complexo ATP-Mg é que constitui um dos dois substratos utilizados pela enzima. Pesquisas também comprovam que concentrações elevadas de ATP^{4-} e Mg^{2+} livres produzem inibição na atividade da adenosina quinase (Palella TD et al., 1980). Portanto, em nosso estudo, diferentes concentrações de ATP e Mg foram avaliadas a fim de se determinar a melhor relação ATP/Mg necessária para uma adequada atividade da enzima. Nesse sentido, a adenosina quinase recombinante revelou uma atividade máxima utilizando a concentração de 0,8mM de ATP e $MgCl_2$ no meio de reação. No cromatograma da Figura 15 está apresentado o pico de adenosina detectado na ausência da enzima (linha preta) e outro, de menor intensidade (linha vermelha) após reação com adenosina quinase. Inicialmente, para o estudo quantitativo da cinética enzimática da adenosina quinase foram adicionadas concentrações fixas e conhecidas de ATP/ $MgCl_2$ (0,8 mM) e adenosina (10 μ M) ao meio de reação, sendo avaliado o valor da área do pico de adenosina obtido nos cromatogramas no tempo zero e após 1, 2, e 3 minutos do início da reação. A Figura 16 mostra a dependência temporal do consumo de adenosina pela adenosina quinase. No tempo de 1 minuto é observada uma taxa de consumo maior de adenosina (30%) em relação aos outros tempos, representativa de uma maior velocidade inicial (V_0) da reação. Assim, para a determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da adenosina quinase, todas as reações enzimáticas foram realizadas no tempo de 1 minuto.

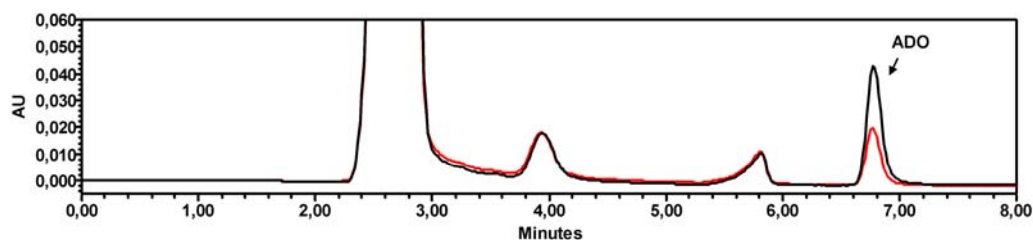


Figura 15- Cromatogramas representativos da análise, por HPLC, de adenosina de amostras controle (sem a adição da enzima adenosina quinase - linha preta) e após a reação com a enzima adenosina quinase (linha vermelha). ADO – adenosina.

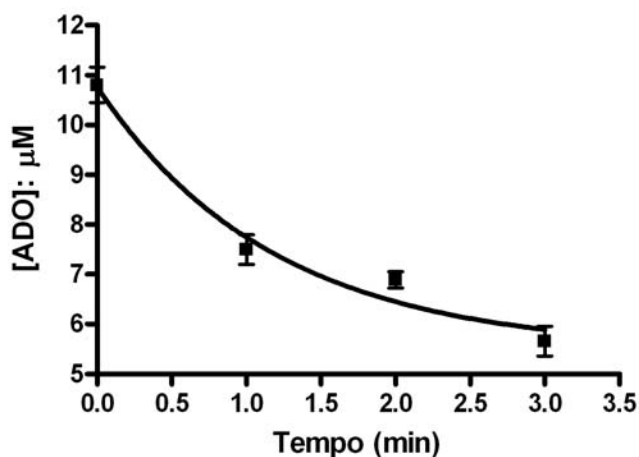


Figura 16- Gráfico representativo da dependência temporal (1, 2 e 3 minutos) do consumo de adenosina na reação da adenosina quinase. Dados apresentados como média $\pm$ E.P. (n=3).

4.3.2- Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e V_{max} .

A adenosina quinase catalisa a síntese de AMP, utilizando como substratos a adenosina e ATP. Nesta etapa, a proteína adenosina quinase recombinante purificada foi avaliada quanto a sua especificidade de reação em relação ao substrato adenosina. Para

tanto, as concentrações de ATP (0,8 mM) e enzima adenosina quinase ($\sim 0,1 \mu\text{g}$) foram mantidas constantes, enquanto que para a adenosina foi testada em uma faixa de concentração de 0,1 a 20,00 μM . O gráfico, representado pela Figura 17, relaciona os dados de V_0 de consumo de adenosina pela adenosina quinase na amostra, com o valor da concentração inicial de adenosina da referente amostra. A reação foi conduzida conforme condições descritas em Materiais e Métodos item 3.5.

Os valores de K_m e $V_{\max}$ da adenosina quinase em relação à adenosina, determinados pelo método de HPLC, foram de $2,5 \pm 0,28 \mu\text{M}$ e $38 \pm 1,26 \text{ nmoles /min/}\mu\text{g}$ de proteína, respectivamente.

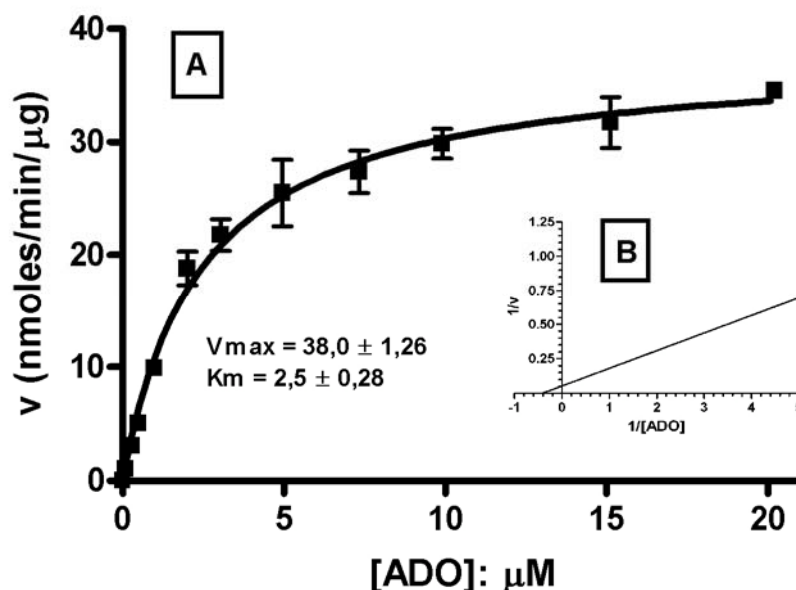


Figura 17- Gráfico representativo da curva cinética da adenosina quinase. (A) Curva de saturação (Michaelis-Menten) representando valores médios ($n=3$) da velocidade de consumo de adenosina (nmoles adenosina / minuto/ μg de proteína) pela variação da concentração de adenosina (μM), na presença de concentrações fixas de adenosina quinase e ATP; (B) Gráfico de duplo recíproco Lineweaver-Burk para o substrato adenosina. Valores de K_m e $V_{\max}$ $\pm$ EP. ($n=3$).

4.3.3- Ensaio de inibição da adenosina quinase

Antes da realização dos estudos para a confirmação dos efeitos inibitórios das 4-anilinoquinazolinias DMA e PD153035 sobre a adenosina quinase, foram realizados ensaios com o inibidor clássico da AK, a 5-Iodotubercidina (5-IT). Os resultados desse estudo confirmaram um efeito inibitório, concentração-dependente, da 5-IT sobre a atividade da adenosina quinase de aproximadamente 47% com a concentração de 3 μ M, sendo este o efeito máximo de inibição desse composto (Figura 18). Desse gráfico de inibição foi, então, calculado o IC₅₀ para a 5-IT, apresentando valor de aproximadamente 100 nM. Com isso, foi possível demonstrar que o método de HPLC validado é capaz de avaliar as alterações na atividade da adenosina quinase provocadas pela ação de inibidores.

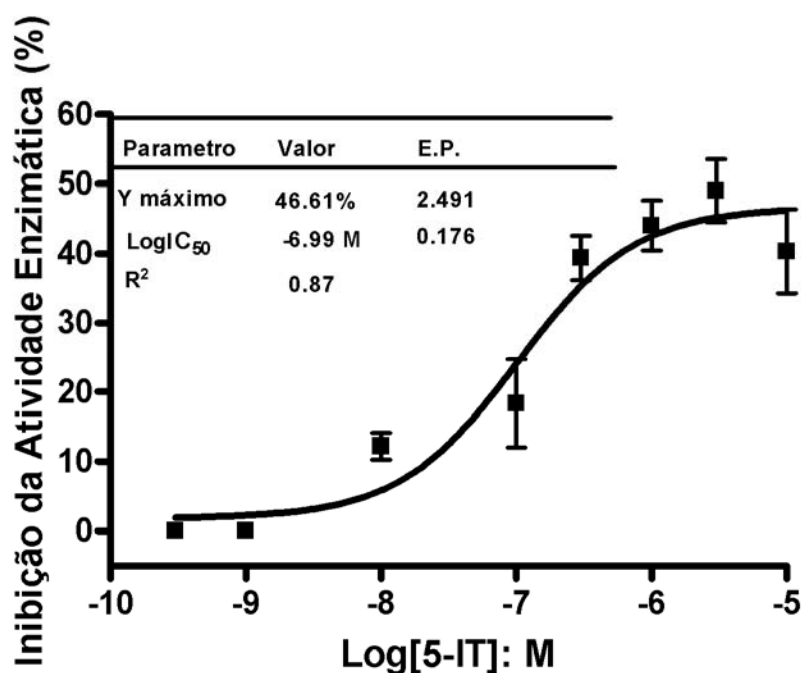


Figura 18- Gráfico de concentração-resposta do composto 5-Iodotubercidina (5-IT) sobre a atividade da adenosina quinase. Dados apresentados como média $\pm$ E.P. (n=3).

Com um método adequado para a análise e detecção de inibição da atividade da adenosina quinase, foi possível demonstrar que os compostos quinazolínicos DMA e PD 153035 também exercem efeitos inibitórios, concentração-dependente, sobre a atividade dessa enzima. O gráfico da Figura 19 revela um efeito máximo de inibição da atividade enzimática de aproximadamente 30% e 22% em relação aos respectivos compostos. No entanto, esse efeito é atingido em concentrações muito mais baixas que aquelas observadas com a 5-IT. Desta maneira, os valores de IC_{50} para o DMA e PD153035 foram de 1,2 pM e 0,8 nM, respectivamente. Os dados de K_i foram calculados em relação aos valores de IC_{50} dos respectivos compostos e apresentaram os valores de 0,24 pM e 160 pM (Tabela 4).

