

Rodrigo Miguel Marin

**“EFEITOS DE COMPOSTOS QUINAZOLÍNICOS
COM PROPRIEDADES INIBIDORAS DE TIROSINA
QUINASE EM CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS”**

Campinas

2003

RODRIGO MIGUEL MARIN

**“EFEITOS DE COMPOSTOS QUINAZOLÍNICOS COM
PROPRIEDADES INIBIDORAS DE TIROSINA QUINASE EM
CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.*

Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

CAMPINAS

2003



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Membros:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Prof. Dr. Heitor Moreno Jr.

Profa. Dra. Ruth Gazola de Freitas Andrade

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/02/2003

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Mário e Teresa e minhas irmãs Daniela e Talita.

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela sua amizade, compreensão e incentivo durante a realização deste trabalho.

A todos os amigos do laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular pela imensa ajuda dispensada nesses anos.

Aos funcionários e amigos do Núcleo de Biologia e Cirurgia Experimental pela colaboração durante os experimentos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Farmacologia pela atenção dada nesses anos.

À CAPES pelo auxílio financeiro à esse estudo.

À todas as pessoas que acreditaram e me ajudaram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODO.....	30
4. RESULTADOS.....	38
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de E_{max} , EC_{50} e $LogEC_{50}$ na resposta pressora fracional à infusão de concentrações crescentes de DMA, CLQUI e PD153035 em corações isolados de ratos.....	41
Tabela 2. Valores de frequência cardíaca inicial e final em resposta à infusões de concentrações crescentes de DMA, CLQUI e PD153035 em corações isolados de ratos.....	42
Tabela 3-A. Valores de E_{max} , EC_{50} e $LogEC_{50}$ na resposta pressora à infusão de concentrações crescentes de DMA em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro e acrescido de propranolol, diltiazem ou com redução na concentração de cálcio.....	44
Tabela3-B. Valores de frequência cardíaca inicial e final na resposta à infusão de concentrações crescentes de DMA em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro e acrescido de propranolol, diltiazem ou com redução na concentração de cálcio.....	44
Tabela 4. Valores de E_{max} , EC_{50} e $LogEC_{50}$ na resposta pressora fracional à infusão de concentrações crescentes de DMA em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro ou acrescido de propranolol.....	46
Tabela 5. Valores de E_{max} , EC_{50} e $LogEC_{50}$ na resposta pressora fracional à infusão de concentrações crescentes de DMA em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro ou acrescido de diltiazem.....	48
Tabela 6. Valores de E_{max} , EC_{50} e $LogEC_{50}$ na resposta pressora fracional à infusão de concentrações crescentes de DMA em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro ou com baixa concentração de cálcio.....	50

Tabela 7-A. Valores de $E_{\max}$, EC_{50} e $LogEC_{50}$ na resposta pressora fracional à infusão de concentrações crescentes de adenosina em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro ou com tampão HEPES acrescido de 8-F T.....58

Tabela 7-B. Valores de frequência cardíaca inicial e final em resposta à infusão de concentrações crescentes de adenosina em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro e tampão HEPES acrescido de 8-F T.....58

Tabela 8. Valores de frequência cardíaca de experimentos individuais de corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro, tampão HEPES acrescido de 1nM de PD153035 ou tampão HEPES acrescido de 1nM de PD153035 e 1 μ M de 8-F T.....60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismo simplificado de transferência do fosfato terminal do ATP para o grupo OH fenólico do resíduo tirosina.....	20
Figura 2 Estrutura básica da quinazolina e seus isômeros.....	22
Figura 3- Estruturas dos inibidores reversíveis da família do receptor EGF.....	23
Figura 4- Estrutura dos derivados quinazolínicos com propriedades antagonistas para receptores α -adrenérgicos.....	24
Figura 5- Estruturas dos nucleotídeos cíclicos cAMP e cGMP.....	25
Figura 6- Inibidores de fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5).....	26
Figura 7- Estrutura dos compostos quinazolínicos utilizados.....	31
Figura 8- Esquema do sistema de perfusão de coração isolado e registro da pressão ventricular esquerda utilizado.....	32
Figura 9 - Exemplos representativos de registros de pressão sistólica do ventrículo esquerdo de experimentos concentração-efeito de compostos quinazolínicos em coração isolado de rato.....	39
Figura 10- Curvas concentração-resposta ao DMA, CLQUI e PD1503035 sobre a pressão sistólica do ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos.....	41
Figura 11- Curvas concentração-resposta de DMA, CLQUI e PD153035 sobre a frequência cardíaca de corações isolados de ratos.....	42

Figura 12- Curvas concentração-resposta ao DMA em relação à pressão sistólica e frequência cardíaca na presença de propranolol, diltiazem e redução na concentração de cálcio em corações isolados de ratos.....	45
Figura 13- Curvas concentração-resposta ao DMA em relação ao aumento de pressão sistólica de corações isolados controle e perfundidos com propranolol...	47
Figura 14- Curvas concentração-resposta ao DMA em relação ao aumento de pressão sistólica de corações isolados controle e perfundidos com diltiazem.....	49
Figura 15- Curvas concentração-resposta ao DMA em relação ao aumento de pressão sistólica (expressas como resposta fracional) de corações isolados controle e perfundidos com metade da concentração de cálcio no tampão de perfusão.....	51
Figura 16- Gráfico de correlação entre o aumento de pressão sistólica e queda de frequência cardíaca de corações isolados submetidos à injeções de DMA.....	53
Figura 17- Gráficos de correlação entre o aumento de pressão sistólica e queda de frequência cardíaca de corações isolados submetidos a injeções de DMA perfundidos com propranolol, diltiazem e com redução da concentração de cálcio no tampão de perfusão.....	54
Figura 18- Curva concentração-resposta ao DMA em relação a pressão sistólica de corações isolados submetidos a estímulo elétrico.....	55
Figura 19- Curvas concentração-resposta à adenosina (ADO) em relação à pressão sistólica e frequência cardíaca de corações isolados de ratos.....	59

Figura 20- Gráfico representativo das frequências cardíacas de corações isolados de ratos perfundidos com tampão HEPES puro (controle) ou tampão HEPES acrescido de 1nM de PD153035 (PD 1nM) ou tampão HEPES acrescido de 1nM de PD153035 mais 1 μ M de inibidor inespecífico dos receptores de adenosina, 8-fenil-teofilina (*8-F T*) (PD+Inibidor).....64

Figura 21- Exemplos representativos de registros de pressão sistólica do ventrículo esquerdo de experimentos isquemia-reperfusão em corações isolados de ratos controle e perfundidos com PD153035 nas concentrações de 10pM (B), (C) 1nM e (D) 100nM.....67

Figura 22- Exemplo representativo de registro de pressão sistólica do ventrículo esquerdo de experimentos isquemia-reperfusão em corações isolados de ratos perfundidos com 1 μ M de PD153035, acrescido com *8-F T*.....68.

Figura 23- Gráfico representativo do efeito do PD153035 sobre a pressão ventricular esquerda desenvolvida e pressão diastólica de corações isolados controle e perfundidos com 10pM, 1nM e 100nM de PD153035, submetidos a isquemia-reperfusão.....69

Figura 24- Gráfico representativo do efeito do PD153035 sobre a pressão ventricular esquerda desenvolvida e pressão diastólica de corações isolados controle e perfundidos com 1nM PD153035 acrescido de 1 μ M de *8-F T*, submetidos a isquemia-reperfusão.....71

RESUMO

As doenças do miocárdio constituem umas das principais causas de morbidade e mortalidade da população em geral. Hoje, as modalidades farmacológicas disponíveis são eficientes no tratamento dos sintomas, no entanto possuem poucos efeitos sobre a progressão das cardiopatias. Estudos preliminares evidenciam que a interferência nas vias de sinalização celular relacionadas ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares pode ser um alvo potencial para bloquear a progressão, bem como reverter o processo de deterioração funcional e estrutural característicos desta condição clínica.

Atualmente sabe-se que as proteínas tirosina quinases estão amplamente envolvidas em mecanismos de transdução de sinais específicos gerados na célula, bem como na patogenia de diversas doenças como o câncer e do coração.

Neste contexto, a disponibilidade de compostos quinazolínicos com propriedades inibidoras de tirosina quinase permitiu propor estudos com o intuito de avaliar a potencialidade desses fármacos sobre o bloqueio da evolução da insuficiência cardíaca. Primeiramente, para um estudo biológico sistemático, torna-se importante investigar se existem efeitos diretos das quinazolininas sobre o coração. Para tanto, no presente estudo, investigamos os possíveis efeitos de três compostos quinazolínicos; **DMA** – Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-N,N-dimetilfenil)aminoquinazolina; **CLQUI** – 6,7-dimetóxi-4-cloroquinazolina, **PD153035** – Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-bromofenil)aminoquinazolina, sobre a função cardíaca em preparação de coração isolado (Langendorff).

Foram feitos experimentos concentração-resposta de DMA, CLQUI e PD153035 sobre a pressão sistólica do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca de corações isolados de ratos. Todos os compostos testados causaram aumento da pressão ventricular, com diferentes potências para este efeito. O DMA foi o composto que produziu maior resposta pressora quando infundido em concentrações entre 30pM - 2μM (resposta pressora máxima = 27 ± 3 mmHg), enquanto o PD153035 apresentou a menor resposta (resposta pressora máxima = 8 ± 4 mmHg). Também ocorreu diminuição, concentração-dependente, da frequência cardíaca. As respostas bradicárdicas foram de aproximadamente 24%, 29% e 25% para DMA, CLQUI e PD153035, respectivamente, em relação aos valores basais.

Para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos nas respostas pressoras e bradicárdicas, realizamos experimentos concentração-resposta apenas com DMA na presença de β -bloqueador (propranolol) e inibidor do canal tipo-L de cálcio (diltiazem) e também com redução da concentração de cálcio no tampão de perfusão.

No entanto, o aumento da pressão ventricular observado não era dependente da ativação de receptores β -adrenérgicos e nem de receptores de cálcio tipo-L, já que a utilização de propranolol e diltiazem nos experimentos concentração-resposta com DMA em corações isolados, não promoveu o bloqueio do efeito pressor. A redução da concentração de cálcio no tampão de perfusão, apesar de diminuir o efeito pressor do DMA, não nos esclareceu por qual mecanismo a quinazolina estaria atuando para elevar a pressão sistólica dos corações. Por outro lado, observamos que existia uma correlação inversa estreita entre o aumento de pressão ventricular e a queda de frequência cardíaca observada em todos os experimentos. Em experimentos onde a frequência cardíaca foi mantida constante durante a infusão de concentrações crescentes de DMA, através da ação de estimulador elétrico, observamos que este procedimento aboliu a resposta pressora do DMA em corações isolados. Levantamos, então, a hipótese de que o principal efeito desses compostos sobre o coração seria a bradicardia. Com esses dados, obtivemos informações de que a adenosina também produz efeitos, em corações isolados, semelhantes àqueles observados com os compostos quinazolínicos (i.e. bradicardia e aumento da pressão sistólica do ventrículo esquerdo), comprovando este dado através de experimentos concentração-resposta de adenosina (ADO) em coração isolado de rato. Sabe-se que a adenosina exerce papel protetor no miocárdio, principalmente sob condições de injúria como, por exemplo, na isquemia. Uma das possibilidades é a de que o composto quinazolínico estaria atuando de forma direta ou indireta sobre receptores de adenosina.

Realizamos, então, experimentos de isquemia em corações isolados para verificar se a quinazolina também poderia estar protegendo o miocárdio. Optamos, neste caso, pela utilização do PD153035 já que este foi anteriormente caracterizado como um inibidor da atividade das tirosinas quinases e encontra-se atualmente em testes terapêuticos em pacientes com câncer.

Os resultados comprovaram nossa hipótese, revelando o efeito protetor do PD153035 sobre corações isquêmicos a partir de concentrações de 1 nM. Para comprovar esse resultado, utilizamos o inibidor inespecífico dos receptores de adenosina, 8-fenil-teofilina (8-*F T*), em experimentos de isquemia de corações perfundidos com PD153035. A presença do inibidor aboliu o efeito protetor do PD153035 sobre a isquemia do miocárdio.

De maneira geral, estes achados demonstraram que os efeitos cardíacos de compostos quinazolínicos com propriedades inibidoras de tirosina quinase se dão direta ou indiretamente sobre os receptores de adenosina.



ABSTRACT

Heart failure remains to be a major cause of morbidity and mortality worldwide. A variety of drugs have been shown to improve symptoms, but most of them do not interfere in the progress of heart failure. A number a signaling pathway has been shown to contribute to cellular damage and deterioration observed in the cardiac myocytes in heart failure. Several evidences support a role of protein tyrosine kinases (PTKs) in the signaling mechanisms underlying the myocardial dysfunction. In this context, the tyrosine kinases inhibitors may have a key role to block the development of heart diseases.

Thus, this study was designed to investigate the effects of quinazoline compounds, with the ability to inhibit tyrosine kinases, on isolated rat heart (Langendorff preparation). **DMA** – 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-N,N-dimethylphenyl) aminoquinazoline chloridrate; **CLQUI** – 6,7-dimetóxi-4-chloroquinazoline chloridrate and **PD153035** – 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-bromophenyl)aminoquinazoline chloridrate were used in this study. All these compounds increased left ventricular systolic pressure and reduced heart rate in a concentration-dependent fashion. These functional effects were more evident for DMA ($EC_{50}LVSP = 0.1 \pm 0.03$ nM; $EC_{50}HR = 0.2 \pm 0.02$ nM and $E_{max}LVSP = 0.9 \pm 0.2$; $E_{max}HR = 173 \pm 8$ bpm), followed CLQUI ($EC_{50}LVSP = 0.6 \pm 0.5$ nM; $EC_{50}HR = 0.9 \pm 0.3$ nM and $E_{max}LVSP = 0.6 \pm 0.2$; $E_{max}HR = 173 \pm 1$ bpm) and PD153035 ($EC_{50}LVSP = 6.0 \pm 1.2$; $EC_{50}HR = 19.0 \pm 9.0$ and $E_{max}LVSP = 0.3 \pm 0.1$ $E_{max}HR = 164 \pm 3$ bpm) (figure 10 and 11). The quinazoline induced increases in left ventricular systolic pressure (LVSP) were caused by the reduction in heart rate (HR) as demonstrated by the straight correlation between LVSP and HR (figure 16 and 17) attained at various doses of these compounds and by the abolition of pressor responses in isolated hearts in which heart rate was restored to control levels through external pacing (figure 18).

Further studies revealed that the bradycardia induced by these compounds mimics the effect of adenosine on isolated rat heart and is blocked by the unspecific adenosine receptor antagonist 8-phenil-theophiline (8 PT) (figure 20).

Finally, experiments performed to assess the functional effects of ischemia/reperfusion in isolated rat heart revealed that the compound PD153035 protect the myocardium from ischemia (figure 21). The administration of PD153035 at 1 μ M avoided the myocardial stunning and dysfunction observed after 40 min of continuous stop-flow ischemia. This effect was completely abolished by the co-administration of the unspecific adenosine receptor antagonist 8 PT (figure 22), indicating that this effect is also mediated by adenosine.

In summary, we have shown in this study that the quinazoline compounds formerly demonstrated to have the ability to inhibit tyrosine kinases produces 1) an indirect pressor response via a reduction in heart rate, 2) a concentration-dependent reduction in heart rate mediated by the activation of adenosine receptors, 3) protection of myocardium from ischemia/reperfusion also by a mechanism mediated by the activation of adenosine receptors. In conclusion, our results indicated that the quinazoline compounds tested in the present study have additional pharmacological effects rather than the inhibition of tyrosine kinases. These additional effects are mediated by adenosine receptors and might be dependent on a direct activation of the adenosine receptors or even on the increase in adenosine availability. Further studies are necessary to clarify the exact mechanisms by which these compounds mimic the adenosine effects.



1. INTRODUÇÃO

As proteínas tirosinas quinases (PTKs) são um grupo de enzimas que catalisam a transferência do fosfato terminal (γ -fosfato) do ATP para o grupo OH fenólico de resíduos tirosina específicos (Figura 1).

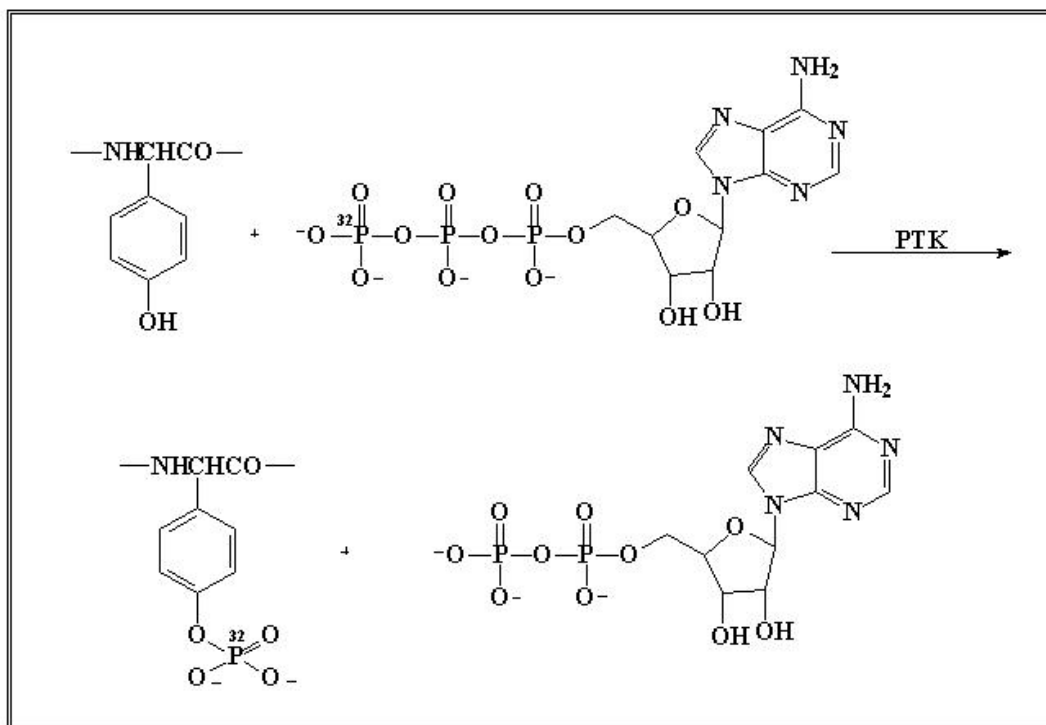


Figura 1- Mecanismo simplificado de transferência do fosfato terminal do ATP para o grupo OH fenólico do resíduo tirosina.

Essas enzimas, tanto aquelas associadas aos receptores transmembrana (receptores de tirosina quinase – EGF) como aquelas de localização citosólica (FAK, Src), participam do controle diversas funções celulares.

A estrutura geral dos receptores tirosina quinases pode ser avaliada à partir da estrutura do receptor do fator de crescimento da epiderme (EGF). Este receptor

é uma glicoproteína com 170 KDa, que possui uma região de ligação extracelular que fixa o EGF, uma região transmembrana e uma porção intracelular, a qual exibe atividade de tirosina quinase. A associação do EGF ao receptor resulta em ativação da tirosina quinase e conduz a autofosforilação de no mínimo cinco tirosinas localizadas em sua extremidade com COOH terminal. Estes eventos iniciais são seguidos de fosforilação de várias proteínas, o que é responsável pelos inúmeros efeitos celulares do EGF (OSHEROV, N. et al. **1994**; WARD, W. H. J. **1994**).

As tirosinas quinases citosólicas têm estruturas semelhantes no sítio tirosina quinases e módulos funcionais nas regiões N e C-terminal.

A expressão acentuada da atividade da tirosina quinase do receptor EGF, normal ou mutagênica, assim como de outras tirosinas quinases, pode resultar em perda do controle do crescimento celular e, então, levar a uma proliferação irregular, associada à formação de tumores malignos (CIARDIELLO, F et al. **2000**). Por outro lado, o bloqueio da função do receptor de EGF por anticorpos monoclonais, causa a regressão de tumores em camundongos portadores de carcinomas epidermóide humano A-431, colorretal SW948 e nasofaríngeo (BRIDGES, A. J et al.. **1996** ; GAZIT, A. et al.. **1996**). Diversos estudos demonstraram que existem correlações entre a atividade tirosina quinase do receptor EGF e câncer de mama, próstata, pulmão, pescoço, esôfago etc.

O conhecimento do processo de inibição da atividade dessas enzimas da família do receptor EGF (EGFR), bem como de outras tirosinas quinases, pode resultar em benefício terapêutico, já que estas enzimas têm funções celulares múltiplas e a alteração de suas atividades pode contribuir para a patogenia de

várias doenças, incluindo algumas do sistema cardiovascular como hipertrofia cardíaca e aterosclerose (YAMAZAKI, T et al. **1998**). Com este objetivo, foram introduzidos compostos com estruturas capazes de atuar com potência e especificidade sobre essas enzimas, tendo estes compostos recebido o nome genérico de “tyrphotins (“tyrosine phosphorylation inhibitors”), (LEVITZKI, A. **1999**). Entre estes compostos existentes, se destacam as classes estruturais das quinazolinas, piridopirimidinas e pirrolopirimidinas (FRY, D.W. **1999**; LEVITZKI, A **1999**). Estes compostos são considerados competidores do ATP, já que ocupam o sítio de ligação do ATP nas tirosina quinases e impedem a transferência de fosfatos para os resíduos de tirosina.

A quinazolina (1) é uma 1,3-benzodiazina com a mesma estrutura das bases pirimidínicas (uracila, timina e citosina) presentes nos ácidos nucléicos. O nome quinazolina foi proposto devido a estes compostos serem isômeros com as cinolinas (2) e quinoxalinas (3).

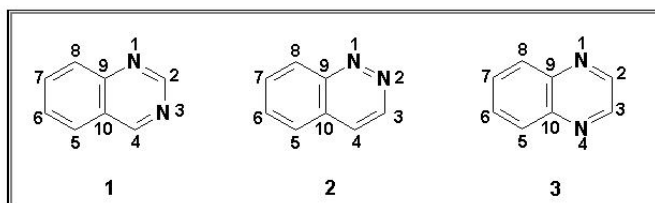


Figura 2. Estrutura básica da quinazolina (1) e seus isômeros (2 e 3).

Os derivados de quinazolinas têm efeitos pleiotrópicos, com capacidade de afetar as funções e atividades de receptores α 1-adrenérgicos (BOLOGNESI, M. L. et al. **2001**), fosfodiesterases (TAKASE, Y et al.. **1994**; WATANABE, N et al. **2000**; UKITA, T et al. **2001**), tirosina quinases (LEVITZKI, A **1999**) e descoberto mais recentemente de adenosina quinases (Jarvis, M. F. et. al., **2000**; COWART M et al.. **2001**). Nos últimos anos, os estudos com derivados quinazolínicos tiveram grande progresso no combate das doenças proliferativas como o câncer, baseados principalmente na propriedade inibidora de tirosina quinases destes compostos.

As 4-anilinoquinazolinas foram descobertas há 8 anos (FRY, D. W et al. **1994**; GAZIT, A et al. **1996**), sendo que a 6,7-dimetóxi-4-(*N*-3-bromofenil)aminoquinazolina (14 – figura 3) foi o primeiro composto identificado

como inibidor competitivo do ATP em células A-431 (IC_{50} de 0,025 nM), com elevada potência e alta especificidade sobre a atividade dessas enzimas.

O derivado da 4-anilinoquinazolinas 16 (ZD 1839 - Iressa) e 17 (CP 358774 – Pfizer) são inibidores reversíveis de tirosina quinases (figura 3). Estes compostos encontram-se em teste para o tratamento de pacientes com câncer (FRY, D.W **1999**; BARKER, A.J et al. **2001**; MOYER, J.D. et al. **1997**).

A 4-anilinoquinazolina 16 (ZD 1839 - Iressa) foi descoberta em 1996 e os testes mostraram potências na faixa de 23 nM em células isoladas e 80 nM *in vivo*. É um inibidor oralmente ativo e com alta especificidade sobre as tirosinas quinases, sem afetar outras quinases. Os experimentos, em ratos tratados por um período de 4 meses, mostraram que o composto possui biodisponibilidade oral excelente e baixa toxicidade. Já a quinazolina 17 (CP 358774 – Pfizer) mostrou ser eficiente *in vitro* e *in vivo*, em células cancerosas de pescoço e cabeça (IC_{50} de 2 nM) (MOYER, J.D. et al. **1997**).

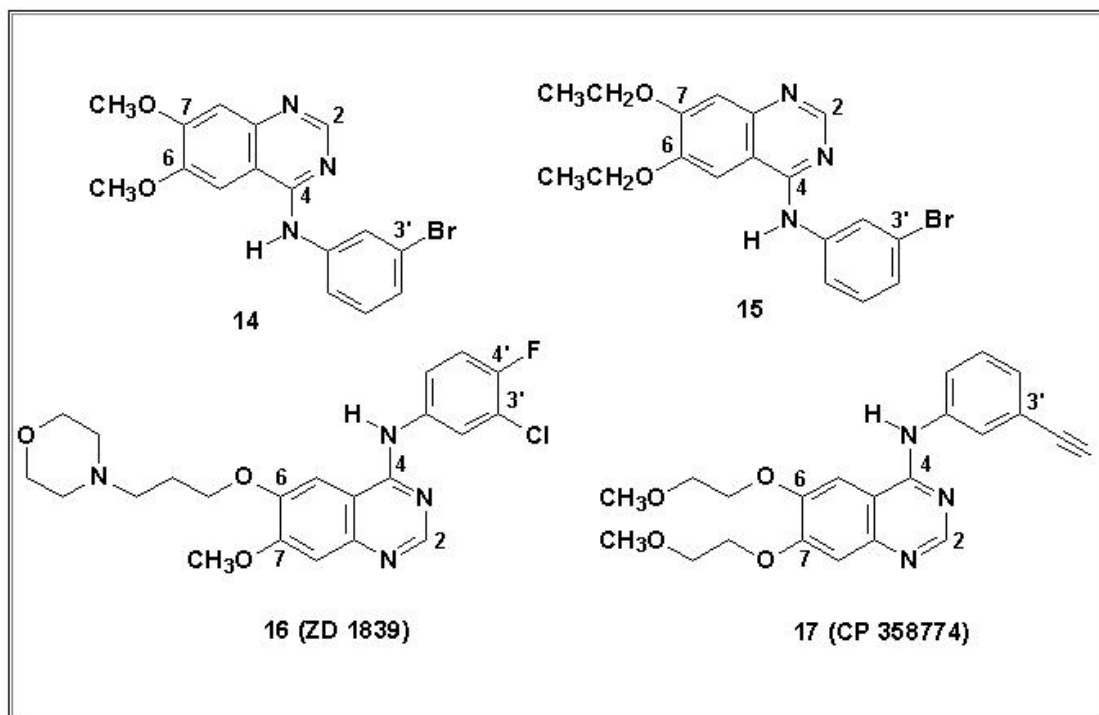


Figura 3-Estruturas dos inibidores reversíveis da família do receptor EGF

Como citado anteriormente, os compostos derivados de quinazolíνας podem apresentar atividade diferente daquela sobre as tirosinas quinases. O prazosim (4) é uma quinazolina com propriedades antagonistas competitivas não seletivas para receptores α -adrenérgicos. Este composto tem efeito vasodilatador tendo sido utilizado na terapia anti-hipertensiva, assim como alguns de seus derivados estruturais como o ciclazosim (5), que possui uma afinidade maior para os receptores α_1 -adrenérgicos, com uso no tratamento da hiperplasia prostática benigna (MINARINI, A. et al. **1998**).

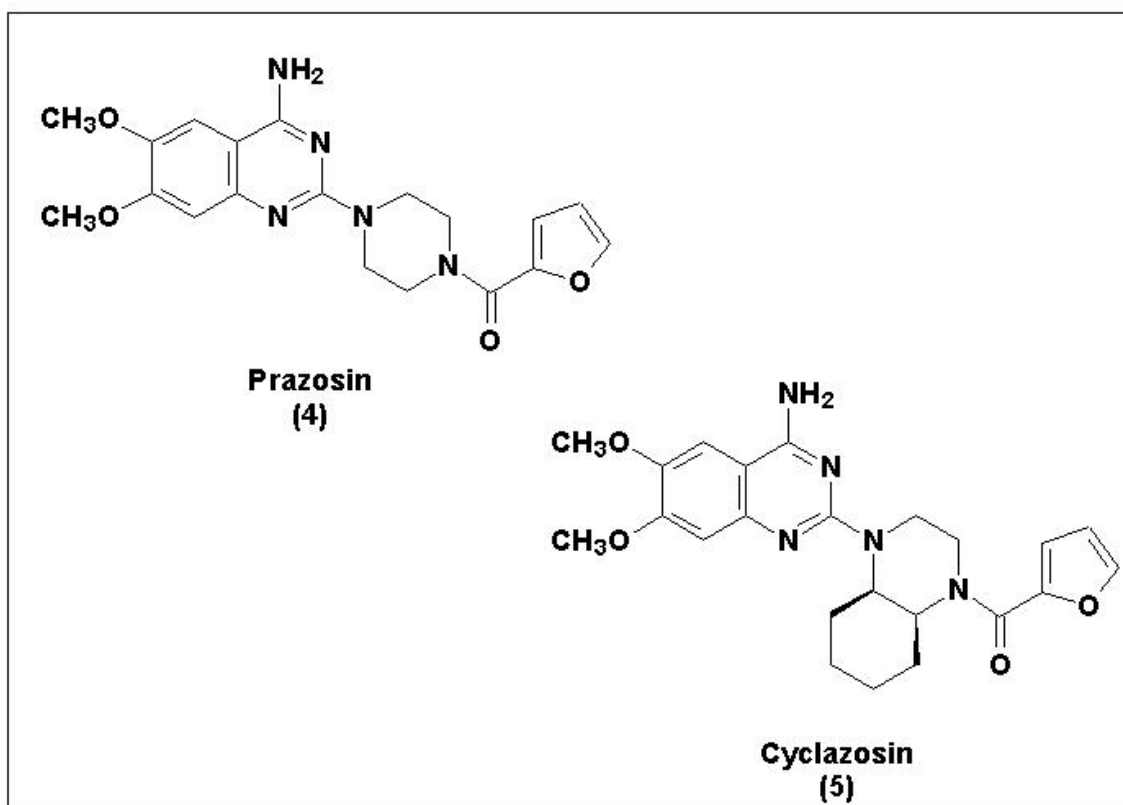


Figura 4- Estrutura dos derivados quinazolínicos com propriedades antagonistas para receptores α -adrenérgicos.