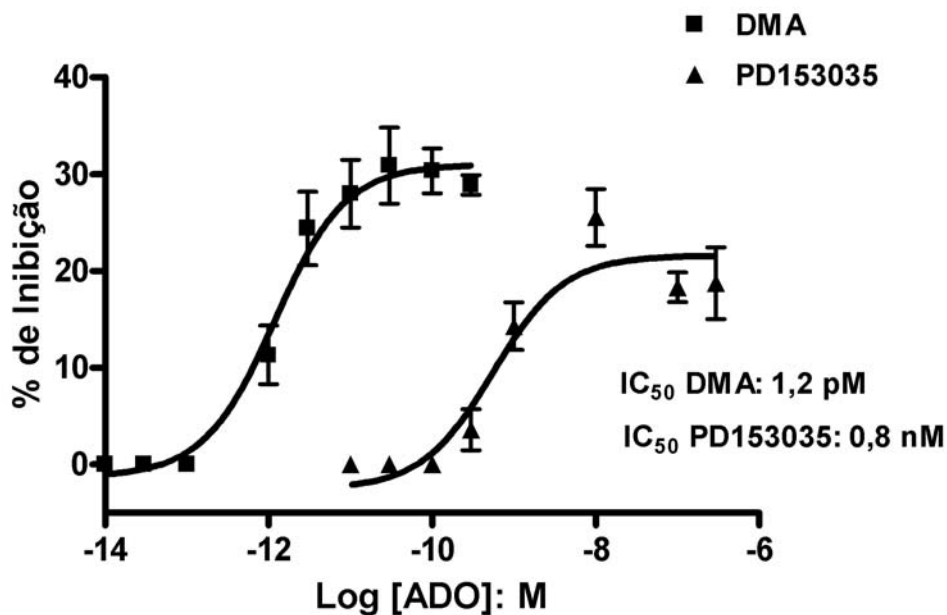


Figura 19- Gráfico concentração-resposta dos compostos quinazolínicos DMA e PD153035 sobre a inibição da atividade da adenosina quinase. Dados apresentados como média $\pm$ E.P. (n=3).

Tabela 4- Valores de K_i dos compostos quinazolínicos sobre a atividade da adenosina quinase, calculados a partir dos valores de IC_{50}

Quinazolina	K_i
DMA	0,24 pM
PD153035	160 pM

4.4- Método 2 de detecção de adenosina por HPLC

4.4.1- Método de HPLC para análise de adenosina em extratos de tecidos de ratos

Para avaliar os nucleosídeos de purinas (ATP, ADP, AMP e adenosina) em tecidos ratos, desenvolvemos um método de HPLC de fase reversa com detecção por fluorescência, que se mostrou simples, sensível e reprodutível.

O objetivo desse estudo é a análise do perfil de adenosina nas amostras de tecidos controles e tratados com o composto DMA. O processo de extração também recupera os outros derivados purínicos ATP, ADP, AMP, que também apresentam excelente afinidade pelo tampão de extração e, portanto, são também derivatizados e detectados pelo método. Como descrito anteriormente, os dados de validação do método se referem somente à adenosina. Conforme as condições cromatográficas descritas no item 3.7.2, a Figura 20 apresenta um cromatograma representativo de um extrato de coração de ratos controle. O tempo total de corrida cromatográfica foi relativamente curto (20 minutos) em comparação com uma média de tempo de 30 minutos reportado na literatura (Delabar U et al., 1999; Katayama M et al., 2001; Bobalova J et al., 2002; Haink G e Deussen A, 2003; Czarnecka J et al., 2005). Os tempos de retenção (t_R) dos derivados de ATP, ADP, AMP, e adenosina foram de aproximadamente 4,96; 6,50; 10,43 e 15,44 minutos, respectivamente. Esses tempos de retenção alteram-se com a variação da temperatura ambiente. Os valores de comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 280 e 420 nm.

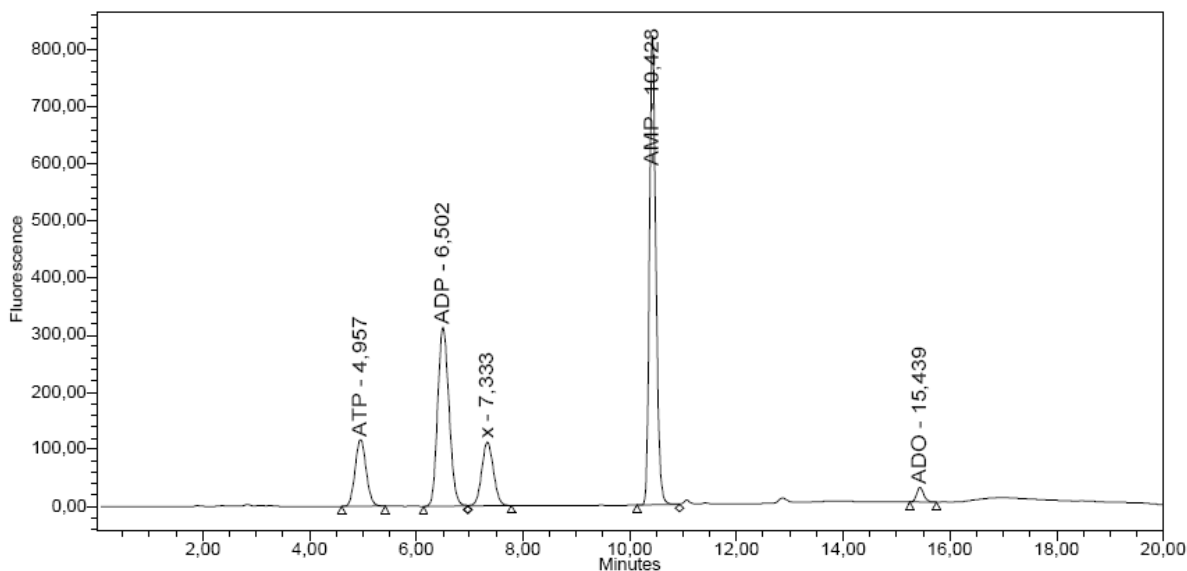


Figura 20- Cromatogramas representativos das análises, por HPLC, do perfil dos derivados purínicos ATP, ADP, AMP e adenosina de extrato de coração de ratos controles.

4.4.2- Linearidade e limite de quantificação (LLOQ)

As curvas de calibração foram obtidas plotando-se as áreas dos picos da adenosina versus os valores das concentrações dos padrões nominais (adenosina = 0,016; 0,031; 0,063; 0,125; 0,250; 0,500; 1,000 e 3,000 μM). Nesta faixa de concentração, as curvas de calibração apresentaram linearidade ($R^2 \geq 0,9995$) e podem ser descritas pela seguinte equação de regressão linear (Figura 21): $y = 3.5092 \cdot x - 0,0213$ ($R^2 = 0,9999$), na qual x é a concentração do padrão nominal de adenosina em μM e y é a área do pico de adenosina (EUFS) lida no cromatograma. Baseado em uma razão sinal ruído de 10, o limite de quantificação (LOQ) estimado foi de 0,031 $\mu\text{mol/L}$ com valores de coeficiente de variação de 11,76% e de exatidão de 9,68% (Tabela 5). O limite de detecção (LOD) foi estimado para a concentração de 0,016 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 5), também de acordo com uma razão sinal ruído de 3.

Cada experimento da Tabela 5 foi realizado em dias diferentes e cada valor de concentração calculado corresponde à média das análises em triplicatas. Ainda em relação aos padrões de calibração (Tabela 5), pode-se verificar que sete amostras (0,031-3,000 µM) apresentaram valores de percentagem de desvio (DEV%) e precisão (C.V.) na faixa de ± 0,30 e 11,76 %, respectivamente. De acordo com a literatura (Shah VP et al., 2000; US Department...2001) estes resultados estão dentro dos limites de exatidão e precisão aceitáveis.

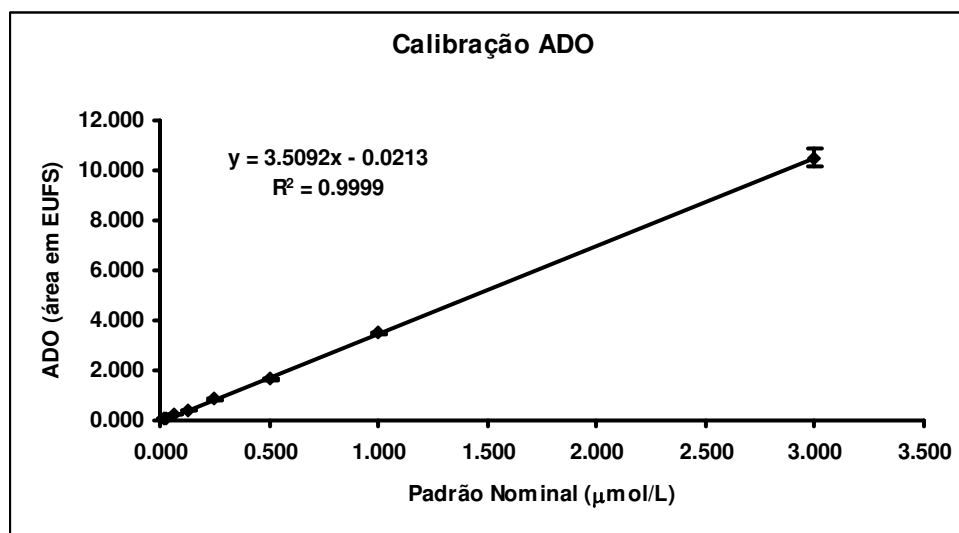


Figura 21- Gráfico representativo da curva de calibração obtida da área (Unidades de emissão de fluorescência - EUFs) dos picos de adenosina (ADO) do cromatograma e do valor nominal da concentração da solução padrão de adenosina (0,016 até 3,000µM). Dados apresentados como média ± EP (n=6).

4.4.3- Precisão (C.V.) e reprodutibilidade (DEV)

A precisão e a exatidão para as análises intra- e inter-corridas também foram avaliadas através das amostras dos controles de qualidade em concentrações de 0,031 (LOQ), 0,060, 0,200, 1,500 e 2,500 µM de adenosina, preparadas no tampão fosfato-citrato de derivatização. A Tabela 6 apresenta os valores médios das concentrações dos controles de qualidade calculados a partir de uma curva de calibração. Além disso, apresenta também

os valores médios de precisão e do percentual de desvio da concentração nominal (DEV%, exatidão) obtidos para 3 amostras de cada concentração, que foram analisadas no mesmo dia (*intra-corrida*) e em dias diferentes (*inter-corrida*), juntamente com os padrões da curva de calibração. Os valores de exatidão (DEV) representam o percentual da concentração calculada comparada com a do padrão nominal. A precisão foi baseada no cálculo do coeficiente de variação (C.V.). Os valores de DEV ficaram na faixa entre 0 a + 9,68% para ambos os ensaios *intra-* e *inter-corridas*. O coeficiente de variação ficou na faixa de 2,00 a 5,00% para a precisão *intra-corrida* e de 3,62 a 12,50% para a *inter-corrida*. Esses valores estão dentro dos critérios de aceitabilidade recomendados pela FDA para uma validação de método (Shah VP et al., 2000; US Department...2001).