Compostos quinazolínicos também podem ter efeito inibidor sobre fosfodiesterases. As fosfodiesterases (PDEs) são enzimas responsáveis pela hidrólise do cAMP (6) e cGMP (7) a 5'-AMP e 5'-GMP, respectivamente, através da clivagem da ligação fosfodiéster entre os átomos de fósforo e oxigênio da posição 3' dos nucleotídeos. Os nucleotídeos cíclicos cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) (6) e cGMP (guanosina 3',5'-monofosfato cíclico) (7) são conhecidos como os mensageiros secundários de receptores acoplados às proteínas quinases A (PKA- proteína quinase cAMP dependente) e G (PKG- proteína quinase cGMP dependente) e regulam muitas funções em vários tecidos,

tais como as do músculo cardíaco (vasoconstrição e vasodilatação). As concentrações de cAMP (6) e cGMP (7) no interior das células são controladas através da ativação das enzimas adenilato e guanilato ciclases em resposta às sinalizações extracelulares.

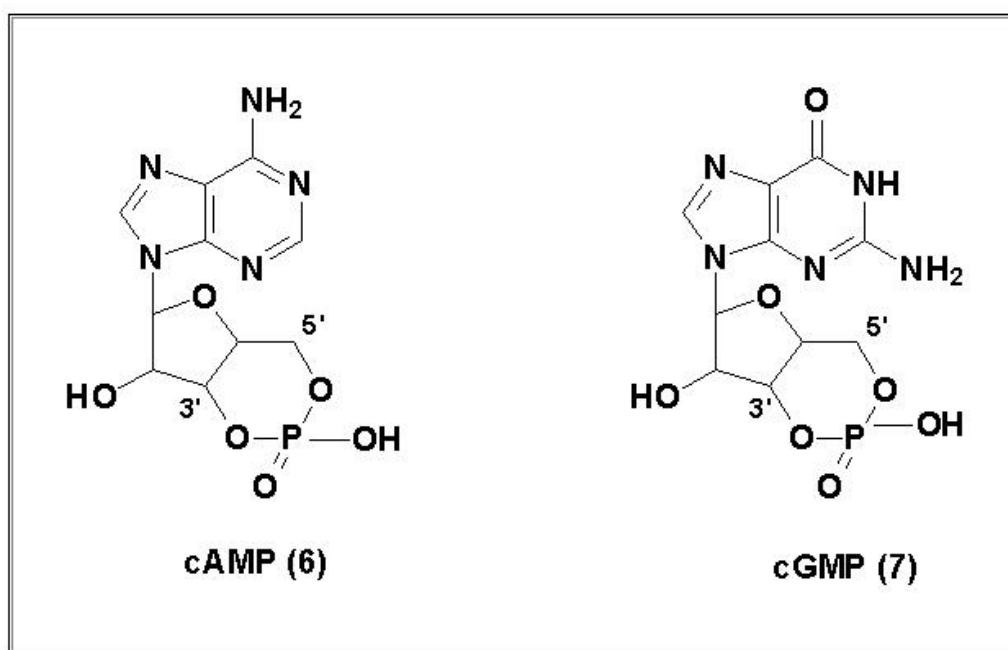


Figura 5- Estruturas dos nucleotídeos cíclicos cAMP (6) e cGMP (7)

O AMP cíclico (6) é sintetizado a partir do ATP (adenosina trifosfato) sob a ação da enzima adenilato ciclase ($\text{ATP} \rightarrow \text{cAMP} + \text{PPi}$). Muitas drogas, hormônios e neurotransmissores diferentes produzem seus efeitos ao aumentar ou reduzir a atividade catalítica da adenilato ciclase, elevando ou diminuindo a concentração

de cAMP (6) no interior da célula. Este nucleotídeo cíclico regula enzimas que participam no metabolismo energético, divisão e diferenciação celulares, transporte de íons, canais iônicos e proteínas contráteis no músculo liso (TAKASE, Y. et al. **1994**; WATANABE, N. et al. **2000**; UKITA, T. et al. **2001**).

O GMP cíclico (7) é sintetizado a partir do GTP (guanosina trifosfato) sob a ação da enzima guanilato ciclase ($\text{GTP} \rightarrow \text{cGMP} + \text{PPi}$). Esta enzima é ativada por substâncias tais como o fator natriurético atrial (ANF) (receptores que ocorrem nas células do músculo liso dos vasos sangüíneos) e óxido nítrico (NO) (encontrado no músculo liso do coração e vasos sangüíneos). A função do cGMP (7) no músculo cardíaco é sinalizar o relaxamento através da PKG e da retirada de Ca^{2+} intracelular.

As PDEs são classificadas em várias famílias de isoenzimas, de acordo com a seqüência de aminoácidos, propriedade bioquímica e sensibilidade a vários agentes farmacológicos. Algumas PDEs são altamente específicas na hidrólise do cAMP (PDE4, PDE7 e PDE8), outras são específicas para o cGMP (PDE5, PDE6 e PDE9) e algumas apresentam especificidade para ambos cAMP e cGMP (PDE1, PDe2, PDE3 e PDE10). No entanto, entre as 10 famílias de PDEs, a fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5), que é altamente específica para cGMP, tem sido objeto de muita atenção por parte dos pesquisadores. Como o nucleotídeo cíclico cGMP controla funções vasculares, um inibidor de PDE5, que eleva o nível de cGMP no interior das células, é considerado um fármaco potencial para o tratamento de doenças cardiovasculares, como por exemplo, hipertensão, angina, insuficiência cardíaca e impotência.

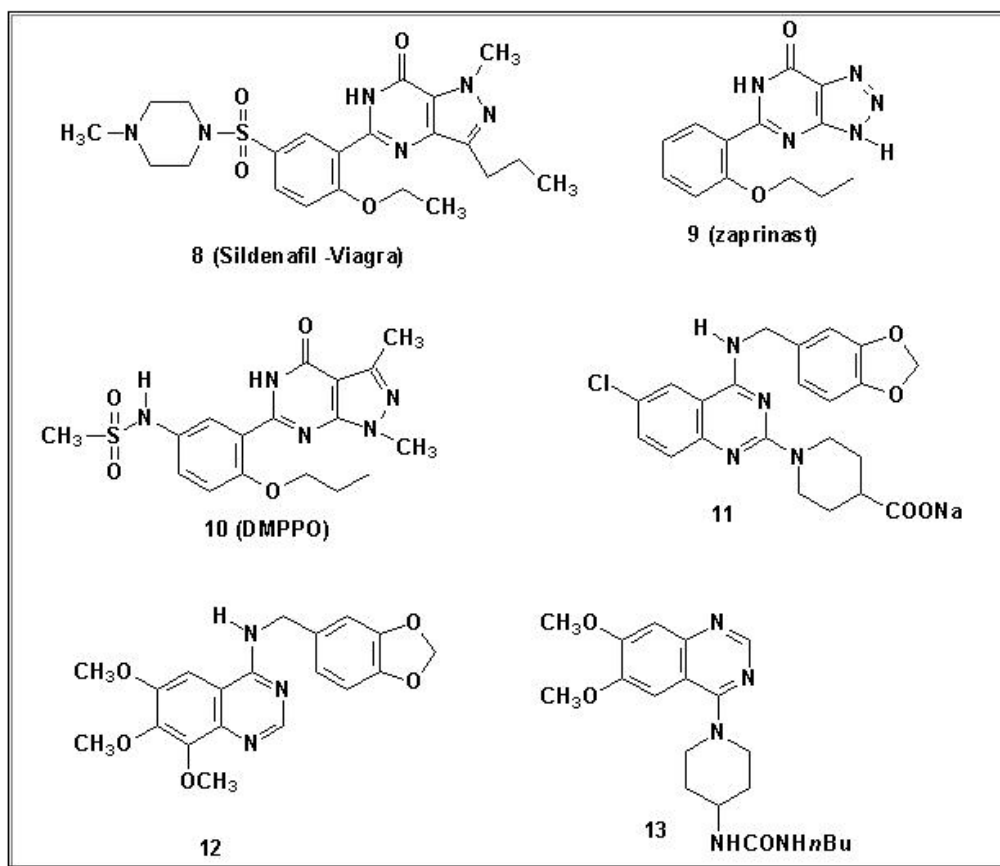


Figura 6- Inibidores de fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5)

Para este fim, várias classes estruturais têm sido investigadas quanto à potência e especificidade na inibição da PDE5. Dentre estes inibidores, o Sildenafil (8, Viagra), que é utilizado no tratamento de impotência, é reconhecido como o mais potente inibidor de PDE5 ($IC_{50} \sim 4$ nM). O zaprinast (9) é o inibidor clássico e apresenta uma moderada seletividade para esta enzima ($IC_{50} = 800$ nM). No entanto, inibidores potentes e seletivos tais como DMPPO (10) e derivados de quinazolininas (11-13) (TAKASE, Y. et al. **1994**) têm sido relatados como fármacos potenciais para o tratamento de doenças cardiovasculares.

Nos últimos anos observou-se um grande progresso no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na manutenção da atividade contrátil do coração, bem como nos que geram o desenvolvimento da hipertrofia e da falência miocárdica. Estudos preliminares evidenciam a ativação de tirosina quinases em processos de degeneração do coração, seja ela aguda ou crônica, evidenciando a importante participação destas enzimas na ocorrência de cardiopatias (RAPUNDALO, S. T. **1998**). Dentre essas enzimas, destaca-se o complexo FAK/Integrinas responsável pela ativação de vias de sinalização que levaria ao processo de hipertrofia cardíaca (FRANCHINI, K. G. et al. **2000**; DOMINGOS, P. P et al. **2002**). Neste contexto, a interferência nas vias de sinalização relacionadas ao sistema FAK/Integrinas ou outras tirosinas quinases teria grande relevância para o tratamento da insuficiência cardíaca. No entanto, a utilização de quinazolininas e seus derivados no estudo do desenvolvimento das cardiopatias ainda é pouco ou nada explorado (NOMOTO, Y. et al. **1990**).

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

1- Avaliar os efeitos de compostos quinazolínicos com propriedades inibidoras de tirosina quinase sobre a função cardíaca (pressão e frequência) em preparações de corações isolados de ratos (Langendorff).

2- Avaliar os efeitos do composto quinazolínico PD153035 durante a isquemia do miocárdio de corações isolados de ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Compostos Quinazolínicos

Os derivados quinazolínicos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Roberto Rittner e pela Dra. Silvana Rocco do Laboratório de Fisico-Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Utilizamos os compostos **PD153035** – Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-bromofenil)aminoquinazolina; **DMA** – Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-N,N-dimetilfenil)aminoquinazolina; **CLQUI** – Cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-cloroquinazolina (figura 7)

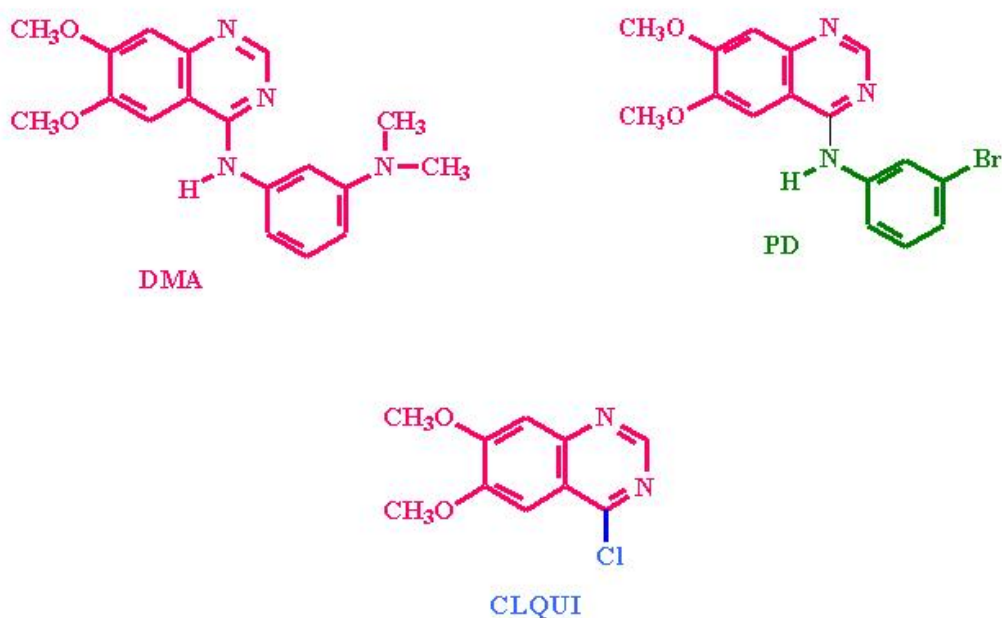


Figura 7- Estrutura dos compostos quinazolínicos utilizados.

3.2- Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), Campinas-SP, com pesos entre 200 e 250g.

3.3- Sistema de Perfusão de coração isolado (Técnica de Langendorff)

O sistema de perfusão de coração isolado foi constituído com um sistema catábolhas 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 8.

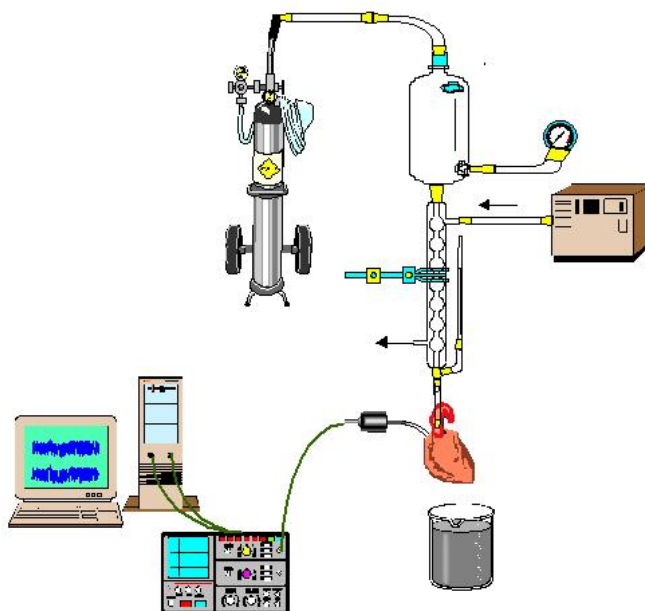


Figura 8- Esquema do sistema de perfusão de coração isolado e registro da pressão ventricular esquerda utilizado.