Tabela 5- Variações inter-corridas cromatográficas (*inter-run*) - avaliação dos valores de precisão, exatidão e de linearidade das amostras de concentração de adenosina derivatizada obtidas para cada curva padrão em seis experimentos diferentes^a.

Padrão nominal (μM)	Concentração de adenosina calculada (μM) (triplicata de cada concentração)						Média	D.P. ^b (μM)	DEV (%) ^c	C.V. (%) ^d
Experimentos	1	2	3	4	5	6				
0,016	0,023 $\pm$ 0,001	0,019 $\pm$ 0,001	0,023 $\pm$ 0,001	0,018 $\pm$ 0,00	0,016 $\pm$ 0,00	0,012 $\pm$ 0,00	0,019	0,004	+18,75	21,05
0,031 (LOQ)	0,036 $\pm$ 0,00	0,038 $\pm$ 0,00	0,039 $\pm$ 0,00	0,033 $\pm$ 0,001	0,031 $\pm$ 0,00	0,029 $\pm$ 0,00	0,034	0,004	+9,68	11,76
0,063	0,069 $\pm$ 0,00	0,061 $\pm$ 0,00	0,071 $\pm$ 0,01	0,065 $\pm$ 0,00	0,064 $\pm$ 0,00	0,060 $\pm$ 0,00	0,065	0,004	+3,17	6,15
0,125	0,128 $\pm$ 0,00	0,123 $\pm$ 0,00	0,128 $\pm$ 0,01	0,131 $\pm$ 0,00	0,132 $\pm$ 0,01	0,125 $\pm$ 0,01	0,128	0,003	+2,40	2,34
0,250	0,247 $\pm$ 0,01	0,246 $\pm$ 0,00	0,246 $\pm$ 0,00	0,258 $\pm$ 0,01	0,255 $\pm$ 0,02	0,262 $\pm$ 0,01	0,252	0,007	+0,80	2,78
0,500	0,475 $\pm$ 0,01	0,496 $\pm$ 0,01	0,482 $\pm$ 0,03	0,508 $\pm$ 0,01	0,454 $\pm$ 0,04	0,530 $\pm$ 0,03	0,491	0,027	-1,80	5,50
1,000	0,952 $\pm$ 0,02	1,001 $\pm$ 0,03	0,989 $\pm$ 0,06	0,964 $\pm$ 0,02	1,040 $\pm$ 0,10	1,074 $\pm$ 0,06	1,003	0,046	+0,30	4,59
3,000	3,002 $\pm$ 0,10	3,001 $\pm$ 0,10	3,006 $\pm$ 0,09	3,009 $\pm$ 0,07	2,992 $\pm$ 0,13	3,007 $\pm$ 0,03	3,003	0,006	+0,30	0,20
R ²	0,9999	1	0,9999	0,9998	0,9995	0,9996	0,9998	0,0002	- 0,02	0,020

^a Uma curva linear foi construída para a resposta das amostras (áreas de adenosina) versus a concentração do padrão nominal como descrito na Parte Experimental. A concentração calculada foi estimada da leitura da resposta das amostras padrões contra uma das curvas de calibração. Cada experimento (1-6) corresponde ao valor médio das análises em triplicata.

^b D.P.= Desvio padrão

^c Exatidão (DEV %) = o desvio da porcentagem da concentração calculada do valor da teórica. Cálculo feito conforme Fórmula descrita no descrita no item 3.3.7.

^d C.V. ou RSD (coeficiente de variação ou desvio padrão relativo)= precisão do método. Cálculo feito conforme Fórmula descrita no item 3.3.7.

Tabela 6- Valores de concentrações do padrão nominal e calculada, de desvio padrão, de precisão e de exatidão intra- e inter-corridas, avaliados nas amostras dos controles de qualidade de adenosina derivatizada^a.

	Concentração nominal de adenosina (µM)	Concentração nominal calculada (µM)	D.P. (µM)	DEV (%)	C. V. (%)
Intra-corrida (n=3)	0,031 (LOQ)	0,033	0,001	+6,45	3,03
	0,060	0,060	0,003	-	5,00
	0,200	0,210	0,005	+5,00	2,38
	1,500	1,551	0,031	+3,40	2,00
	2,500	2,620	0,124	+4,80	4,73
Inter-corrida (n=18)	0,031 (LOQ)	0,034	0,004	+9,68	11,76
	0,060	0,064	0,008	+6,67	12,50
	0,200	0,208	0,012	+4,00	5,77
	1,500	1,547	0,056	+3,13	3,62
	2,500	2,538	0,155	+1,52	6,11

^a Os dados estão apresentados como médias das concentrações, DP (desvio padrão), exatidão ou DEV (desvio da percentagem) e precisão (C. V. coeficiente de variação). Os cálculos de precisão e exatidão foram feitos conforme as Fórmulas 1 e 2, respectivamente, descritas no item 3.3.7.

4.4.4- Estabilidade das amostras

Os testes de estabilidade de adenosina derivatizado com 2-cloroacetaldeído foram determinados nas amostras com concentrações iguais a 0.125, 0.250, 0.500 e 1.500 μM , em quadriplicatas. Os resultados médios das concentrações calculadas e estatísticos estão compilados na Tabela 7. Portanto, os valores de desvio da porcentagem nominal (DEV%) e dos coeficientes de variância (precisão) na faixa de $\pm 13,20$ e $11,11\%$, respectivamente, indicam que não houve evidência de degradação de adenosina nos períodos de preparo e análise das amostras. Além disso, o teste da estabilidade de adenosina no autoinjeter mostrou que não houve degradação da amostra em um período de 24 horas. Isto indica que várias amostras podem ser analisadas em uma mesma corrida e também que não houve qualquer influência dos componentes da fase móvel sobre o derivado.

Tabela 7- Avaliação da estabilidade adenosina em amostras preparadas no tampão fosfato-citrato e após a derivatização com 2-cloroacetaldeído^a.

Padrão nominal (μM)	0,125	0,250	0,500	1,500
4 h à 25°C (n= 4)	0,133 ± 0,016	0,289 ± 0,026	0,572 ± 0,016	1,719 ± 0,016
Autoinjeter (n= 4) (após 24 h)	0,137 ± 0,016	0,278 ± 0,018	0,545 ± 0,021	1,664 ± 0,058
Média (n=8)	0,135 ± 0,015	0,283 ± 0,022	0,558 ± 0,022	1,692 ± 0,061
DEV (%)	+ 8,000	+ 13,200	+ 11,600	+ 12,800
C. V. (%)	11,110	7,770	3,940	3,610

^a Os dados estão apresentados como médias das concentrações, DP (desvio padrão), C.V. (coeficiente de variação) e exatidão ou DEV (desvio da percentagem). Os cálculos de precisão e exatidão foram feitos conforme as Fórmulas descrita no item 3.3.7.

4.5- Efeito do composto quinazolínico DMA sobre o perfil de adenosina de coração, fígado e cérebro de ratos.

Caracterizado o efeito inibitório dos compostos quinazolínicos sobre a atividade da adenosina quinase, foi importante confirmar, então, se essa inibição é responsável por um aumento da concentração de adenosina em tecidos de ratos. O método de HPLC validado para a detecção e quantificação de adenosina em tecidos foi utilizado nesta avaliação. Para estabelecer os efeitos *in vivo* do DMA sobre o perfil de adenosina em tecidos, foram feitos experimentos em que os ratos receberam uma dose única de DMA de 30mg/Kg por gavagem suspensa em 1mL de goma arábica 10%. Os tecidos tais como coração e fígado foram coletados e homogeneizados em nitrogênio líquido após 1 hora à gavagem. Somente as amostras de cérebro foram coletadas após 3 horas ao tratamento. Na Figura 22 estão representados os cromatogramas obtidos pelo método de HPLC de amostras de coração, fígado e cérebro de ratos controle (n=6), contendo os picos de ATP, ADP, AMP e adenosina. Todas as amostras de tecidos foram analisadas em triplicatas. Os ratos que receberam DMA (n=6) tiveram um aumento, em relação aos controles, de 47%, 30% e 20% nos valores médios da concentração de adenosina tecidual (Tabela 8 e Figura 23) nas amostras de coração, fígado e cérebro, respectivamente. A análise das amostras de cérebro de animais tratados com o composto mostrou que houve aumento da disponibilidade de adenosina nesse tecido somente 3 horas após o tratamento.

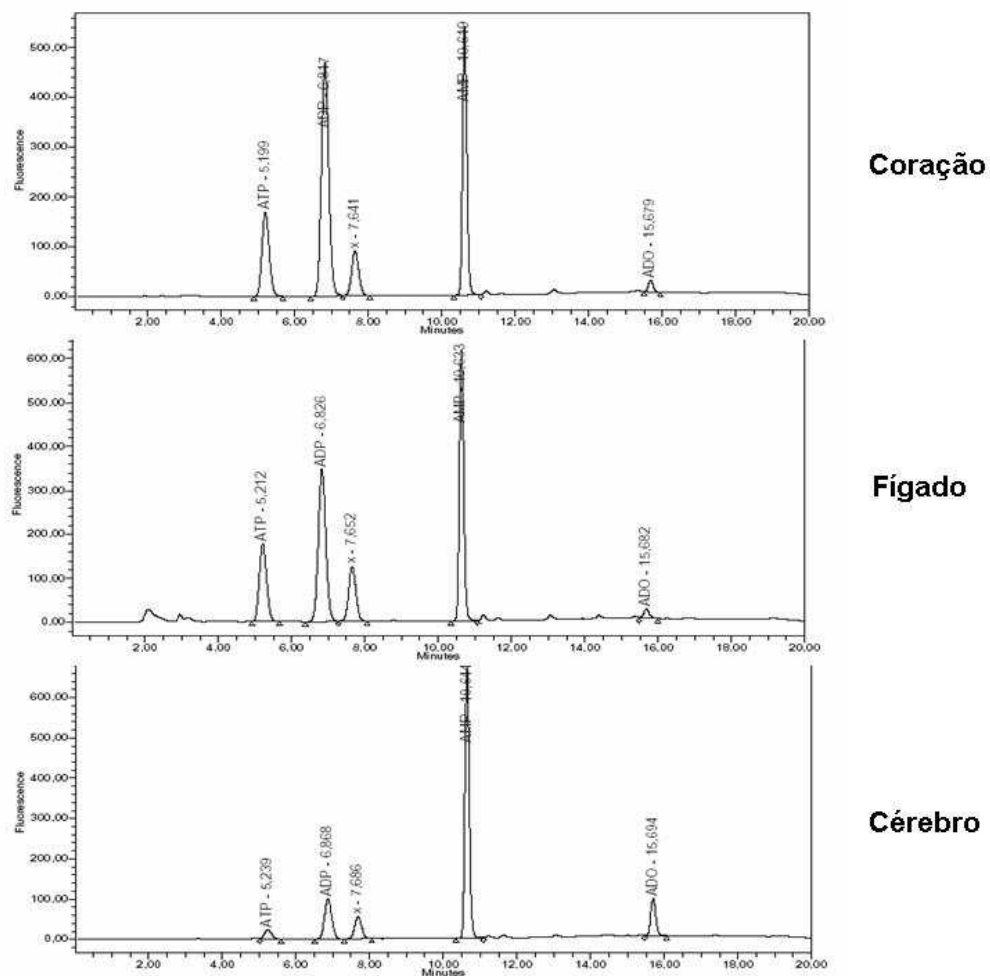


Figura 22- Cromatogramas representativos das análises, por HPLC, do perfil dos derivados purínicos ATP, ADP, AMP e adenosina (ADO) de extrato de coração, fígado e cérebro de ratos controles.