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.

3.3.1- 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 Gelco^R 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) 20mM, NaCl 137mM, MgSO₄ 1,2mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1,5mM 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 70mmHg e temperatura a 37°C.

3.3.2- 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.

3.4- Procedimento para Construção da Curva Concentração-Efeito de Compostos Quinazolínicos em Corações Isolados de Ratos

As curvas concentração-efeito (efeito de aumento da pressão do ventrículo esquerdo e queda da frequência cardíaca) de compostos quinazolínicos foram obtidas em coração isolado de rato, através do aumento das concentrações dos

compostos em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas. Os dados obtidos das curvas concentração-efeito em corações isolados de ratos foram avaliados segundo a equação descrita a seguir:

$$E = E_{\text{máx}} / ((1 + (10^c / 10^x)^n) + \phi)$$

A letra E representa o aumento da pressão do ventrículo esquerdo ou a queda da frequência dos batimentos cardíacos em resposta à injeção de quinazolina (efeito); $E_{\text{máx}}$ representa o efeito máximo que a quinazolina pode produzir; c representa o logaritmo da EC_{50} , definida como a concentração do composto quinazolínico que produz metade da resposta máxima; x representa o logaritmo das concentrações das quinazolinas; o exponencial n é o coeficiente angular ou inclinação, o qual define o tipo de curva concentração-efeito obtida e, finalmente, o símbolo ϕ representa a resposta observada na ausência da quinazolina ($\phi = \text{zero}$).

A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros $E_{\text{máx}}$, $\log EC_{50}$ e n foi obtida utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Softwer, San Diego, CA).

3.4.1- Protocolos

Protocolo 1- Experimentos para obtenção de curvas concentração-resposta de compostos quinazolínicos em corações isolados de ratos.

Os corações foram conectados ao sistema de perfusão, estabilizados durante 15 minutos e registradas as pressões ventriculares e frequência cardíaca

durante período controle (10 minutos) e durante injeções de concentrações crescentes de compostos quinazolínicos, com 1 (um) minuto de intervalo entre uma injeção e outra, mantendo-se a pressão diastólica em 5 mmHg. O volume máximo de quinazolina injetado foi de 200 μ L com fluxo de 100 μ L/minuto através de bomba de infusão contínua KD Scientific 200 - USA.

Nestes procedimentos foram avaliados os efeitos dos receptores β -adrenérgicos e canais de cálcio tipo L nas respostas ao compostos quinazolínico DMA através de bloqueio com propranolol (2 μ M) e diltiazem (2 μ M), respectivamente, administrados no tampão de perfusão. Além disso, também verificamos os efeitos da redução da concentração de cálcio no tampão de perfusão sobre a resposta ao DMA

Protocolo 2- Experimentos para obtenção de curvas concentração-resposta de DMA em corações isolados submetidos a controle de frequência cardíaca (240bpm).

Os corações foram conectados ao sistema de perfusão, estabilizados durante 15 minutos e registradas as pressões ventriculares e frequência cardíaca durante período controle (10 minutos) sendo a frequência mantida estável a 240 bpm, através de estimulador elétrico modelo CP&D-CEB/UNICAMP-OS e durante injeções de concentrações crescentes de DMA, com 1 (um) minuto de intervalo entre uma injeção e outra, mantendo-se a pressão diastólica em 5mmHg. O volume máximo de DMA injetado foi de 200 μ L com fluxo de 100 μ L/minuto através de bomba de infusão contínua KD Scientific 200 – USA.

Protocolo 3- Experimentos para obtenção de curvas concentração-resposta de adenosina em corações isolados de ratos.

Os corações foram conectados ao sistema de perfusão, estabilizados durante 15 minutos e registradas as pressões ventriculares e frequência cardíaca durante período controle (10 minutos) e durante injeções de concentrações crescentes de adenosina, com 1 (um) minuto de intervalo entre uma injeção e outra, mantendo-se a pressão diastólica em 5mmHg. O volume máximo de adenosina injetado foi de 200µL com fluxo de 100µL/minuto através de bomba de infusão contínua KD Scientific 200 – USA.

Também verificamos os efeitos do inibidor dos receptores de adenosina, 8 fenilteofilina (*8-F T*), administrado no tampão de perfusão na concentração de 1µM, sobre a resposta à adenosina.

Protocolo 4.- Avaliação do efeito do PD 153035 sobre a isquemia miocárdica em corações isolados de ratos.

Os corações foram conectados ao sistema de perfusão e após um período de 15 minutos de estabilização iniciou-se período de registro controle da pressão do ventrículo esquerdo (10 minutos), seguidos de um período de 40 minutos de isquemia provocada por interrupção do fluxo coronário. Após este período, foi reiniciada a perfusão e a pressão ventricular registrada por mais 35 minutos

Para a avaliação do efeito do composto quinazolínico PD 153035 sobre a função ventricular após a isquemia miocárdica, utilizamos corações isolados

perfundidos com diferentes concentrações de PD 153035. (10pM, 1nM e 100nM), desde o início do experimento. Para identificar os mecanismos responsáveis pela proteção miocárdica conferida pelo PD 153035, utilizamos o inibidor inespecífico de receptores de adenosina, 8-fenilteofilina (1 μ M), administrado no tampão de perfusão.

3.5- Análise Estatística

Dados são apresentados como médias e erro padrão. As curvas concentração-resposta aos compostos quinazolínicos em corações isolados foram ajustadas ao modelo sigmóide, analisando-se os valores de efeito máximo (E_{max}) e as concentrações que causam 50% de E_{max} (EC_{50}). O programa InStat (GraphPad Software) foi utilizado para as análises estatísticas. Diferenças entre valores médios foram testadas com ANOVA sendo o teste *pos hoc* o de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.



4. RESULTADOS

1. EFEITO DE COMPOSTOS QUINAZOLÍNICOS PD153035, CLQUI E DMA SOBRE A PRESSÃO SISTÓLICA DO VENTRÍCULO ESQUERDO E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS.

Na figura 9 estão representados exemplos típicos de registro de pressão, realizados para avaliar o efeito de injeções de concentrações crescentes de compostos quinazolínicos, bem como do veículo dimetil sulfóxido (DMSO), sobre a função de corações isolados de ratos. Foram avaliados os efeitos de três compostos quinazolínicos diferentes, além do veículo. Todos os compostos causaram aumento de pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) dependente da concentração injetada, com exceção do DMSO. Como pode-se observar dos exemplos da figura 9, os compostos testados apresentaram diferentes potências quanto aos seus efeitos pressores em corações isolados. O DMA foi o composto que produziu maior resposta pressora quando infundido em concentrações entre 30pM - 2μM (resposta pressora máxima = 27 ± 3 mmHg), enquanto o PD 153035 apresentou a menor resposta (resposta pressora máxima = 8 ± 4 mmHg).

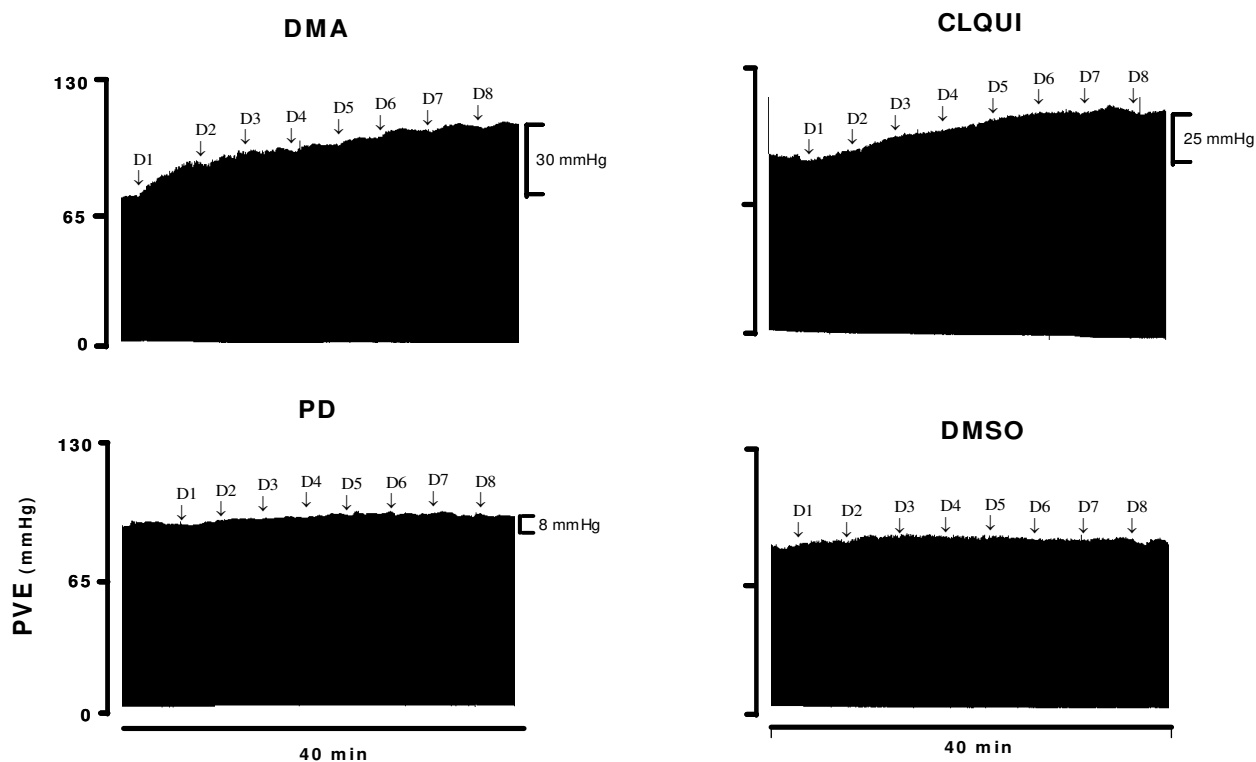


Figura 9- Exemplos representativos de registros de pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) de experimentos concentração-resposta de compostos quinazolínicos em corações isolados de ratos.

Na figura 10 e figura 11 estão representadas as relações concentração-resposta de pressão arterial e de frequência cardíaca, respectivamente, dos três compostos quinazolínicos mencionados anteriormente. As respostas de pressão sistólica do ventrículo esquerdo (Fig. 10) foram expressas como valores fracionais, enquanto as respostas de frequência cardíaca (Fig 11) foram expressas como valores absolutos. O aumento de pressão sistólica foi de aproximadamente 35%, 30% e 14% para DMA, CLQUI e PD153035 em relação aos valores basais absolutos de pressão sistólica, respectivamente. Os valores de E_{max} calculados para as respectivas curvas foram de $0,9 \pm 0,2$ (DMA); $0,6 \pm 0,2$ (CLQUI); $0,3 \pm 0,1$ (PD153035), em valores fracionais (tabela 1), sendo que o teste estatístico não demonstrou diferença significativa entre os grupos. As EC_{50} para as curvas de pressão do DMA e do CLQUI foram estatisticamente maiores que aquela do PD153035, no entanto não houve diferença entre as EC_{50} de DMA e CLQUI (Tabela 1).

Em resposta às 3 drogas mencionadas, ocorreu diminuição concentração-dependente da frequência cardíaca (Fig 11). As respostas bradicárdicas não foram diferentes entre si, sendo de aproximadamente 24%, 29% e 25% para DMA, CLQUI e PD153035, respectivamente, em relação aos valores basais (tabela 2).

Tabela 1- Valores de $E_{\max}$, EC_{50} (nM) e $LogEC_{50}$ na resposta pressora fracional à infusão de concentrações crescentes de DMA, CLQUI e PD153035 em corações isolados de ratos (média $\pm$ E.P.M.).

	DMA	CLQUI	PD
$E_{\max}$	$0,9 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
EC_{50}	$0,1 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,5$	$6,0 \pm 1,2$
$LogEC_{50}$	$-9,9 \pm 0,3$	$-9,2 \pm 0,5$	$-8,2 \pm 0,2$

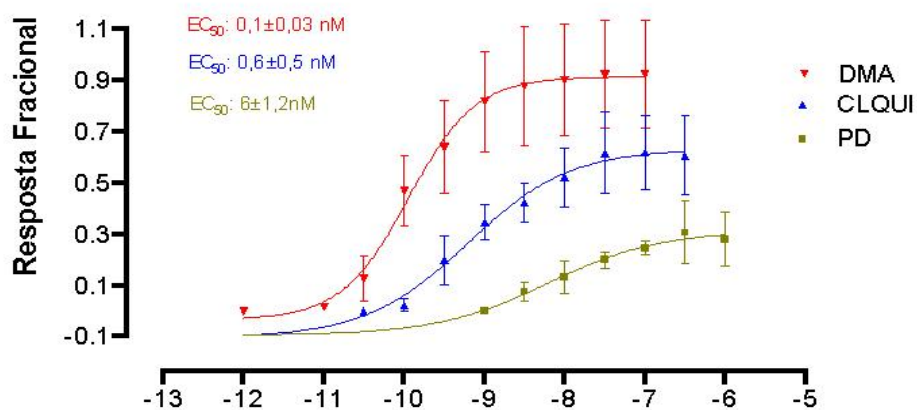


Figura 10- Curvas concentração-resposta ao DMA, CLQUI e PD153035 sobre a pressão sistólica do ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos (expressas em valores fracionais). Os dados são representados como médias $\pm$ E.P.M..

Tabela 2- Valores de frequência cardíaca inicial e final (bpm) em resposta à infusões de concentrações crescentes de DMA, CLQUI e PD153035 em corações isolados de ratos (média $\pm$ E.P.M.).

	DMA	CLQUI	PD
Frequência Cardíaca inicial	228 $\pm$ 7	242 $\pm$ 5	219 $\pm$ 12
Frequência Cardíaca final	173 $\pm$ 8	173 $\pm$ 1	164 $\pm$ 3

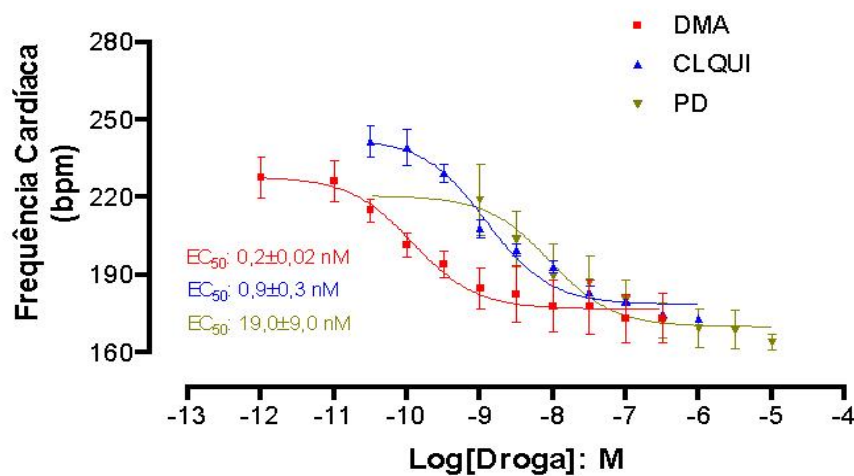


Figura 11- Curvas concentração-resposta ao DMA, CLQUI e PD153035 sobre a frequência cardíaca de corações isolados de ratos (expressas em valores absolutos). Os dados são representados como médias $\pm$ E.P.M..