Tabela 8- Valores representativos do perfil de adenosina (nM/mg de tecido) de extratos de coração e fígado de ratos controle (C) e tratados (T) com dose de 30mg/Kg de DMA, sacrificados após 1 hora ao tratamento e de extratos de cérebro de animais controle e tratados com a mesma dose de DMA, analisados após 3 horas ao tratamento. Dados apresentados como média $\pm$ E.P. (n = 6).

	Controle (nM/mg)	Tratado (nM/mg)
Coração	16,37 $\pm$ 1,06	24,93 $\pm$ 1,11
Fígado	19,70 $\pm$ 0,13	26,28 $\pm$ 2,03
Cérebro	73,96 $\pm$ 0,84	88,70 $\pm$ 3,31

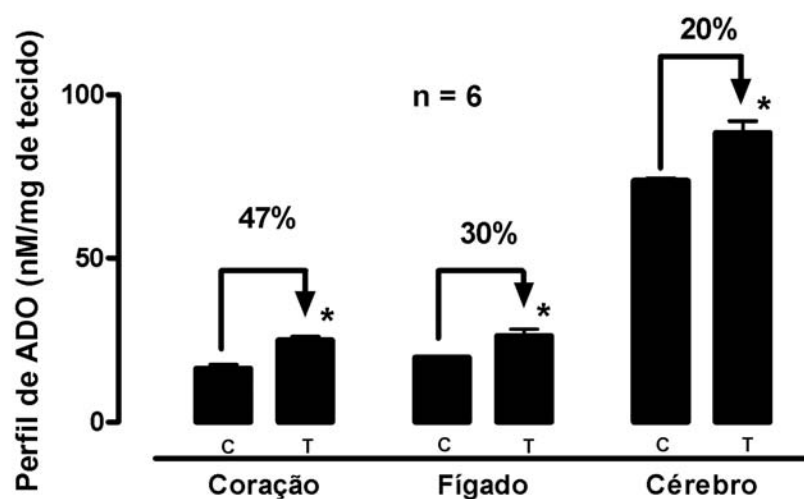


Figura 23- Gráfico representativo do perfil de adenosina de coração, fígado de ratos controle (C) e tratados com DMA (T) na dose de 30mg/Kg, sacrificados após 1 hora ao tratamento. Amostras de cérebro de ratos controle e tratados com DMA na dose de 30 mg/Kg foram coletadas após 3 horas à gavagem. Dados apresentados como média $\pm$ E.P. (n = 6).

* - p < 0,05 comparado à respectiva amostra controle.

4.6- Efeito do composto quinazolinico DMA sobre o nível de adenosina tecidual em corações isolados de ratos.

Foram realizados experimentos em corações isolados de ratos, perfundindo-os com 100nM de DMA durante uma hora e meia, sob condições basais (ver item 3.9.4). Foram analisados cinco corações controles e cinco tratados com DMA, em experimentos realizados em dias diferentes, e cada amostra de tecido foi avaliada, quanto à concentração de adenosina tecidual, em triplicata, por método de HPLC. Na Tabela 9 estão listados os valores médios de concentração, em nM por mg de tecido, de adenosina em corações isolados controle e tratados com 100 nM de DMA. A análise por HPLC mostrou que os corações perfundidos com o composto tiveram um aumento médio de 64% (Figura 24) no valor de concentração da adenosina tecidual em relação aos valores controles (corações perfundidos com DMSO). Esse resultado sugere que, mesmo em condições basais, o DMA disponibiliza uma maior quantidade de adenosina no tecido isolado.

Tabela 9- Valores do perfil da concentração de adenosina de corações isolados de ratos controles e tratados com 100nM de DMA. Dados apresentados como média $\pm$ E.P.(n=5).

	Controle	Tratado
Perfil de adenosina		
(nM/mg)	10,36 $\pm$ 0,91	17,00 $\pm$ 2,28

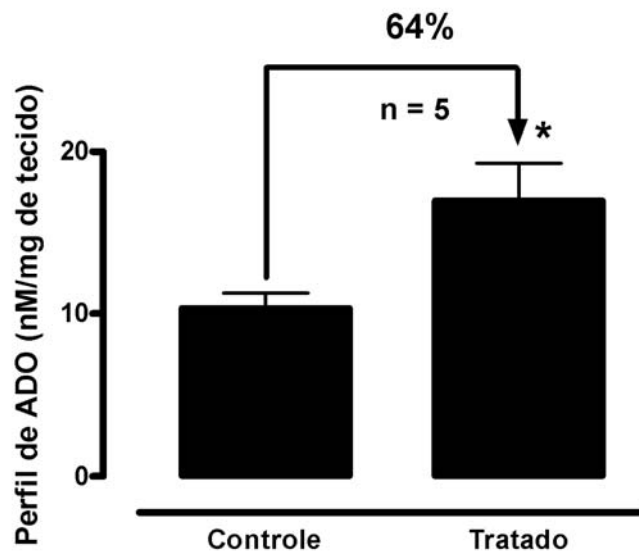


Figura 24- Gráfico representativo do perfil de adenosina de corações isolados de ratos controle e perfundidos com 100nM de DMA (tratado). Dados apresentados como média $\pm$ E.P. (n = 5).

* - $p < 0,05$ comparado à amostra controle.

5- DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente estudo indicam que os derivados de 4-anilinoquinazolinas DMA e PD153035: 1 - inibem a atividade da enzima adenosina quinase recombinante em baixas concentrações; 2 – o composto DMA aumenta a disponibilidade de adenosina tecidual de coração e fígado de ratos, possivelmente em decorrência da inibição da adenosina quinase tecidual.

A adenosina quinase, também conhecida como adenosina 5'-fosfotransferase é a quinase de nucleosídeos mais abundantes em mamíferos e catalisa a fosforilação da 5'-hidroxila do ribofuranosil de análogos de nucleosídeos utilizando ATP ou GTP como doador de fosfato. Essa enzima revelou-se como uma das mais importantes no controle dos níveis intersticiais de adenosina em diversos tecidos (Lloyd HG e Fredholm BB, 1995; Linden J, 2001; Gouder N et al., 2004;). Assim, a caracterização do mecanismo cinético da adenosina quinase é de fundamental importância para o entendimento de sua função na célula. Adicionalmente, embora alguns estudos farmacológicos e bioquímicos confirmem a importância da adenosina quinase sobre a homeostasia da adenosina, a pergunta de como a atividade da adenosina quinase poderia ser regulada, ainda não foi respondida. Estudos de expressão gênica, bem como a função e estrutura de proteínas, poderiam revelar o mecanismo de sinalização que controla essa enzima e adicionar novos alvos terapêuticos. A enzima já foi purificada de diversos tecidos de diferentes espécies, incluindo a humana, bem como a caracterização e clonagem do gene dessa proteína de tecidos de ratos, camundongos e humano (Henderson JF et al., 1972; Andres CM et al., 1979; Miller RL et al., 1979; Hawkins CF e Bagnara AS, 1987; Spsychala J et al., 1996; McNally T et al., 1997; Mathews II et al., 1998; Sakowicz M et al., 2001; Muchmore SW et al., 2006; Park J et al., 2007a).

No presente estudo, utilizamos a adenosina quinase recombinante de fígado de camundongo. A expressão em bactéria *E coli* M-15 e purificação foi realizada com sucesso em nosso laboratório e os ensaios iniciais de cinética revelaram uma adequada atividade dessa enzima. A maioria dos trabalhos que avaliou a atividade da adenosina quinase utilizou métodos radioativos com adenosina marcada com radioisótopos específicos (Palella TD et al., 1980; Sakowicz M et al., 2001; Maj MC et al., 2000 e 2001; McGaraughty S et al., 2005). No presente estudo validamos um método de HPLC para

detecção de adenosina na reação cinética da adenosina quinase (Marin RM et al., 2007). O método mostrou-se rápido e reprodutível, usando coluna de sílica de fase reversa e fase móvel isocrática. Com isso, pudemos avaliar as variações de concentração de adenosina no meio de reação com a adenosina quinase e padronizar os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da enzima. Esse método foi baseado em relatos existentes na literatura que indicam a utilização do método de HPLC para a detecção de compostos purínicos em amostras biológicas e também para avaliação do metabolismo da adenosina (Maguire MH et al., 1986; Smolenski RT et al., 1990; Delabar U et al., 1999; Haink G e Deussen A, 2003; Volonte MG et al., 2004; Czarnecka J et al., 2005). O ensaio cromatográfico, desenvolvido no laboratório, emprega a detecção de adenosina por UV. Essa opção de detecção por UV deve-se ao fato de que a adenosina possui capacidade de absorver luz nessa região. Nesse caso, o comprimento de onda de maior absorção do nucleosídeo foi determinado por varredura do espectro de 190 a 390 nm, utilizando detector de PDA (dados não apresentados) e o comprimento de onda de absorção máxima para a adenosina foi em 260nm. O grande diferencial desse método de detecção de adenosina por HPLC, em relação aos descritos na literatura, se deve à otimização das condições da fase móvel (Marin RM et al., 2007). A fase móvel usada para promover a separação cromatográfica da adenosina foi composta por acetonitrila e água, (7%:93%, v/v). Esta condição proporcionou uma maior economia de reagentes, além de preservar as boas condições de funcionamento do aparelho pela simples constituição da solução da fase móvel. Por esse método, obtivemos uma boa correlação entre os pontos da curva de calibração da adenosina, apresentando um coeficiente de regressão (R^2) de 0,999. As leituras de amostras de soluções padrão de adenosina mostraram-se precisas e reprodutíveis, com valores de CV (Coeficiente de Variância) DEV (Reprodutibilidade) abaixo de 11%. Uma outra vantagem observada foi em relação ao tempo de retenção (Tr) do pico de adenosina na análise, obtido em aproximadamente 7 minutos. Toda essa otimização proporcionou a análise direta, simplificada e rápida da adenosina na reação com a adenosina quinase.