2. EFEITO DOS BLOQUEIOS COM PROPRANOLOL, DILTIAZEM E REDUÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO SOBRE OS EFEITOS PRESSOR E BRADICÁRDICO DO DMA.

Com base nos resultados apresentados no item anterior, optamos por avaliar os possíveis mecanismos envolvidos nas respostas pressora e bradicárdica apenas do DMA. Na figura 12 são representadas relações concentração-resposta de (A) pressão ventricular e (B) frequência cardíaca em valores absolutos ao DMA em coração perfundidos com tampão HEPES puro ou tampão HEPES acrescido de propranolol (2 μ M), de diltiazem (2 μ M) ou com baixa concentração de cálcio. Escolhemos mostrar inicialmente os resultados das respostas pressora e bradicárdica em valores absolutos para que ficassem evidentes os efeitos dos bloqueadores e da redução da concentração de cálcio nos níveis basais destas variáveis. Como esperado a perfusão com propranolol, diltiazem ou solução com concentração reduzida de cálcio provocaram redução na pressão ventricular basal. Os corações perfundidos com propranolol, diltiazem ou com menor concentração de cálcio tiveram redução nos valores de pressão basal de 14%; 34% e 41%, respectivamente (tabela 3-A), comparados aos valores observados em corações perfundidos com tampão HEPES puro. No entanto, os grupos de corações perfundidos com propranolol ou diltiazem não apresentaram alterações na resposta pressora ao DMA, comparados ao controle. Já a redução da concentração de cálcio à metade da usada no controle ($[Ca^{+2}] = 0,75mM$), reduziu a resposta pressora fracional do DMA em 30% (tabela 6), comparada com a resposta pressora fracional dos corações perfundidos com HEPES com concentração normal de cálcio. Por outro lado, tanto o propranolol, como o diltiazem, como a baixa concentração de cálcio, não modificaram significativamente a frequência cardíaca basal, tampouco a bradicardia em resposta ao DMA (tabela 3-B).

Tabela 3-A- Valores de $E_{\max}$ (mmHg), EC_{50} (nM) e $LogEC_{50}$ na resposta pressora à infusão de concentrações crescentes de DMA em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro e acrescido de propranolol, diltiazem ou com redução na concentração de cálcio (DMA – Ca^{2+}) (médias $\pm$ E.P.M.).

	DMA (HEPES puro)	DMA + Propranolol	DMA + Diltiazem	DMA – Ca^{2+}
$E_{\max}$	118 $\pm$ 1	101 $\pm$ 1	78 $\pm$ 1	70 $\pm$ 3
EC_{50}	0,17 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,07
$LogEC_{50}$	-9,9 $\pm$ 0,2	-9,6 $\pm$ 0,2	-9,9 $\pm$ 0,2	-9,5 $\pm$ 0,6

Tabela 3-B- Valores de frequência cardíaca inicial e final (bpm) na resposta à infusão de concentrações crescentes de DMA em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro e acrescido de propranolol, diltiazem ou com redução na concentração de cálcio (DMA – Ca^{2+}) (médias $\pm$ E.P.M.).

	DMA	DMA + Propranolol	DMA + Diltiazem	DMA – Ca^{2+}
Frequência				
Cardíaca inicial	240 $\pm$ 15	247 $\pm$ 13	256 $\pm$ 5	221 $\pm$ 17
Frequência				
Cardíaca final	174 $\pm$ 10	150 $\pm$ 1	162 $\pm$ 9	162 $\pm$ 7

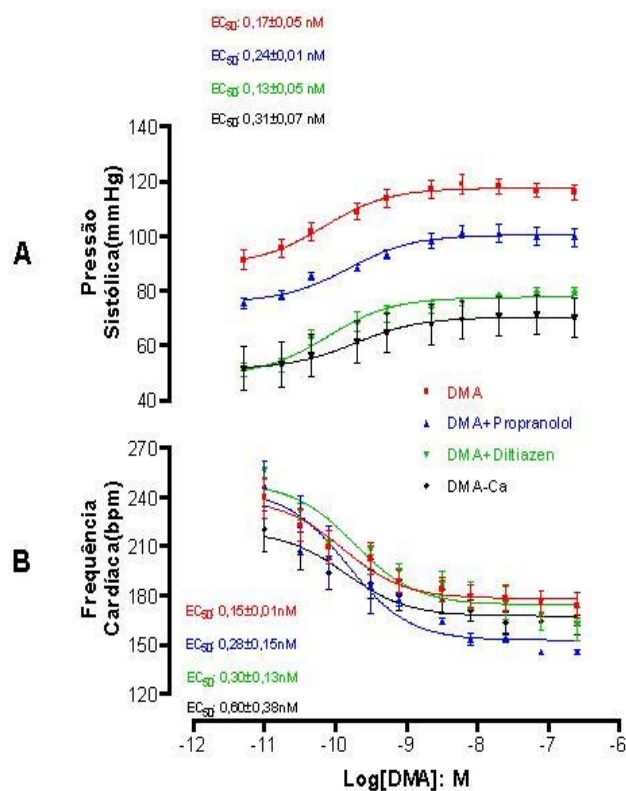


Figura 12- Curvas concentração-resposta ao DMA em relação à pressão sistólica (A) e frequência cardíaca (B) (expressas em valores absolutos) na presença de propranolol, diltiazem e redução na concentração de cálcio em corações isolados de ratos. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 4 experimentos.

Na figura 13, está representada a relação concentração-resposta de pressão ventricular ao DMA em valores fracionais em experimentos onde os corações foram perfundidos com propranolol (2 μ M) ou tampão HEPES puro. Este gráfico confirma nossa observação anterior de que o propranolol mesmo reduzindo a pressão ventricular basal não modifica a resposta pressora ao DMA, indicando que o efeito pressor do DMA não é dependente de ativação α -adrenérgica.

Tabela 4- Valores de $E_{\max}$, EC_{50} (nM) e $LogEC_{50}$ na resposta pressora fracional à infusão de concentrações crescentes de DMA em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro ou acrescido de propranolol (médias $\pm$ E.P.M.).

	DMA	DMA + Propranolol
E_{max}	0,93 $\pm$,03	0,91 $\pm$ 0,03
EC₅₀	0,14 $\pm$ 0,07	0,20 $\pm$ 0,03
LogEC₅₀	-9,9 $\pm$ 0,2	-9,7 $\pm$ 0,1

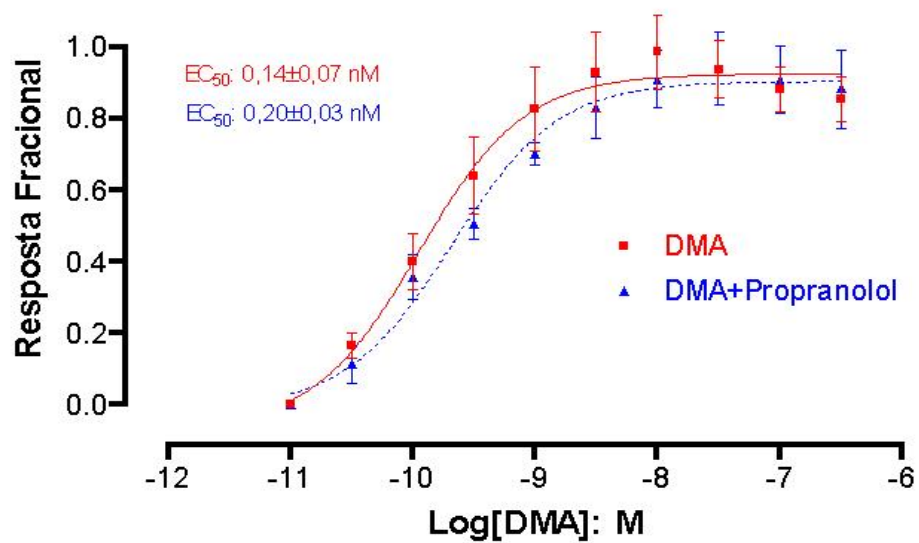


Figura 13- Curvas concentração-resposta ao DMA em relação ao aumento de pressão sistólica (expressas como resposta fracional) de corações isolados controle e perfundidos com 2 μ M de propranolol. E_{max} : 0,9 $\pm$ 0,03; 0,9 $\pm$ 0,03 Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 4 experimentos.

Na figura 14, está representada a relação concentração-resposta de pressão ventricular ao DMA em valores fracionais em experimentos onde os corações foram perfundidos com diltiazem (2 μ M) ou tampão HEPES puro. Este gráfico confirma nossa observação anterior de que o diltiazem mesmo reduzindo a pressão ventricular basal não modifica a resposta pressora ao DMA, indicando que o efeito pressor do DMA não é dependente de ativação de canais tipo L de cálcio.

Tabela 5- Valores de $E_{\max}$, EC_{50} (nM) e $LogEC_{50}$ na resposta pressora fracional à infusão de concentrações crescentes de DMA em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro ou acrescido de diltiazem (médias $\pm$ E.P.M.).

	DMA	DMA + Diltiazem
E_{max}	0,93 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,03
EC₅₀	0,14 $\pm$ 0,07	0,13 $\pm$ 0,07
LogEC₅₀	-9,9 $\pm$ 0,2	-9,9 $\pm$ 0,1

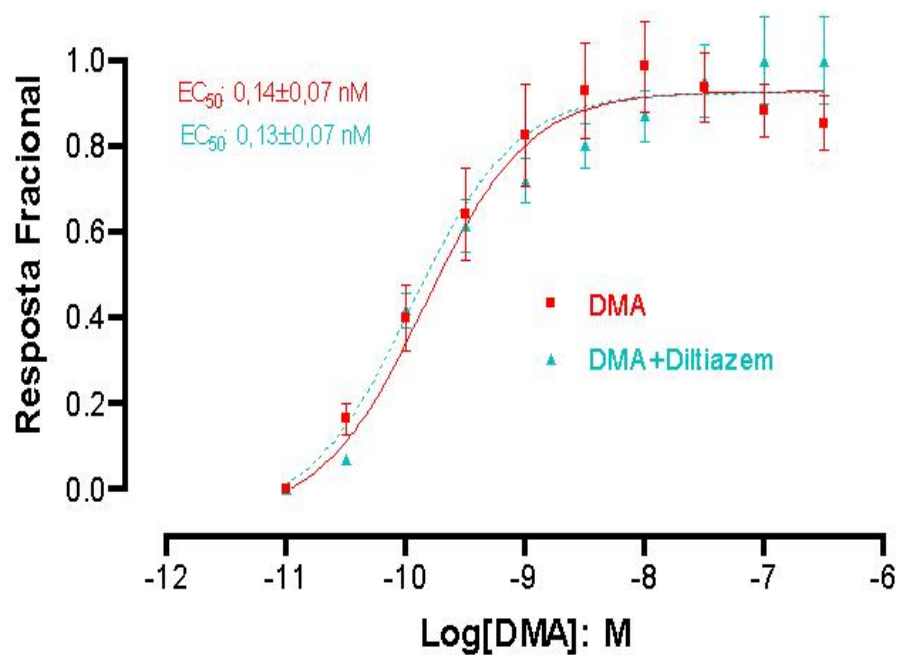


Figura 14- Curvas concentração-resposta ao DMA em relação ao aumento de pressão sistólica (expressas como resposta fracional) de corações isolados controle e perfundidos com 2 μ M de diltiazem. $E_{max} = 0,9 \pm 0,03$. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 4 experimentos

Na figura 15, está representada a relação concentração-resposta de pressão ventricular ao DMA em valores fracionais em experimentos onde os corações foram perfundidos com tampão HEPES com reduzida concentração de cálcio ou tampão HEPES puro. Os resultados mostrados neste gráfico confirmam nossa observação anterior de que a redução da concentração de cálcio reduz tanto o nível basal de pressão ventricular como a resposta pressora ao DMA. No entanto, não houve diferença significativa entre as EC₅₀.

Tabela 6- Valores de E_{max}, EC₅₀ (nM) e LogEC₅₀ na resposta pressora fracional à infusão de concentrações crescentes de DMA em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro ou com baixa concentração de cálcio (médias ± E.P.M.).

	DMA	DMA – Ca ²⁺
E_{max}	0,93 ± 0,03	0,65 ± 0,02 *
EC₅₀	0,14 ± 0,07	0,36 ± 0,06
LogEC₅₀	-9,9 ± 0,2	-9,5 ± 0,2

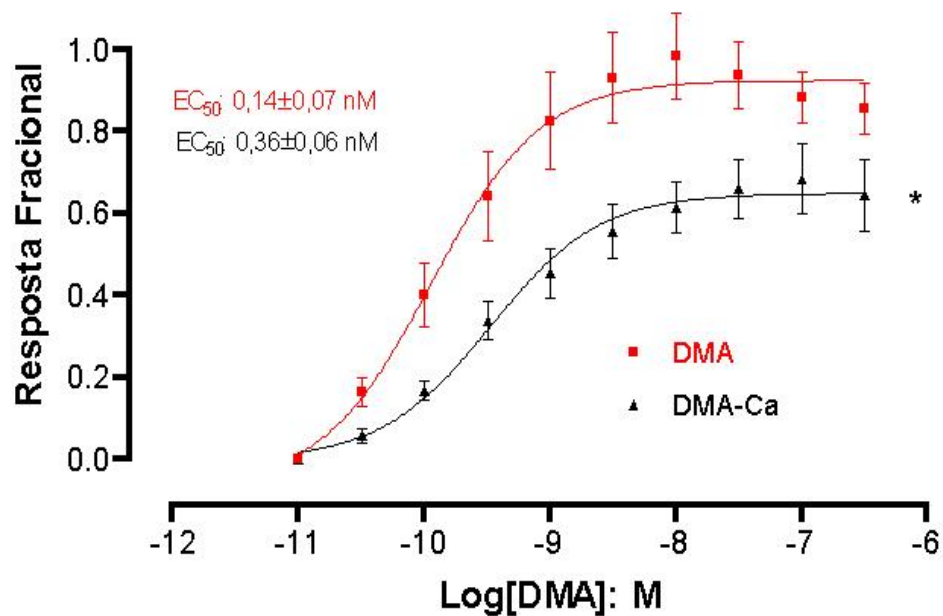


Figura 15- Curvas concentração-resposta ao DMA em relação ao aumento de pressão sistólica (expressas como resposta fracional) de corações isolados controle e perfundidos com metade da concentração de cálcio no tampão de perfusão. E_{max} : 0,65±0,02. Os dados são representados como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ comparados a valores controle.