Para a realização dos ensaios enzimáticos, foi necessário padronizar a atividade enzimática da adenosina quinase para a fosforilação do nucleosídeo adenosina. Todas as condições ideais necessárias à manutenção da linearidade da reação foram previamente

testadas, como tempo de incubação, concentração da enzima e concentração dos substratos. Essa padronização foi baseada no estudo de realizado por Palella TD et al. (1980), que mostraram que a atividade catalítica da adenosina quinase é significativamente afetada pela variação do pH e inibida pelo excesso de Mg^{2+} , ATP e adenosina. Alguns estudos também avaliaram a importância do fosfato inorgânico (Pi) para a atividade da adenosina quinase. Os experimentos de Maj M et al. (2000) sugerem que o fosfato exerce efeito estabilizador para a ligação do substrato adenosina ao sítio da enzima. Por outro lado, há demonstrações indicando também que a inibição de adenosina quinase, *in vivo*, ocorre pela presença de fosfato inorgânico em excesso, proveniente do catabolismo de nucleotídeos de adenina (Donato M e Gelpi RJ, 2003).

Com esse conhecimento, a reação cinética da adenosina quinase recombinante seguiu as condições ideais estabelecidas para esta enzima. A relação de concentração de ATP/Mg no meio de reação é um ponto crítico para a avaliação da velocidade enzimática (Palella TD et al., 1980). Foram variadas as concentrações de ATP e Mg^{2+} e analisadas as velocidades iniciais de reação enzimática a fim de se determinar a condição ideal para o estudo cinético dessa enzima (dados não apresentados). Em nossos experimentos, a concentração de 0,8 mM de ATP e Mg^{2+} foi considerada a mais favorável para o estudo da velocidade de fosforilação de adenosina pela adenosina quinase. Assim, os parâmetros enzimáticos (K_m e V_{max}) da adenosina quinase, referentes à adenosina, foram determinados a partir das velocidades iniciais da reação enzimática para diferentes concentrações de substrato (0,1 - 20 μ M de adenosina) e os valores obtidos (Item 4.3.2) se aproximaram daqueles referenciados na literatura para essa enzima (Hurley MC et al., 1983 e 1985; McNally T et al., 1997; Sakowicz M et al., 2001). Feita a caracterização da atividade enzimática da adenosina quinase foi possível propor experimentos *in vitro* para verificar se os compostos anilinoquinazolínicos DMA e PD153035 possuíam efeito inibitório sobre essa enzima. A avaliação da cinética enzimática da adenosina quinase na presença de várias concentrações de DMA e PD153035 permitiu confirmar a atividade inibitória, sobre essa enzima, das anilinoquinazolininas, sugerindo ser este efeito altamente específico ($IC_{50} = 1,2$ pM).

No presente estudo, foi possível demonstrar um provável mecanismo através do qual o composto anilinoquinazolínico mimetiza os efeitos da adenosina, por aumentar a disponibilidade desse nucleosídeo no tecido alvo. Atualmente não há registros na literatura demonstrando efeito inibitório das anilinoquinazolinas sobre a atividade da adenosina quinase. Por outro lado, outras classes de compostos, como pirido-pirimidinas e derivados da adenosina (5-iodo-tubercidina), são identificados como inibidores de adenosina quinase. Estes foram considerados potentes inibidores da adenosina quinase, possuindo valores de IC_{50} abaixo $0,01 \mu M$. Os valores de IC_{50} obtidos com o DMA e PD153035 indicam que compostos dessa classe química também inibem a fosforilação da adenosina com igual ou maior potência. No entanto, permanece por ser esclarecido se as anilinoquinazolinas inibem a atividade da adenosina quinase ou por interferência no sítio de ligação da adenosina ou no sítio do ATP. Os ensaios cinéticos preliminares contribuem para uma interpretação desse mecanismo, mas não comprovam, de forma direta, em qual sítio de ligação o composto tem mais afinidade. Juntamente com os dados experimentais, é necessário um estudo de “relação estrutura-atividade” do composto para avaliação da afinidade de ocupação de um dos dois sítios de ligação da enzima.

Os compostos quinazolínicos foram inicialmente descritos como inibidores de receptores tipo tirosina-quinases e identificados como uma nova estratégia terapêutica para o controle da proliferação tumoral. Sabemos que a confirmação da atividade inibitória das anilinoquinazolinas sobre adenosina quinase coloca em evidência a importante questão da especificidade. Sendo assim, é fundamental para o desenvolvimento de uma droga, que se determinem e comparem os efeitos e potência das anilinoquinazolinas sobre a atividade da adenosina quinase e de tirosina-quinases. Estudos preliminares realizados em nosso laboratório de avaliação do efeito do DMA sobre a autofosforilação *in vitro* do receptor do fator de crescimento endotelial (EGFR) indicaram que não há uma inibição da atividade de fosforilação dessa proteína em relação ao aumento da concentração do composto (dados não apresentados).

Confirmada a hipótese de que os compostos anilinoquinazolínicos inibem a atividade da adenosina quinase *in vitro*, realizamos experimentos *in vivo* para avaliar se o DMA aumenta a disponibilidade de adenosina em alguns tecidos específicos. A forma de

administração e o tempo de coleta dos tecidos foram determinados em um estudo farmacocinético que avaliou a absorção e distribuição do DMA em plasma de ratos (Dados não apresentados). Este estudo foi baseado em um trabalho semelhante desenvolvido por nosso grupo que validou um método de detecção, por HPLC, de outro derivado anilinoquinazolinico, o PD153035, em plasma de ratos (Rocco AS et al., 2005). Assim, foi possível determinar o perfil da concentração plasmática de DMA, em vários tempos, após a administração do composto e também apontar o tempo em que o perfil da concentração plasmática do composto seja relevante, farmacologicamente, para seu efeito máximo esperado. Por esse método, foi possível verificar que após 15 minutos da administração, o DMA já pode ser detectado no plasma. A concentração máxima ($C_{m\acute{a}x.}$) do DMA detectada foi de 22,90 μM no período de 3 horas ($T_{m\acute{a}x.}$), sendo que o composto ainda permanece no plasma por um período superior a 7 horas. Alguns parâmetros farmacocinéticos (considerando dose oral) importantes foram determinados e os resultados são: o DMA apresentou uma absorção rápida com um valor de $t_{1/2a}$ de 12,83 minutos e uma velocidade de eliminação moderadamente rápida com um valor de $t_{1/2}$ de 63 minutos.. O valor do t_{lag} foi de 14 minutos. Na prática, o t_{lag} representa o tempo de “espera” (frequentemente de 10-20 min.) para o fluxo de qualquer composto (via oral) no corpo, ou seja, é a dissolução da droga no fluido intestinal e o transporte através do mesmo antes que qualquer quantidade apareça na região de amostragem. Com isso, a padronização de um método para a extração de derivados de anilinoquinazolininas de amostras de plasma de ratos, seguido de separação e quantificação em HPLC de fase reversa, certamente contribuiu para uma investigação detalhada da farmacocinética desta classe de compostos. Juntamente com a análise da concentração plasmática de DMA, foi feita uma quantificação temporal do perfil de adenosina de corações de animais tratados com o composto (Dados não apresentados). Com todos os dados farmacocinéticos do DMA obtidos, foi padronizado que os ratos recebessem dose única por gavagem de DMA (30mg/Kg) e, os tecidos, coração e fígado fossem coletados, após 1 hora à gavagem, para a análise do perfil de adenosina. Especificamente para o cérebro, a análise das amostras após 1 hora ao tratamento com DMA mostrou que não havia alteração significativa do perfil de adenosina tecidual. Neste caso, o tempo de tratamento dos animais foi estendido para 3 horas. Com isto, foi possível constatar que existe uma diferença, em relação aos outros tecidos estudados, no tempo do

efeito de anilinoquinazolininas no cérebro, possivelmente pela presença da barreira hematoencefálica. No entanto, serão necessários estudos farmacocinéticos mais detalhados para a confirmação desta hipótese.

Novamente, desenvolvemos um método de HPLC, neste caso, com detecção por fluorescência da adenosina. A reação da adenina e de seus compostos correlatos (ATP, ADP, AMP e adenosina) com 2-cloroacetaldeído conduz aos derivados N^1,N^6 -etenopurínicos altamente fluorescentes (Katayama M et al., 2001). Essa reação aumenta consideravelmente a sensibilidade do método de HPLC para detecção de compostos purínicos. Nesse caso, também nos baseamos em relatos existentes na literatura que indicam a utilização do método de HPLC combinado com a detecção por fluorescência para dosagem de compostos purínicos em amostras biológicas diversas. No entanto, a maioria desses trabalhos emprega várias etapas analíticas associadas a diversos procedimentos técnicos para a extração de purinas teciduais. De certa forma, são métodos pouco seletivos e que demandam maiores custos e longos períodos de preparo das amostras para a análise (Delabar U et al., 1999; Katayama M et al., 2001; Bobalova J et al., 2002; Haink G e Deussen A, 2003; Czarnecka J et al., 2005). O método desenvolvido nesse trabalho apresenta vantagens em relação aos descritos na literatura, como a simples extração líquido-sólido de derivados purínicos de diversos tecidos, utilizando somente o tampão fosfato da fase móvel, sem o emprego, portanto, de ácido perclórico. Adicionalmente, foi possível a separação de ATP, ADP, AMP e adenosina sem a adição de pareadores iônicos, como TBAB (brometo de tetrabutilamônio), comumente usados nesse tipo de análise. O tampão fosfato da fase móvel juntamente com o emprego do gradiente de metanol de 2% até 15%, contribuiu para separar e resolver os picos dos compostos de interesse. Com isso, conseguimos uma boa recuperação de extração de adenosina em tecidos de ratos e seletividade das análises dos compostos.

As purinas intra e extracelulares como ATP e adenosina, podem regular tanto processos fisiológicos como patológicos. A ação e caracterização dos efeitos da adenosina, bem como as possíveis alternativas terapêuticas que modulam sua concentração em diversos tecidos e sistemas, pela ação de agentes farmacológicos específicos, são amplamente descritas na literatura. Neste contexto, o sistema nervoso, cardiovascular, renal

e hepático são alvos desse estudo (Peart JN e Gross GJ, 2005; Borowiec A et al., 2006; Boison D, 2007). No entanto, não há uma pesquisa comparativa mais detalhada que aponte as diferenças no perfil de adenosina e seus nucleotídeos entre esses sistemas e que, desta forma, se estabeleça o papel crítico desses compostos nos vários tecidos (Ingwall JS, 2004; Kodde IF et al., 2007). Com o método de HPLC validado neste trabalho, foi possível visualizar que, em condições fisiológicas, coração, fígado e cérebro possuem perfil energético e de adenosina distintos. Com isso, fica claro que a modulação da concentração das purinas por substâncias químicas também pode ser distinta, em função das diferenças quantitativas no perfil e no metabolismo energético de cada sistema. Portanto, foi possível confirmar que o DMA, quando administrado por via oral, aumenta, de maneira diferente, a concentração de adenosina de alguns tecidos de ratos, bem como em corações isolados quando perfundidos também com o composto. Esse dado confirmou a hipótese de que os efeitos de proteção miocárdica observados em corações isolados tratados com DMA são, possivelmente, mediados por um aumento da adenosina tecidual.

6- CONCLUSÃO

Com base em nossos achados podemos concluir que os compostos derivados de anilinoquinazolinas DMA e PD153035 inibem a atividade da adenosina quinase em baixas concentrações, sugerindo um efeito específico e que a administração sistêmica de DMA provocou aumento da disponibilidade de adenosina, possivelmente pela inibição da adenosina quinase, em tecidos e em órgão isolado de ratos. Tendo em vista a importância dos efeitos da adenosina sobre o sistema biológico e a confirmação da potência e seletividade de compostos anilinoquinazolínicos como inibidores de adenosina quinase, pode-se sugerir o potencial uso terapêutico desses compostos em doenças, cuja origem esteja relacionada com alterações da concentração de adenosina celular.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adair TH. An emerging role for adenosine in angiogenesis. *Hypertension* 2004; 44: 618-620.

Adair TH. Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: 283-296.

Andres CM, Palella TD, Fox IH. Human placental adenosine kinase: purification and characterization. *Adv Exp Med Biol* 1979; 122B:41-43.

Ballard P, Bradbury RH, Harris CS, Hennequin LF, Hickinson M, Johnson PD *et al.* Inhibitors of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase: Novel C-5 substituted anilinoquinazolines designed to target the ribose pocket. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16(6): 1633-1637.

Barker AJ, Gibson KH, Grundy W, Godfrey AA, Woodburn JR, Ashton SE *et al.* Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11(14): 1911-1914.

Belardinelli L, Linden J, Berne RM. The cardiac effects of adenosine. *Prog Cardiovasc Dis* 1989; 32: 73-97.

Bobalova J, Bobal P, Mutafova-Yambolieva VN. High-performance liquid chromatographic technique for detection of a fluorescent analogue of ADP-ribose in isolated blood vessel preparations. *Anal Biochem* 2002; 305(2): 269-276.

Bolognesi M L, Marucci G, Angeli P, Buccioni M, Minarini A, Rosini M *et al.* Analogues of Prazosin that bear a benextramine-related polyamine backbone exhibit different antagonism toward α_1 -adrenoreceptor subtypes. *J Med Chem* 2001; 44: 362-371.

Borowiec A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Skladanowski AC. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol* 2006; 53 (2):269-78.

Bourrinet P, Feldman H, Dencausse A, Chambon C, Bonnemain B. High-performance liquid chromatographic determination of iobitridol in plasma, urine and bile. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 670(2): 369-372.

Boison D, Scheurer L, Tseng JL, Aebischer P, Mohler H. Seizure suppression in kindled rats by intraventricular grafting of an adenosine releasing synthetic polymer. *Exp Neurol* 1999; 160(1): 164-174.

Boison D, Scheurer L, Zumsteg V, Rulicke T, Litynski P, Fowler B *et al.* Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99(10):6985-6990.

Boison D. Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27(12): 652-658.

Boison D. Adenosine-based cell therapy approaches for pharmacoresistant epilepsies. *Neurodegener Dis* 2007; 4 (1): 28-33.

Boyle DL, Kowaluk EA, Jarvis MF, Lee CH, Bhagwat SS, Williams M, Firestein GS. Anti-inflammatory effects of ABT-702, a novel non-nucleoside adenosine kinase inhibitor, in rat adjuvant arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296 (2): 495-500.

Bridges AJ, Zhou H, Cody DR, Rewcastle GW, McMichael A, Showalter HD *et al.* Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure-activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor. *J Med Chem* 1996; 39(1): 267-276.

Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64 (12): 1471-1483.

Caputto R. The enzymatic synthesis of adenylic acid; adenosinekinase. *J Biol Chem* 1951; 189 (2): 801-814.

Chang C, Geahlen RL. Protein-tyrosine kinase inhibition: mechanism-based discovery of antitumor agents. *J Nat Prod* 1992; 55(11): 1529-1560.

Chen CL, Malaviya R, Chen H, Liu XP, Uckun FM. Pharmacokinetics and biologic activity of the novel mast cell inhibitor, 4-(3-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline in mice. *Pharm Res* 1999; 16(1): 117-122.

Chen CL, Malaviya R, Chen H, Liu XP, Uckun FM. Quantitative high-performance liquid chromatographic method for pharmacokinetic studies of the potent mast cell inhibitor 4-(4'-hydroxyphenyl)amino-6,7-dimethoxyquinazoline (WHI-P131). *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 727(1-2): 205-12.

Chen Y, Bache RJ. Adenosine, a modulator of the cardiac response to stress. *Cir Res* 2003; 93 (8): 691-693.

Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22: 3099-3108.

Ciardiello F. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs* 2000; 60 Suppl 1: 25-32; discussion 41-42.

Conlon BA, Ross JD, Law WR. Advances in understanding adenosine as a plurisystem modulator in sepsis and the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Front Biosci* 2005; 30: 2548-2565.

Cottam HB, Wasson DB, Shih HC, Raychaudhuri A, Di Pasquale G, Carson DA. New adenosine kinase inhibitors with oral antiinflammatory activity: synthesis and biological evaluation. *J Med Chem* 1993 ; 36 (22): 3424-3430.

Cowart M, Lee CH, Gfesser GA, Bayburt EK, Bhagwat SS, Stewart AO. Structure-Activity Studies of 5-Substituted Pyridopyrimidines as Adenosine Kinase Inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11(1): 83-86.

Cross HR, Murphy E, Black RG, Auchampach J, Steenbergen C. Overexpression of A(3) adenosine receptors decreases heart rate, preserves energetics, and protects ischemic hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(4): H1562-1568.

Czarnecka J, Cieslak M, Michal K. Application of solid phase extraction and high-performance liquid chromatography to qualitative and quantitative analysis of nucleotides and nucleosides in human cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 822 (1-2): 85-90.

De Jong JW, de Jonge R, Keijzer E, Bradamante, S. The role of adenosine in preconditioning. *Pharmacol Ther* 2000; 87 (2-3): 141-149.

De Jonge R, Bradamante S, Speleman L, de Jong JW. Carbohydrates and purines in underperfused hearts, protected by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(3): 699-708.

- Delabar U, Kloor D, Luippold G, Muhlbauer B. Simultaneous determination of adenosine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in biological samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 724 (2): 231-238.
- Deussen A, Stappert M, Schafer S, Kelm M. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 1999; 99(15): 2041-2047.
- Deussen A. Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000a; 362 (4-5): 351-363.
- Deussen A. Quantitative integration of different sites of adenosine metabolism in the heart. *Ann Biomed Eng* 2000b; 28(8): 877-883.
- Donato M, Gelpi RJ. Adenosine and cardioprotection during reperfusion--an overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 251 (1-2):153-159.
- Drews J. Drug discovery: a historical perspective. *Science* 2000; 287 (5460): 1960-1964.
- Drury A, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 1929; 68: 213–237.
- Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci* 2001; 24: 31–55.
- Dutta PR, Maity A. Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett.* 2007; 254 (2): 165-177.
- Ellis AG, Nice EC, Weinstock J, Levitzki A, Burgess AW, Webster LK. High-performance liquid chromatographic analysis of the tyrphostin AG1478, a specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in mouse plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 754 (1): 193-199.
- Feigl EO. Berne's adenosine hypothesis of coronary blood flow control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1891–H1894.

Firestein GS, Boyle D, Bullough DA, Gruber HE, Sajjadi F.G, Montag A, Sambol B *et al.* Protective effect of an adenosine kinase inhibitor in septic shock. J. Immunol 1994; 152: 5853-5859.

Franchini KG, Marin RM, Saad MJA, Rittner R, Rocco SA. Compounds 4-anilinoquinazoline derivatives with adenosine kinase inhibitory properties. PCT/BR2004/00019, 2004.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacol Rev 2001; 53 (4): 527-552.

Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. Cell Death Differ 2007; 14 (7): 1315-1323.

Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad and the ugly. Annu Rev Physiol 2003; 65: 45-79

Fry DW, Kraber AJ, McMichael A, Ambroso LA, Nelson JM, Leopold WR. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Science 1994; 265 (5175): 1093-1095.

Fry DW. Inhibition of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases as an approach to cancer chemotherapy: progression from reversible to irreversible inhibitors. Pharmacol Ther 1999; 82 (2-3): 207-218.

Gazit A, Chen J, App H, McMahon G, Hirth P, Chen I, Levitzki A. Tyrphostins IV-highly potent inhibitors of EGF receptor kinase. Structure-activity relationship study of 4-anilidoquinazolines. Bioorg Med Chem 1996; 4(8): 1203-7120.

Glennon RA, Metwally K, Dukat M, Ismaiel AM, De los Angeles J, Herndon J, Teitler M, Khorana N. Ketanserin and spiperone as templates for novel serotonin 5-HT(2A) antagonists. Curr Top Med Chem 2002; 2(6):5 39-558.

Golembiowska K, White TD, Sawyonok J. Adenosine kinase inhibitors augment release of adenosine from spinal cord slices. Eur J Pharmacol. 1996 27; 307 (2): 157-162.

- Gomtsyan A, Didomenico S, Lee CH, Stewart AO, Bhagwat SS, Kowaluk EA, Jarvis, M.F. Synthesis and biological evaluation of pteridine and pyrazolopyrimidine based adenosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2004a; 14(16): 4165-4168.
- Gomtsyan A, Lee CH. Nonnucleoside inhibitors of adenosine kinase. *Curr Pharm* 2004b; 10 (10): 1093-1103.
- Gouder N, Scheurer L, Fritschy JM, Boison D. Overexpression of adenosine kinase in epileptic hippocampus contributes to epileptogenesis. *J Neurosci* 2004; 24 (3): 692-701.
- Gross ER, Gross GJ. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 2006; 70(2): 212-221.
- Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S, Sandberg M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem* 1987; 49 (1): 227-231.
- Hajduk PJ, Gomtsyan A, Didomenico S, Cowart M, Bayburt EK, Solomon L *et al.* Design of adenosine kinase inhibitors from the NMR-based screening of fragments. *J Med Chem* 2000; 43, 4781-4786.
- Haink G, Deussen A. Liquid chromatography method for the analysis of adenosine compounds. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 784(1): 189-193.
- Hawkins CF, Bagnara AS. Adenosine kinase from human erythrocytes: kinetic studies and characterization of adenosine binding sites. *Biochemistry* 1987; 26 (7): 1982-1987.
- Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H1797-H1818.
- Henderson JF, Mikoshiba A, Chu SY, Caldwell IC. Kinetic studies of adenosine kinase from Ehrlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 1972; 247: 1972-1975.
- Hempel A, Camerman N, Mastropaolo D, Camerman A. The antifolate trimetrexate: observation of the enzyme-binding conformation. *Acta Crystallogr C* 2000; 56 (Pt 10):1225-1227.