3. CURVAS DE CORRELAÇÃO ENTRE PRESSÃO SISTÓLICA E FREQUÊNCIA CARDÍACA.

De acordo com os resultados anteriores, em todos os experimentos concentração-resposta de DMA em coração isolado, observamos aumento de pressão sistólica do ventrículo esquerdo com queda simultânea de frequência cardíaca, ambos dependente da concentração de DMA. Como em corações isolados e perfundidos com soluções cristalóides as variações de frequência cardíaca podem modificar o aporte de oxigênio ao miocárdio e conseqüentemente a função miocárdica, é possível que reduções da frequência cardíaca per se provoquem aumento na pressão sistólica. Desta forma, os efeitos pressores observados em resposta ao DMA poderiam ser conseqüente ao seu efeito bradicárdico e não a um estímulo inotrópico direto. Para avaliar esta hipótese, estudamos inicialmente, se havia correlação entre os níveis de pressão e de frequência cardíaca observados em doses crescentes de DMA. Na Fig. 16, está representada a correlação entre a pressão ventricular e a frequência cardíaca, indicando existir uma relação inversa entre a pressão ventricular e a frequência cardíaca na presença de doses crescentes de DMA.

Como observado na Fig.17, também houve correlação inversa entre os níveis de pressão ventricular e de frequência cardíaca em corações isolados tratados com doses crescentes de DMA na presença de bloqueadores propranolol e diltiazem e concentrações reduzidas de cálcio no tampão de perfusão.

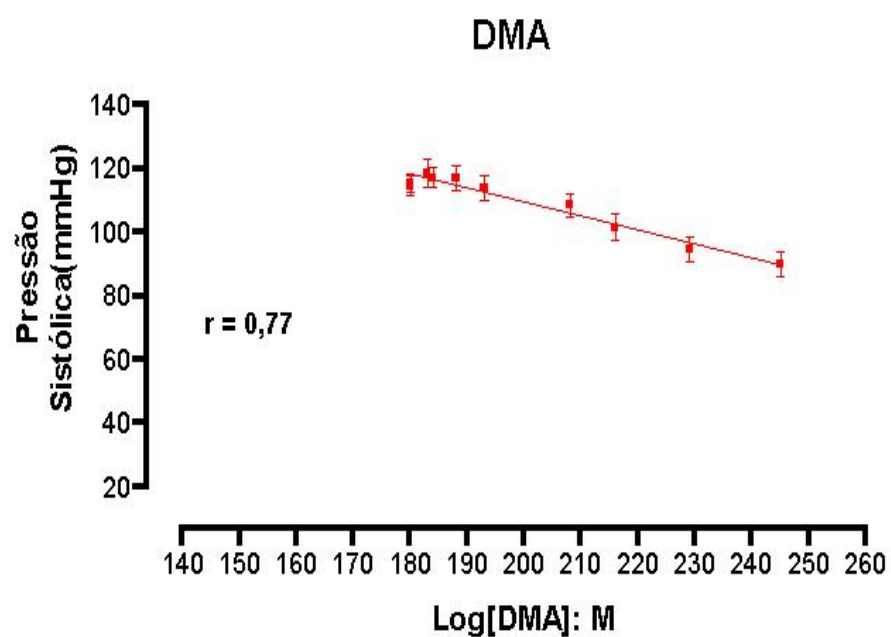


Figura 16- Gráfico de correlação entre o aumento de pressão sistólica e queda de frequência cardíaca de corações isolados submetidos a injeções (bolus) de DMA. O dados são representados com média $\pm$ E.P.M.

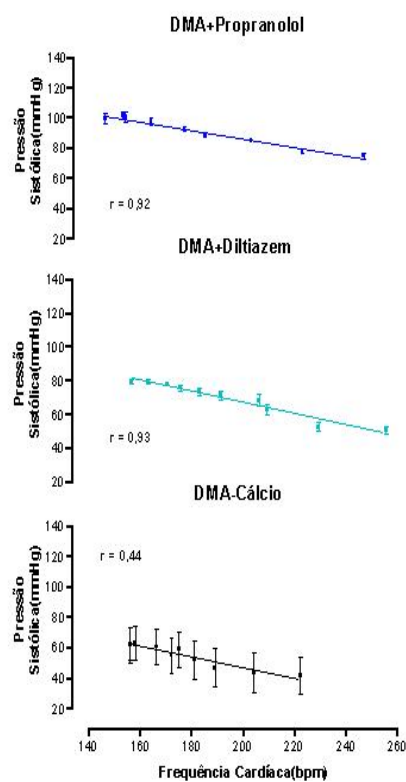


Figura 17- Gráficos de correlação entre o aumento de pressão sistólica e queda de frequência cardíaca de corações isolados submetidos a injeções (bolus) de DMA perfundidos com propranolol, diltiazem e com redução da concentração de cálcio no tampão de perfusão. O dados são representados com média $\pm$ E.P.M.

4. EFEITO DO CONTROLE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA SOBRE AS RESPOSTAS PRESSORAS AO COMPOSTO QUINAZOLÍNICO DMA EM CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS.

Para confirmar nossa hipótese de que a resposta pressora ao DMA depende da bradicardia e não a uma ação direta do DMA no inotropismo de corações isolados de rato, realizamos experimentos onde a frequência cardíaca foi mantida constante durante a infusão de concentrações crescentes de DMA, através da ação de estimulador elétrico. Na figura 18 está representada a relação concentração-resposta ao DMA em coração isolado submetido a estímulo elétrico. O controle da frequência cardíaca praticamente aboliu a resposta pressora ao DMA.

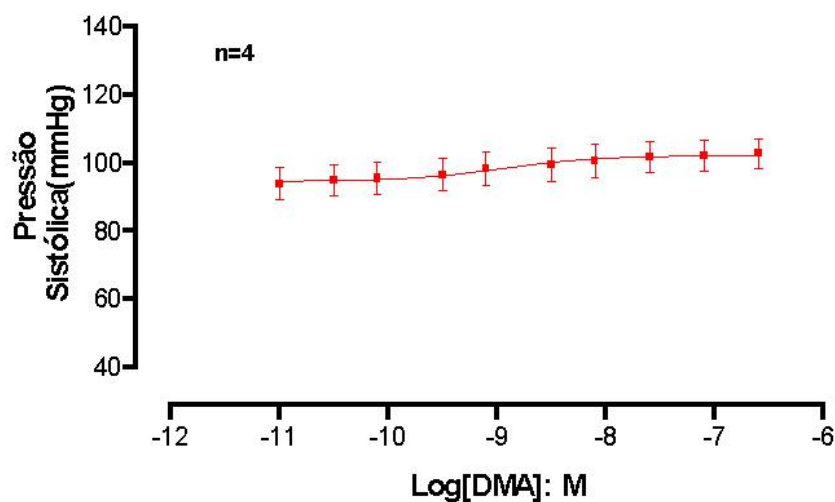


Figura 18- Curva concentração-resposta ao DMA em relação à pressão sistólica (expressa como valores absolutos) de corações isolados submetidos a estímulo elétrico. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 4 experimentos.

5. EFEITOS DOS COMPOSTOS QUINAZOLÍNICOS SOBRE CORAÇÕES ISOLADOS SÃO SEMELHANTES AOS EFEITOS DA ADENOSINA.

Os resultados obtidos com DMA e outros compostos quinazolínicos indicaram que o principal efeito funcional destes compostos em corações isolados de rato é a bradicardia, sendo o efeito pressor dependente da bradicardia e portanto, consequência de peculiaridades da preparação utilizada (I.e. coração isolado) e não um efeito direto. Como a resposta bradicárdica não foi alterada pelo bloqueio com propranolol ou diltiazem ou ainda com a redução na concentração de cálcio no tampão de perfusão levantamos a hipótese geral de que este efeito dos compostos quinazolínicos é dependente ou de efeito direto dos mesmos sobre as células marcapassos ou de efeito indireto através da secreção de compostos autócrinos ou parácrinos. Um dos possíveis responsáveis por estes efeitos é a adenosina, composto produzido endogenamente pelas células miocárdicas que produz efeitos, em corações isolados, semelhantes àqueles observados com os compostos quinazolínicos (i.e. bradicardia e aumento da pressão sistólica do ventrículo esquerdo). Para confirmar nossa hipótese, realizamos experimentos do tipo concentração-efeito com adenosina que demonstraram, como indicado na figura 19 que a adenosina produz aumento de pressão ventricular de 16 ± 2 mmHg e redução da frequência cardíaca de aproximadamente 19% (tabela 7-B) , em relação aos valores basais absolutos, na concentração de $1 \mu\text{M}$ de adenosina (Resposta máxima). A EC_{50} para a resposta pressora da adenosina foi $7,0 \pm 1,4 \text{ nM}$ (tabela 7-A) e para a resposta bradicárdica de $1.8 \pm 1,4 \text{ nM}$. Ambos os efeitos foram alterados pela ação do inibidor inespecífico do receptor de adenosina, 8-fenilteofilina ($1 \mu\text{M}$) (8-*FT*), adicionado no tampão de perfusão. De acordo com a figura 19-A, o aumento de pressão sistólica em resposta a infusão de concentrações crescentes de adenosina, tanto em corações controle, como naqueles tratados com o inibidor do receptor de adenosina, foi praticamente o mesmo. No entanto, na presença do inibidor, houve deslocamento da EC_{50} para a direita, assumindo o valor de $30 \pm 19 \text{ nM}$ (tabela 7-A). Em relação à frequência cardíaca (Figura 19-B), o efeito bradicárdico da adenosina foi atenuado

na presença do inibidor, com redução de aproximadamente 15%, comparado com valores basais (tabela 7-B).

Com esses resultados, realizamos experimentos em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro (controle) ou tampão HEPES acrescido de 1nM de PD153035 (PD 1nM) ou tampão HEPES acrescido de 1nM de PD153035 mais 1 μ M de inibidor inespecífico dos receptores de adenosina, 8-fenil-teofilina (8-*F T*) (PD+Inibidor), que demonstraram, como indicado na figura 20, que a perfusão de corações com PD153035 reduz a frequência cardíaca em aproximadamente 17% (tabela 8), comparados com os valores de frequência cardíaca de corações controle. No entanto, a perfusão de corações com PD153035 acrescido de 8-fenil-teofilina (8-*F T*), aboliu a bradicardia promovida pelo PD153035, confirmando assim a nossa hipótese de que o composto quinazolínico estaria atuando de forma direta ou indireta sobre receptores de adenosina.

Tabela 7-A- Valores de $E_{\max}$, EC_{50} (nM) e $LogEC_{50}$ na resposta pressora fracional à infusão de concentrações crescentes de adenosina em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro ou com tampão HEPES acrescido de 8-*F T* (médias $\pm$ E.P.M.).

	Adenosina	Adenosina +8-fenil-teofilina
E_{max}	0,93 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,04
EC₅₀	7,0 $\pm$ 1,4	30 $\pm$ 19
LogEC₅₀	-8,2 $\pm$ 0,2	-7,8 $\pm$ 0,1

Tabela 7-B- Valores de frequência cardíaca inicial e final (bpm) na resposta à infusão de concentrações crescentes de adenosina em corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro e tampão HEPES acrescido de 8-*F T*. (médias $\pm$ E.P.M.).

	Adenosina	Adenosina +8-fenil-teofilina
Frequência Cardíaca Inicial	228 $\pm$ 2	232 $\pm$ 1
Frequência Cardíaca Final	185 $\pm$ 2	197 $\pm$ 1

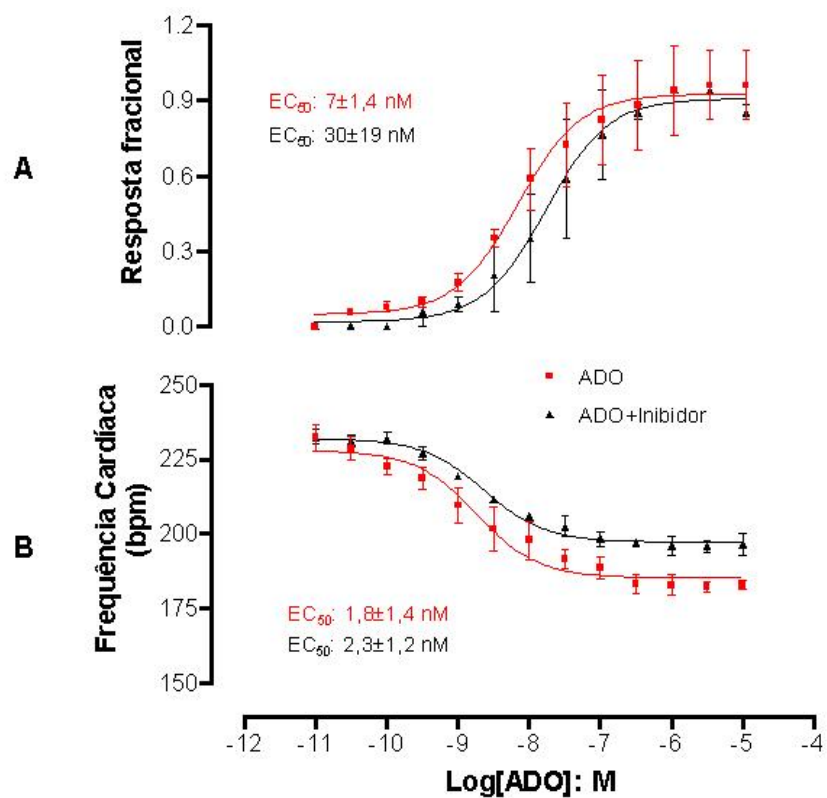


Figura 19- Curvas concentração-resposta à adenosina (ADO) em relação à (A) pressão sistólica (expressas como valores relativos) e (B) frequência cardíaca (expressas em valores absolutos) de corações isolados de ratos.

Tabela 8- Valores de frequência cardíaca (bpm) de experimentos individuais de corações isolados perfundidos com tampão HEPES puro (controle), tampão HEPES acrescido de 1nM de PD153035 (PD 1nM) ou tampão HEPES acrescido de 1nM de PD153035 e 1 μ M de 8-*F T* (média $\pm$ E.P.M.).

	Controle	PD 1nM	PD 1nM + 8-fenil-teofilina
Frequência Cardíaca	233 $\pm$ 7	194 $\pm$ 7 *	234 $\pm$ 11

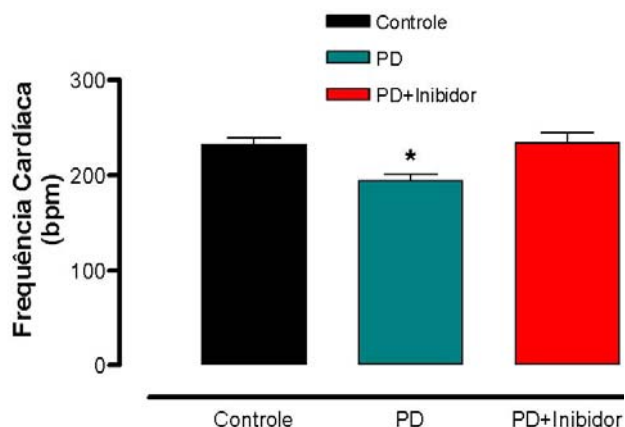


Figura 20- Gráfico representativo das frequências cardíacas de corações isolados de ratos perfundidos com tampão HEPES puro (controle) ou tampão HEPES acrescido de 1nM de PD153035 (PD 1nM) ou tampão HEPES acrescido de 1nM de PD153035 mais 1 μ M de inibidor inespecífico dos receptores de adenosina, 8-fenil-teofilina (PD+Inibidor). Os dados estão representados com médias $\pm$ E.P.M. para 4 experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao controle.