Hurley MC, Palella TD, Fo, IH. Human placental deoxyadenosine and deoxyguanosine phosphorylating activity. *J Biol Chem* 1983; 258 (24):15021-15027.

Hurley MC, Lin B, Fox IH. Regulation of deoxyadenosine and nucleoside analog phosphorylation by human placental adenosine kinase. *Adv Exp Med Biol* 1985; 195 Pt B:141-149.

Ingwall JS. Transgenesis and cardiac energetics: new insights into cardiac metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37 (3): 613-623.

Ionescu-Pioggia M, Bird M, Orzack MH, Benes F, Beake B, Cole JO. Methaqualone. *Int Clin Psychopharmacol* 1988; 3 (2): 97-109.

Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(3): 247-264.

Janne PA, von Pawel J, Cohen RB, Crino L, Butts CA, Olson SS et al.. Multicenter, randomized, phase II trial of CI-1033, an irreversible pan-ERBB inhibitor, for previously treated advanced non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25 (25): 3936-3944.

Jarvis MF, Yu H, Kohlhaas K, Alexander K, Lee CH, Jiang M *et al.* ABT-702 (4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2, 3-d]pyrimidine), a novel orally effective adenosine kinase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory properties: I. In vitro characterization and acute antinociceptive effects in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 1156-1164.

Jarvis MF, Mikusa J, Chu KL, Wismer CT, Honore P, Kowaluk EA *et al.* Comparison of the ability of adenosine kinase inhibitors and adenosine receptor agonists to attenuate thermal hyperalgesia and reduce motor performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73 (3): 573-581.

Jehl F, Debs J. Determination of navelbine and desacetylnavelbine in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr* 1990; 525 (1): 225-233.

Jessup M, Brozena S. Medical Progress: heart failure. *N Engl J Med* 2003; 348: 2007-2018.

Joosen MJ, Bueters TJ, Van Helden HP. Cardiovascular effects of the adenosine A1 receptor agonist N6-cyclopentyladenosine (CPA) decisive for its therapeutic efficacy in sarin poisoning. *Arch Toxicol* 2004; 78: 34-39.

Kaiser SM, Quinn RJ. Adenosine receptors as potential therapeutic targets. *Drug Discov Today* 1999; 12: 542-551.

Katayama M, Matsuda Y, Shimokawa K, Tanabe S, Kaneko S, Hara I, Sato H. Simultaneous determination of six adenylyl purines in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence derivatization. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 760(1): 159-163.

Kawamoto Y, Shinozuka K, Kunitomo M, Haginaka J. Determination of ATP and its metabolites released from rat caudal artery by isocratic ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1998; 262 (1): 33-38.

Kiessling P, Scriba GK, Suss F, Werner G, Knoth H, Hartmann M. Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay and a capillary electrophoresis assay for the analysis of adenosine and the degradation product adenine in infusions. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 36 (3):535-539.

Kim SK, Novak RF. The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol Ther* 2007; 113 (1): 88-120.

Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 2002; 14(2): 99-108.

Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2, *Circulation* 2001; 104(25): 3158-3167.

Klutchko SR, Zhou H, Winters RT, Tran TP, Bridges AJ, Althaus IW et al. *J Med Chem* 2006; 49(4): 1475-1485.

Kobayashi T, Yamada T, Okada Y. The levels of adenosine and its metabolites in the guinea pig and rat brain during complete ischemia-in vivo study. *Brain Res* 1998; 787 (2): 211-219.

Kodde IF, van der Stok J, Smolenski RT, de Jong JW. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007;146 (1): 26-39.

Kornberg A, Pricer WE Jr. Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside. *J Biol Chem* 1951; 193 (2): 481-95.

Kowaluk EA, Bhagwat SS, Jarvis MF. Adenosine kinase inhibitors. *Curr. Pharm. Des* 1998; 4: 403-416.

Kowaluk EA, Mikusa J, Wismer CT, Zhu CZ, Schweitzer E, Lynch JJ et al. ABT-702 (4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholino-pyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidine), a novel orally effective adenosine kinase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory properties. II. In vivo characterization in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2000a; 295 (3): 1165-74.

Kowaluk EA, Jarvis MF. Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2000b; 9 (3):551-564.

Krett NL, Davies KM, Ayres M, Ma C, Nabhan C, Gandhi V, Rosen ST. 8-amino-adenosine is a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther* 2004; 3: 1411-1420.

Labaune, J.P. *Farmacocinética*, Andrei Editora LTDA 1993.

Lee CH, Jiang M, Cowart M, Gfesser G, Perner R, Kim KH. Discovery of 4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholino-pyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidine, an orally active, non-nucleoside adenosine kinase inhibitor. *J Med Chem* 2001; 44 (13): 2133-2138.

Leite F. *Validação em análise química*. Campinas, SP: Editora Átomo; 2002. p.13-278.

Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995; 267 (5205): 1782-1788.

Levitzki A. Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 1999; 82 (2-3): 231-239.

Lloyd HG, Lindstrom K, Fredholm BB. Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or energy depletion. *Neurochem Int* 1993; 23: 173–185.

Lloyd HG, Fredholm BB. Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochem Int*. 1995; 26 (4): 387-395.

Lin BB, Hurley MC, Fox IH. Regulation of adenosine kanase by adenosine analogs. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 501-505.

Liao Y, Takashima S, Asano Y, Asakura M, Ogai A, Shintani Y et al. Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Circ Res* 2003; 93 (8): 759-766.

Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 775-787.

Mackiewicz M, Nikonova EV, Zimmerman JE, Galante RJ, Zhang L, Cater JR *et al*. Enzymes of adenosine metabolism in the brain: diurnal rhythm and the effect of sleep deprivation. *J Neurochem* 2003; 85 (2): 348-357.

Maguire MH, Westermeyer FA, King CR. Measurement of adenosine, inosine and hypoxanthine in human term placenta by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1986; 380 (1): 55-66.

Maj M, Singh B, Gupta RS. The influence of inorganic phosphate on the activity of adenosine kinase. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1476 (1): 33-42.

Maj MC, Singh B, Gupta RS. Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: identification of a novel motif implicated in phosphate and magnesium ion binding and substrate inhibition. *Biochemistry* 2002; 41 (12): 4059-4069.

Marin RM. Efeitos de compostos quinazolínicos com propriedades inibidoras de tirosina quinase em corações isolados de ratos [Tese - Mestrado]. Campinas (SP): Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP; 2003.

Marin RM, Franchini KG. Reduced Oxygen Supply Explains the Negative Force-Frequency Relation and the Positive Inotropic Effect of Adenosine in Buffer Perfused Hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289 (1): H131-136.

Marin RM, Franchini KG, Rocco SA. Analysis of adenosine by RP-HPLC method and its application to the study of adenosine kinase kinetics. *J Sep Sci* 2007; 30 (15): 2473-2479.

Mathews II, Erion MD, Ealick SE. Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution. *Biochemistry* 1998; 37 (45): 15607-15620.

Mattig S, Knoefler R, Deussen A. Modulation of adenine nucleotide concentrations in human plasma by erythrocytes and endothelial cells. *Thromb Res* 2003; 110 (4): 195-202.

McCallion K, Harkin DW, Gardiner KR. Role of adenosine in immunomodulation: review of the literature. *Crit Care Med* 2004; 32 (1): 273-277.

McGaraughty S, Cowart M, Jarvis MF. Recent developments in the discovery of novel adenosine kinase inhibitors: mechanism of action and therapeutic potential. *CNS Drug Ver* 2001; 7 (4): 415-432.

McGaraughty S, Cowart M, Jarvis MF, Berman RF. Anticonvulsant and antinociceptive actions of novel adenosine kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2005; 5: 43-58.

McMurray J, Pfeffer MA. New therapeutic options in congestive heart failure: Part II. *Circulation* 2002; 105 (18): 2223-2228.

McNally T, Helfrich RJ, Cowart M, Dorwin AS, Meuth JL, Idler KB *et al.* Cloning and expression of the adenosine kinase gene from rat and human tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231 (3): 645-650.

Miller RL, Adamczyk DL, Miller WH, Koszalka GW, Rideout JL, Beacham LM 3rd *et al.* Adenosine kinase from rabbit liver. II. Substrate and inhibitor specificity. *J Biol Chem* 1979; 254 (7): 2346-2352.

Minarini A, Budriesi R, Chiarini A, Leonardi A, Melchiorre C. Search for alpha 1-adrenoceptor subtypes selective antagonists: design, synthesis and biological activity of cystazosin, an alpha 1D-adrenoceptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8 (11): 1353-1358.

- Mohri K, Takeuchi K, Shinozuka K, Bjur RA, Westfall DP. Simultaneous determination of nerve-induced adenine nucleotides and nucleosides released from rabbit pulmonary artery. *Analyt Bioch* 1993; 210: 262-267.
- Monahan TS, Sawmiller DR, Fenton RA, Dobson JGJ. Adenosine A_{2a}-receptor activation increases contractility in isolated perfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: 1472–1481.
- Morrison RR, Talukder MAH, Ledent C, Mustafa SJ. Cardiac effects of adenosine in A_{2A} receptor knockout hearts: uncovering A_{2B} receptors, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: 437–444.
- Moser GH, Schrader J, Deussen A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* 1989; 256: C799-806.
- Mouchard-Delmas C, Gourdier B, Vistelle R. Determination of vinorelbine in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 663 (2): 390-394.
- Moyer JD, Barbacci EG, Iwata KK, Arnold L, Boman B, Cunningham A. *et al.* Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001; 52 (1): 25-39.
- Muchmore SW, Smith RA, Stewart AO, Cowart MD, Gomtsyan A, Matulenko MA *et al.* Crystal structures of human adenosine kinase inhibitor complexes reveal two distinct binding modes. *J Med Chem* 2006; 49 (23): 6726-6731.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger – Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 3ª edição, 2002.
- Newby AC. Adenosine and the concept of retaliatory metabolites. *Trends Biochem Sci* 1984; 9: 42-44.
- Nomoto Y, Obase H, Takai H, Tadashi H, Teranishi M, Nakamura J. Studies on cardiotonic agents. I. Synthesis of some quinazoline derivatives. *Chem Pharm Bull* 1990; 38 (6): 1591-1595.