6. EFEITO DO COMPOSTO QUINAZOLÍNICO PD153035 SOBRE CORAÇÕES ISOLADOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSÃO.

Com base no fato conhecido de que a adenosina protege o miocárdio de isquemia e também em nossos resultados que indicaram serem os efeitos cardíacos dos composto quinazolínicos por nós testados dependentes ou miméticos da adenosina, testamos então a hipótese de que estes compostos também protegem o coração de isquemia. Para tanto, estabelecemos protocolo de isquemia total de 40 minutos em corações isolados de ratos por interrupção do fluxo coronário. Nestes experimentos decidimos utilizar o composto PD153035 porque este foi anteriormente caracterizado como um inibidor da atividade das tirosinas quinases e encontra-se atualmente em testes terapêuticos em pacientes com câncer (BRIDGES, A. J. et al. **1996**; CIARDIELLO, F. **2000**).

Na figura 21 estão representados exemplos típicos de registros de pressão sistólica do ventrículo esquerdo de experimentos em corações isolados realizados para avaliar o efeito do PD153035 nas concentrações de 10pM, 1nM e 100nM (Figuras. 21-B,C e D, para as respectivas concentrações), sobre a isquemia do miocárdio. Os corações controle (Figura. 21-A) apresentaram, como esperado, queda abrupta da pressão ventricular e parada de batimentos após a interrupção do fluxo coronário. Após os 40 min de isquemia, estes corações apresentaram retorno gradual dos batimentos (inicialmente bastante irregulares) e aumento da pressão ventricular diastólica e redução da pressão ventricular sistólica como esperado, permanecendo neste estado por até 30 min após a reperfusão, que foi o período de observação. A infusão contínua de PD153035 não impediu a parada de batimentos durante a isquemia, mas após a reperfusão estes corações apresentaram discreto aumento da pressão diastólica e retorno aos níveis de pressão sistólica para aqueles observados no período de pré-isquemia, principalmente nos corações perfundidos com 1nM e 100nM de PD153035.(Figura 21-C e D, respectivamente) O bloqueio com o inibidor inespecífico da ação da adenosina em seus receptores (8-*F* T) aboliu completamente o efeito protetor do PD153035 (Figura 22), indicando ser este efeito dependente da adenosina ou da ativação dos receptores de adenosina.

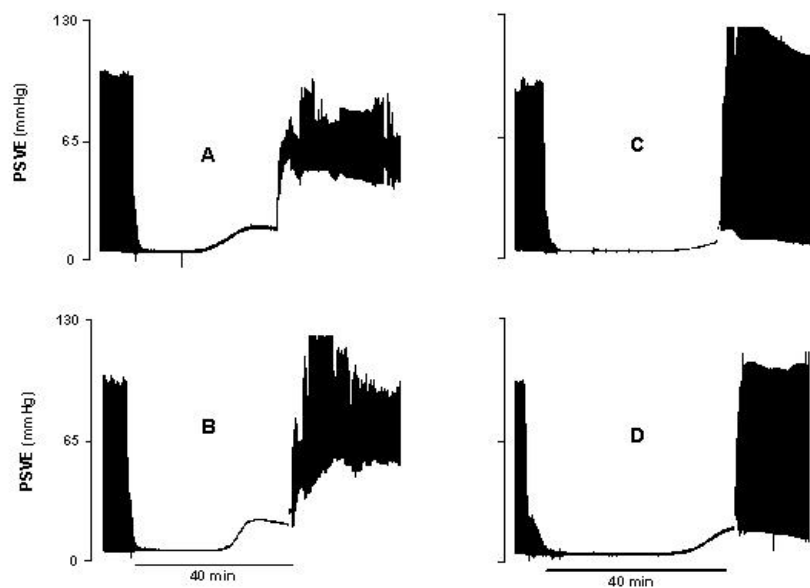


Figura 21- Exemplos representativos de registros de pressão sistólica do ventrículo esquerdo de experimentos isquemia-reperfusão em corações isolados de ratos (A) controle e perfundidos com PD153035 nas concentrações de 10pM (B), (C) 1nM e (D) 100nM.

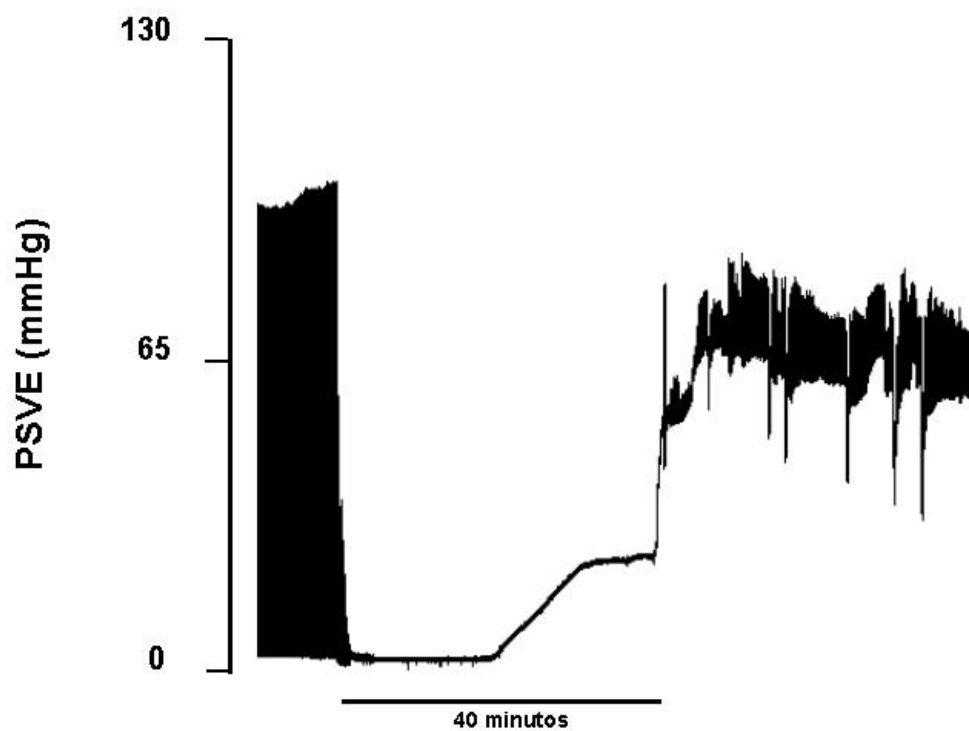


Figura 22- Exemplos representativos de registros de pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) de experimentos isquemia-reperfusão em corações isolados de ratos perfundidos com PD153035 1nM acrescido de 1 μ M de 8-*F T*

Na figura 23 são representados os valores médios de (A) pressão ventricular esquerda desenvolvida e (B) pressão diastólica de experimentos de isquemia em corações isolados controle e perfundidos com concentrações de 10pM, 1nM e 100nM de PD153035 submetidos à isquemia-reperfusão. Os valores pressores no período pré-isquêmico não apresentaram diferença entre os corações controle e perfundidos com PD153035. A perfusão de corações isolados individuais nas concentrações de 10pM, 1nM e 100nM de PD153035 aumentou significativamente a pressão ventricular esquerda desenvolvida no período pós-isquêmico em 68%, 140% e 140%, para as respectivas concentrações de PD153035 utilizadas e atenuou o aumento de pressão diastólica em 46%, 64% e 68%, para as respectivas concentrações, comparadas aos valores controle de pressão ventricular esquerda desenvolvida e pressão diastólica.

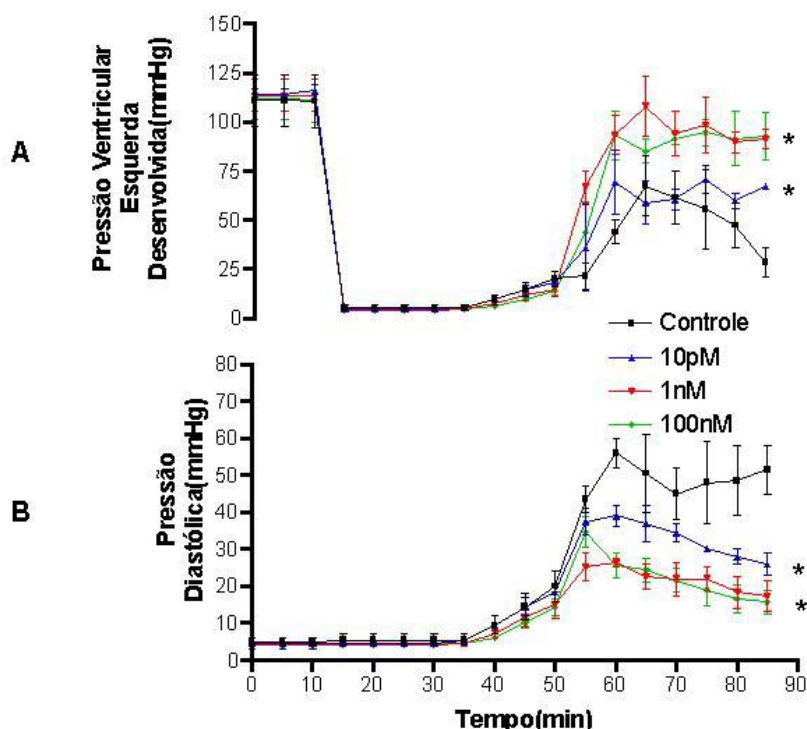


Figura 23- Gráfico representativo do efeito do PD153035 sobre a pressão ventricular esquerda desenvolvida (A) e pressão diastólica (B) em corações isolados controle e perfundidos com 10pM, 1nM e 100nM de PD153035, submetidos a isquemia-reperfusão, . Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 4 experimentos. * $p < 0,05$ comparado a valores controle.

Na figura 24 está representada a relação entre os valores médios de pressão ventricular esquerda desenvolvida (PVED) e pressão diastólica de corações isolados controle, perfundidos com 1nM de PD153035 e perfundidos com 1nM de PD153035 acrescido de 1 μ M de 8-fenilteofilina (8-*F T*), submetidos ao protocolo de isquemia descrito anteriormente. O aumento da PVED no período pós-isquêmico, em experimentos de isquemia com PD153035 acrescido com 8-*F T*, foi de aproximadamente 21% em relação aos valores controle. Da mesma maneira, o efeito de diminuição da pressão diastólica foi de aproximadamente 18%. Nossos resultados mostraram que a perfusão de corações com PD153035 acrescido do inibidor aboliu o efeito protetor do PD153035, comparados com grupos perfundidos apenas com a quinazolina.

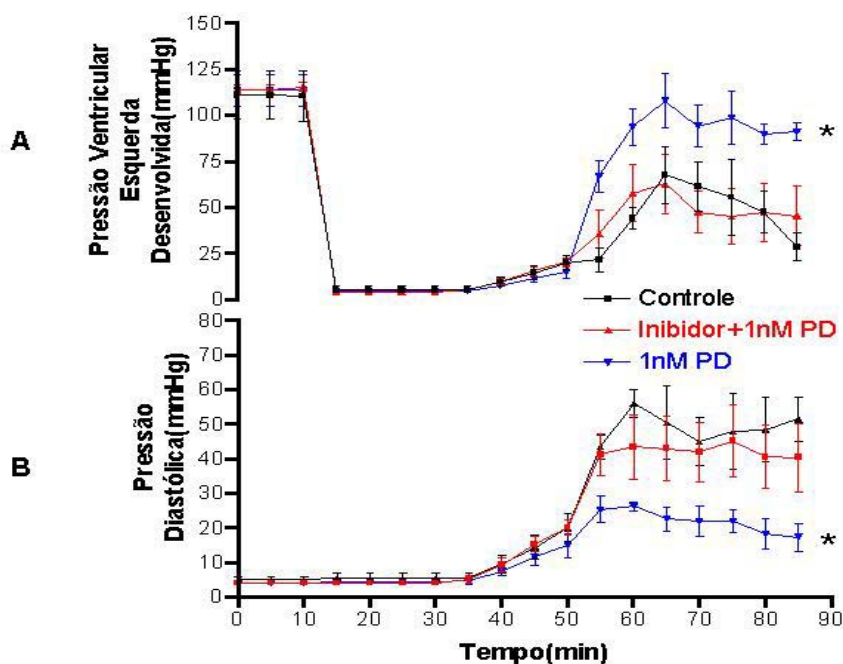


Figura 24- Gráfico representativo do efeito do PD153035 sobre a pressão ventricular esquerda desenvolvida (A) e pressão diastólica (B) em corações isolados controle e perfundidos com 1nM PD153035 acrescido de 1 μ M de 8-*F T*, submetidos a isquemia-reperfusão. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para 4 experimentos. * $p < 0,05$ comparado a valores controle.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos o efeito de compostos quinazolínicos com propriedades inibidoras de tirosina quinase sobre a função de corações isolados de ratos perfundidos em sistema de Langendorff. Os resultados demonstraram que 1) Derivados de compostos quinazolínicos induzem a aumento de pressão ventricular de maneira dependente da concentração com potências na sequência DMA>CLQUI>PD153035; 2) simultaneamente aos aumentos de pressão os compostos quinazolínicos produzem bradicardia, também dependente da concentração, no entanto, com potências semelhantes entre si; 4) O efeito pressor é dependente da bradicardia como demonstrado pela abolição das respostas pressoras ao DMA quando a frequência cardíaca foi mantida em nível constante pela estimulação elétrica através de marcapasso externo; 5) O efeito bradicárdico do PD153035 é dependente da ativação direta ou indireta dos receptores de adenosina, como demonstrado pela abolição deste efeito quando administrou-se bloqueador inespecífico de receptores de adenosina (8-fenil-teofilina) e 6) O derivado PD153035, confere proteção do miocárdio de rato a isquemia através da ativação de receptores de adenosina, como demonstrado pela manutenção da função contrátil após a isquemia miocárdica prolongada e o bloqueio deste efeito pelo inibidor inespecífico do receptor de adenosina 8-fenil-teofilina.

De maneira, geral estes resultados indicam que os compostos quinazolínicos testados agem no coração isolado de ratos de maneira semelhante à adenosina. Não foi possível demonstrar neste estudo o mecanismo específico pelo qual os derivados de quinazolina avaliados no presente estudo mimetizam os efeitos de adenosina, i.e. se por efeito direto nos receptores de adenosina ou se por aumentar a biodisponibilidade da adenosina no miocárdio. Tampouco, foi

possível demonstrar se a atividade inibidora de tirosina quinase destes compostos exerce algum efeito sobre a função de corações isolados de ratos.