Palella TD, Andres CM, Fox .H. Human placental adenosine kinase. Kinetic mechanism and inhibition. *J Biol Chem* 1980; 10; 255 (11): 5264-5269.

Park J, van Koeeverden P, Singh B, Gupta RS. Identification and characterization of human ribokinase and comparison of its properties with *E. coli* ribokinase and human adenosine kinase. *FEBS Lett.* 2007; 581 (17): 3211-3216.

Park J, Vaidyanathan G, Singh B, Gupta RS. Identification and biochemical studies on novel non-nucleoside inhibitors of the enzyme adenosine kinase. *Protein J* 2007; 26 (3): 203-212.

Peart J, Willems L, Headrick JP. Receptor and non-receptor-dependent mechanisms of cardioprotection with adenosine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H519–H527.

Peart JN, Gross GJ. Cardioprotection following adenosine kinase inhibition in rat hearts. *Basic Res Cardiol* 2005; 100 (4): 328-336.

Peart JN, Headrick JP. Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways. *Pharmacol Ther* 2007; 114 (2): 208-221.

Quintana M, Kahan T, Hjemdahl P. Pharmacological prevention of reperfusion injury in acute myocardial infarction. A potential role for adenosine as a therapeutic agent. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004; 4 (3): 159-167.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50(3):413-492.

Ralevic V, Burnstock G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect* 2003; 16 (3): 133-140.

Ranson M, Wardell S. Gefitinib, a novel, orally administered agent for the treatment of cancer. *J Clin Pharm Ther* 2004; 29 (2): 95-103.

Rapundalo ST. Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 1998; 38 (3): 559-88.

Raymond E, Sandrine F, Armand JP. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs* 2000; 60 Suppl 1: 15-23; discussion 41-2.

Reichelt ME, Willems L, Molina JG, Sun CX, Noble JC, Ashton KJ *et al.* Genetic deletion of the A1 adenosine receptor limits myocardial ischemic tolerance. *Circ Res* 2005; 96 (3): 363-367.

Rewcastle GW, Denny WA, Bridges AJ, Zhou H, Cody DR, Fry DW. Tyrosine kinase inhibitors. 5. Synthesis and structure-activity relationships for 4-[(phenylmethyl)amino]- and 4-(phenylamino)quinazolines as potent adenosine 5'-triphosphate binding site inhibitors of the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor. *J Med Chem* 1995; 38 (18): 3482-3487.

Reynolds MM, Sloan D, Theleman A, Miller P. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358, 774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 1997; 57 (21): 4838-4848.

Rocco SA. Estudos de ressonância magnética multinuclear de quinazolinias poli-substituídas e propriedades biológicas [Tese de Doutorado]. Campinas (SP): Instituto de Química – UNICAMP; 2002.

Rocco AS, Barbarini JE, Rittner R. Syntheses of some 4-anilinoquinazoline derivatives *Synthesis* Stuttgart 2004; (3): 429-435.

Rocco SA, Velho JA, Marin RM, Rolin Filho LA, Vercesi AE, Rittner R, Franchini KG. High performance liquid chromatography analysis of a 4-anilinoquinazoline derivative (PD153035), a specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in rat plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 817 (2): 297-302.

Rolim Filho LR. Mecanismos de proteção miocárdica de anilinoquinazolinias em corações isolados de ratos [Tese - Mestrado]. Campinas (SP): Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP; 2005.

Rosenberg J, Gustafsson F, Galatius S, Hildebrandt PR. Combination therapy with metolazone and loop diuretics in outpatients with refractory heart failure: an observational study and review of the literature. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005; 19 (4): 301-306.

Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW; AMISTAD-II Investigators. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol* 2005; 45 (11): 1775-1780.

- Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annual Review of Physiology* 1997; 59: 551-571.
- Safran N, Shneyvays V, Balas N, Jacobson A, Nawrath H, Shainberg A. Cardioprotective effects of adenosine A1 and A3 receptor activation during hypoxia in isolated rat cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* 2001; 217 (1-2): 143-152.
- Sakowicz M, Grden M, Pawelczyk T. Expression level of adenosine kinase in rat tissues. Lack of phosphate effect on the enzyme activity. *Acta Biochim Pol* 2001; 48 (3): 745-754.
- Sartore-Bianchi A, Ricotta R, Cerea G, Maugeri MR, Siena S. Rationale and clinical results of multi-target treatments in oncology. *Int J Biol Markers* 2007; 22 (1 Suppl 4): S77-87.
- Sawynok J. Adenosine receptor activation and nociception. *Eur J Pharmacol* 1998; 347 (1): 1-11.
- Sequist LV. Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2007; 12 (3): 325-330.
- Schutz W, Schrader J, Gerlach E. Different sites of adenosine formation in heart. *Am J Physiol* 1981; 240: H963-H970.
- Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ et al. *Pharm. Res.* 2000; 17, 1551–1557.
- Shewchuk L, Hassell A, Wisely B, Rocque W, Holmes W, Veal J. Binding mode of the 4-anilinoquinazoline class of protein kinase inhibitor: X-ray crystallographic studies of 4-anilinoquinazolines bound to cyclin-dependent kinase 2 and p38 kinase. *J Med Chem* 2000; 43 (1): 133-138.
- Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 1997; 79 (12A): 2-10.
- Simpson RC, Brown PR. High-performance liquid chromatographic profiling of nucleic acid components in physiological samples. *J. Chromatogr* 1986; 379: 269-311.
- Smaill JB, Rewcastle GW, Bridges AJ, Zhou H, Showalter HDH, Fry DW et al. Tyrosine kinase inhibitors. 17. Irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor: 4-(phenylamino)quinazoline- and 4-(phenylamino)pyrido[3,2-d]pyrimidine-6-acrylamides bearing additional solubilizing functions. *J Med Chem* 2000; 43 (7): 1380-1397.

Smolenski RT, Lachno DR, Ledingham SJ, Yacoub MH. Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation. *J Chromatogr* 1990; 527 (2): 414-420.

Snyder SH. Adenosine as a neuromodulator. *Ann Rev Neurosci* 1985; 8: 103-124.

Spychala J, Datta NS, Takabayashi K, Datta M, Fox IH, Gribbin T, Mitchell BS. Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (3): 1232-1237.

Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005; 85 (3): 1093-1129.

Takase Y, Saeki T, Watanabe N, Adachi H, Souda S, Saito I. Cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors. 2. Requirement of 6-substitution of quinazoline derivatives for potent and selective inhibitory activity. *J Med Chem* 1994; 37: 2106-2122.

Toledo LM, Lydon NB, Elbaum D. The structure-based design of ATP-site directed protein kinase inhibitors. *Curr Med Chem*. 1999; 6 (9): 775-805.

Tomiya N, Ailor E, Lawrence SM, Betenbaugh MJ, Lee YC. Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosylation by high-performance anion-exchange chromatography: sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells. *Anal Biochem* 2001; 293 (1): 129-137.

Tornatore TF, Efeitos do tratamento com DMA (6,7-dimetóxi-4-(*N,N*-dimetilfenil)aminoquinazolina) na aterosclerose em camundongos LDLr-/- [Tese - Mestrado]. Campinas (SP): Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP; 2006.

Tsou HR, Mamuya N, Johnson BD, Reich MF, Gruber BC, Ye F et al. 6-Substituted-4-(3-bromophenylamino)quinazolines as putative irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and human epidermal growth factor receptor (HER-2) tyrosine kinases with enhanced antitumor activity. *J Med Chem* 2001; 44 (17): 2719-2734.

Ugarkar BG, DaRe JM, Kopcho JJ, Browne CE, Schanzer JM, Wiesner JB *et al.* Adenosine kinase inhibitors. 1. Synthesis, enzyme inhibition, and antiseizure activity of 5-iodotubercidin analogues. *J. Med. Chem* 2000; 43: 2883-2893.

Ugarkar BG, Castellino AJ, DaRe JS, Ramirez-Weinhouse M, Kopcho JJ, Rosengren S, Erion MD. Adenosine kinase inhibitors. 3. Synthesis, SAR, and antiinflammatory activity of a series of 1-lyxofuranosyl nucleosides. *J Med Chem.* 2003; 46 (22): 4750-4760.

Ukita T, Nakamura Y, Kubo A, Yamamoto Y, Moritani Y, Saruta K *et al.* Novel, potent, and selective phosphodiesterase 5 inhibitors: synthesis and biological activities of a series of 4-aryl-1-isoquinolinone derivatives. *J Med Chem* 2001; 44 (13): 2204-2218.

US Department of Health and Humans Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (2001). <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fn1.pdf>.

Vallon V, Muhlbauer B.; Osswald H. Adenosine and kidney function. *Physiol Rev.* 2006; 86(3): 901-40.

Villarreal F, Zimmermann S, Makhsudova L, Montag AC, Erion MD, Bullough DA, Ito BR. Modulation of cardiac remodeling by adenosine: in vitro and in vivo effects. *Mol Cell Biochem* 2003; 251 (1-2): 17-26.

Volonte MG, Yuln G, Quiroga P, Consolini AE. Development of an HPLC method for determination of metabolic compounds in myocardial tissue. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35 (3): 647-653.

Wagner DR, Bontemps F, van den Berghe G. Existence and role of substrate cycling between AMP and adenosine in isolated rabbit cardiomyocytes under control conditions and in ATP depletion. *Circulation* 1994; 90 (3):1343-1349.

Ward WHJ, Cook PN, Slater AM, Davies H, Holdgate GA, Green LR. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem Pharmacol* 1994; 48 (4): 659-66.

Watanabe N, Adachi H, Takase Y, Ozaki H, Matsukura M, Miyazaki K. et al. 4-(3-Chloro-4-methoxybenzyl)aminophthalazines: synthesis and inhibitory activity toward phosphodiesterase 5. *J Med Chem* 2000; 43 (13): 2523-2529.

Woodburn JR, Barker AJ, Gibson KH. Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 38 (1): 67-73.

Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Signalling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal* 1998; 10: 693-698.

Yan L, Burbiel JC, Maass A, Muller CE. Adenosine receptor agonists: from basic medicinal chemistry to clinical development. *Expert Opin Emerg Drugs* 2003; 8(2): 537-576.

Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83 (4): 1113-1151.

Zheng CJ, Han LY, Yap CW, Ji ZL, Cao ZW, Chen YZ. Therapeutic targets: progress of their exploration and investigation of their characteristics. *Pharmacol Rev* 2006; 58 (2): 259-279.

Zheng GZ, Lee C, Pratt JK, Perner RJ, Jiang MQ, Gomtsyan A et al. Pyridopyrimidine analogues as novel adenosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001; 11 (16): 2071-2074.