O efeito pressor que acompanha a bradicardia em corações isolados de ratos perfundidos com soluções cristalóides é um fenômeno já conhecido. Os estudos que exploraram este fenômeno indicam que este efeito se deve a limitações inerentes da preparação e da capacidade de soluções cristalóides de suprir adequadamente a demanda energética do miocárdio. Assim, em situações de bradicardia, ocorre uma redução no consumo energético do miocárdio, o que permite a melhora no desempenho contrátil e conseqüentemente um aumento na pressão sistólica. Este efeito foi nitidamente demonstrado em nossos experimentos onde os corações foram submetidos a controle de frequência cardíaca com o uso de estimulação elétrica externa onde o impedimento da bradicardia induzido pelos compostos quinazolínicos aboliu a resposta pressora aos mesmos. Da mesma forma, em estudos paralelos, demonstramos que o efeito pressor da adenosina verificado em corações isolados também é abolido pelo controle de frequência cardíaca .

Nossos resultados também demonstraram que o bloqueio com antagonista inespecífico do receptor de adenosina bloqueia a bradicardia produzida pelo derivado quinazolínico PD153035, o que indica que este efeito é dependente da ação da adenosina em seus receptores ou da ação direta nos receptores de adenosina.

No coração os efeitos diretos da ADO são observados em cardiomiócitos (redução da frequência cardíaca), nas células da musculatura vascular lisa e células endoteliais (vasodilatação) e indiretamente sobre a transmissão sináptica

do sistema nervoso autônomo ou em células inflamatórias (cardioproteção) mediados através da ativação de receptores de ADO do tipo A₁, A_{2a} e A₃. (SHRYOCK, J.C. et al **1997**; FREDHOLM, B.B., **2001**; LINDEN, J. **2001**; MUBAGWA, K. et al. **2001**; SAFRAN, N. et al. **2001**; CROSS, H.R. et al. **2002**). O efeito bradicárdico da adenosina é bem conhecido e depende da ação deste composto sobre receptores A₁, que são receptores tipo G proteínas, nas células marcapasso do nó sino-atrial, bem como nas células do nó átrio-ventricular. Estes receptores, por sua vez atuam ativando canais de potássio, e inibindo a ação da adenilato-ciclase, o que prolonga a despolarização diastólica.

Da mesma forma, nossos resultados demonstraram que os derivado quinazolinico PD153035 também protege o miocárdio de isquemia prolongada, efeito este observado em concentrações baixas do composto (~1 nM), o que sugere alta especificidade de ação e mecanismos de controle celular envolvidos na resposta de proteção miocárdica à isquemia. Por outro lado, a proteção miocárdica conferida pelo PD153035 também foi bloqueada pelo antagonista inespecífico dos receptores de adenosina, o que indica que este efeito é também dependente da ativação direta ou indireta de receptores de adenosina como o é o efeito bradicárdico deste derivado.

A adenosina protege o miocárdio e outros tecidos de hipóxia e isquemia através da ativação do receptor A₁ e possivelmente do receptor A₃. Os mecanismos envolvidos neste efeito não são bem conhecidos, no entanto, postula-se que a adenosina ativa os mecanismos de proteção tecidual por aumentar a atividade de canais de potássio ATP dependentes da mitocôndria através de vias de sinalização que envolvem a ativação da PKC (SHRYOCK, J.C. et

al **1997**; FREDHOLM, B.B., **2001**; LINDEN, J. **2001**; MUBAGWA, K. et al. **2001**; SAFRAN, N. et al. **2001**; CROSS, H.R. et al. **2002**).

A demonstração no presente estudo de que os derivados quinazolínicos agem no coração isolado de ratos através de mecanismos semelhantes á adenosina está de acordo com demonstrações anteriores de estes compostos têm estrutura semelhante ao derivados purínicos ATP, ADP, AMP e a própria adenosina. Inclusive a ação inibidora de tirosina quinase tem por base a ocupação dos sítios de acoplamento do ATP por estes compostos nas referidas enzimas, provocando a inibição da atividade quinase das mesmas (REWCASTLE, G. W et al. **1995**). Além disso, existem comprovações de que derivados piridopirimidínicos têm efeito inibidor sobre a atividade de adenosina quinase (COWART, M. et al. **2001**). No contexto do presente estudo, é importante ressaltar que a adenosina quinase contribui de maneira importante para a biodisponibilidade de adenosina, já que com adenosina deaminase constituem-se nas duas principais vias de degradação da adenosina nas células. Desta forma, por bloquear a adenosina quinase, os derivados quinazolínicos utilizados no presente estudo poderiam produzir maior biodisponibilidade da adenosina no miocárdio que, por sua vez produziria os efeitos bradicárdico e de proteção miocárdica observados nos corações isolados no presente estudo. No entanto, permanece por ser esclarecido se estes compostos realmente bloqueiam a atividade de adenosina quinase em corações, bem como se este bloqueio é capaz de aumentar significativamente a concentração local de adenosina no miocárdio, explicando as respostas observadas.

Em conclusão, no presente estudo, avaliamos os efeitos de três derivados quinazolínicos com ação potencial de inibição da atividade de tirosinas quinases sobre o coração isolado de ratos. Demonstramos que em faixas amplas de concentrações (i.e de picomolar a micromolar), estes compostos produzem bradicardia e proteção miocárdica à isquemia através da ativação direta ou indireta de receptores de adenosina. Estudos adicionais são necessários para verificar se a ação de inibição de tirosina quinase destes compostos produz algum efeito funcional no coração ou mesmos se estes compostos influenciam o desenvolvimento de patologias cardíacas que se acompanham de hipertrofia e falência miocárdicas.

No presente estudo avaliamos o efeito de compostos quinazolínicos com propriedades inibidoras de tirosina quinase sobre a função de corações isolados de ratos perfundidos em sistema de Langendorff. Os resultados demonstraram que 1) Derivados de compostos quinazolínicos induzem a aumento de pressão ventricular de maneira dependente da concentração com potências na sequência DMA>CLQUI>PD153035; 2) simultaneamente aos aumentos de pressão os compostos quinazolínicos produzem bradicardia, também dependente da concentração, no entanto, com potências semelhantes entre si; 3) O efeito pressor é dependente da bradicardia como demonstrado pela abolição das respostas pressoras ao DMA quando a frequência cardíaca foi mantida em nível constante pela estimulação elétrica através de marcapasso externo; 4) O efeito bradicárdico do PD153035 é dependente da ativação direta ou indireta dos receptores de adenosina, como demonstrado pela abolição deste efeito quando administrou-se bloqueador inespecífico de receptores de adenosina (8-fenil-teofilina) e 5) O derivado PD153035, confere proteção do miocárdio de rato a isquemia através da ativação de receptores de adenosina, como demonstrado pela manutenção da função contrátil após a isquemia miocárdica prolongada e o bloqueio deste efeito pelo inibidor inespecífico do receptor de adenosina 8-fenil-teofilina.

De maneira, geral estes resultados indicam que os compostos quinazolínicos testados agem no coração isolado de ratos de maneira semelhante à adenosina. Não foi possível demonstrar neste estudo o mecanismo específico pelo qual os derivados de quinazolina avaliados no presente estudo mimetizam os efeitos de adenosina, i.e. se por efeito direto nos receptores de adenosina ou se por aumentar a biodisponibilidade da adenosina no miocárdio. Tampouco, foi possível demonstrar se a atividade inibidora de tirosina quinase destes compostos exerce algum efeito sobre a função de corações isolados de ratos.

O efeito pressor que acompanha a bradicardia em corações isolados de ratos perfundidos com soluções cristalóides é um fenômeno já conhecido. Os estudos que exploraram este fenômeno indicam que este efeito se deve a limitações inerentes da

preparação e da capacidade de soluções cristalóides de suprir adequadamente a demanda energética do miocárdio. Assim, em situações de bradicardia, ocorre uma redução no consumo energético do miocárdio, o que permite a melhora no desempenho contrátil e consequentemente um aumento na pressão sistólica. Este efeito foi nitidamente demonstrado em nossos experimentos onde os corações foram submetidos a controle de frequência cardíaca com o uso de estimulação elétrica externa onde o impedimento da bradicardia induzido pelos compostos quinazolínicos aboliu a resposta pressora aos mesmos. Da mesma forma, em estudos paralelos, demonstramos que o efeito pressor da adenosina verificado em corações isolados também é abolido pelo controle de frequência cardíaca.

Nossos resultados também demonstraram que o bloqueio com antagonista inespecífico do receptor de adenosina bloqueia a bradicardia produzida pelo derivado quinazolínico PD153035, o que indica que este efeito é dependente da ação da adenosina em seus receptores ou da ação direta nos receptores de adenosina.

No coração os efeitos diretos da ADO são observados em cardiomiócitos (redução da frequência cardíaca), nas células da musculatura vascular lisa e células endoteliais (vasodilatação) e indiretamente sobre a transmissão sináptica do sistema nervoso autônomo ou em células inflamatórias (cardioproteção) mediados através da ativação de receptores de ADO do tipo A₁, A_{2a} e A₃. (SHRYOCK, J.C. et al **1997**; FREDHOLM, B.B., **2001**; LINDEN, J. **2001**; MUBAGWA, K. et al. **2001**; SAFRAN, N. et al. **2001**; CROSS, H.R. et al. **2002**). O efeito bradicárdico da adenosina é bem conhecido e depende da ação deste composto sobre receptores A₁, que são receptores tipo G proteínas, nas células marcapasso do nó sino-atrial, bem como nas células do nó átrio-ventricular. Estes receptores, por sua vez atuam ativando canais de potássio, e inibindo a ação da adenilato-ciclase, o que prolonga a despolarização diastólica.

Da mesma forma, nossos resultados demonstraram que os derivado quinazolínico PD153035 também protege o miocárdio de isquemia prolongada, efeito este observado em concentrações baixas do composto (~1 nM), o que sugere alta especificidade

de ação e mecanismos de controle celular envolvidos na resposta de proteção miocárdica à isquemia. Por outro lado, a proteção miocárdica conferida pelo PD153035 também foi bloqueada pelo antagonista inespecífico dos receptores de adenosina, o que indica que este efeito é também dependente da ativação direta ou indireta de receptores de adenosina como o é o efeito bradicárdico deste derivado.

A adenosina protege o miocárdio e outros tecidos de hipóxia e isquemia através da ativação do receptor A1 e possivelmente do receptor A3. Os mecanismos envolvidos neste efeito não são bem conhecidos, no entanto, postula-se que a adenosina ativa os mecanismos de proteção tecidual por aumentar a atividade de canais de potássio ATP dependentes da mitocôndria através de vias de sinalização que envolvem a ativação da PKC (SHRYOCK, J.C. et al **1997**; FREDHOLM, B.B., **2001**; LINDEN, J. **2001**; MUBAGWA, K. et al. **2001**; SAFRAN, N. et al. **2001**; CROSS, H.R. et al. **2002**).

A demonstração no presente estudo de que os derivados quinazolínicos agem no coração isolado de ratos através de mecanismos semelhantes á adenosina está de acordo com demonstrações anteriores de estes compostos têm estrutura semelhante ao derivados purínicos ATP, ADP, AMP e a própria adenosina. Inclusive a ação inibidora de tirosina quinase tem por base a ocupação dos sítios de acoplamento do ATP por estes compostos nas referidas enzimas, provocando a inibição da atividade quinase das mesmas (REWCASTLE, G. W et al.**1995**). Além disso, existem comprovações de que derivados piridopirimidínicos têm efeito inibidor sobre a atividade de adenosina quinase (COWART, M. et al. **2001**). No contexto do presente estudo, é importante ressaltar que a adenosina quinase contribui de maneira importante para a biodisponibilidade de adenosina, já que com adenosina deaminase constituem-se nas duas principais vias de degradação da adenosina nas células. Desta forma, por bloquear a adenosina quinase, os derivados quinazolínicos utilizados no presente estudo poderiam produzir maior biodisponibilidade da adenosina no miocárdio que, por sua vez produziria os efeitos bradicárdico e de proteção miocárdica observados nos corações isolados no presente estudo. No entanto, permanece

por ser esclarecido se estes compostos realmente bloqueiam a atividade de adenosina quinase em corações, bem como se este bloqueio é capaz de aumentar significativamente a concentração local de adenosina no miocárdio, explicando as respostas observadas.

Em conclusão, no presente estudo, avaliamos os efeitos de três derivados quinazolínicos com ação potencial de inibição da atividade de tirosinas quinases sobre o coração isolado de ratos. Demonstramos que em faixas amplas de concentrações (i.e de picomolar a micromolar), estes compostos produzem bradicardia e proteção miocárdica à isquemia através da ativação direta ou indireta de receptores de adenosina. Estudos adicionais são necessários para verificar se a ação de inibição de tirosina quinase destes compostos produz algum efeito funcional no coração ou mesmos se estes compostos influenciam o desenvolvimento de patologias cardíacas que se acompanham de hipertrofia e falência miocárdicas.

6. CONCLUSÕES

Com base em nossos achados, podemos concluir que:

1. Os compostos quinazolínicos induzem bradicardia, sendo este o principal efeito sobre corações isolados de ratos.
2. Os efeitos da adenosina em corações isolados são semelhantes aos efeitos produzidos pelas quinazolininas.
3. Em concentrações muito baixas, o composto quinazolínico PD153035 atua como protetor durante a isquemia do miocárdio, indicando alta especificidade para este efeito.
4. O efeito protetor do PD153035 se dá através da ativação direta ou indireta de receptores de adenosina do miocárdio.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKER A.J.; GIBSON, K. H.; GRUNDY, W.; GODFREY, A. A.; WOODBURN, J. R.; ASHTON, S. E.; CURRY, B. J.; SCARLETT, L.; BROWN, D. S.; 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**, 11(14):1911-4, 2001.

BOLOGNESI , M. L.; MARUCCI, G.; ANGELI P.; BUCCIONI M.; MINARINI A.; ROSINI, M.; TUMIATTI V.; MELCHIORRE C.; Analogues of Prazosin That Bear a Benextramine-Related Polyamine Backbone Exhibit Different Antagonism toward α 1-Adrenoreceptor Subtypes. **J Med Chem**, 44: 362-371, 2001.

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**, 670(2):369-72, 1995.

BRIDGES, A. J.; ZHOU, H.; D. CODY, R.; REWCASTLE, G. W.; MCMICHAEL, A.; SHOWALTER, H. D. H.; FRY, D. W.; KRABER, A. J.; DENNY, W. A.; 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**, 39(1):267-76, 1996.

CHANG, C.; GEAHLEN, R. L.; Protein-tyrosine kinase inhibition: mechanism-based discovery of antitumor agents. **J Nat Prod**, 55(11):1529-60, 1992.

CHEN, C.-L.; MALAVIYA, R.; CHEN, H.; LIU, X.-P.; UCKUN, F. M.; Pharmacokinetics and biologic activity of the novel mast cell inhibitor, 4-(3-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline in mice. **Pharm Res**, 16(1):117-22, 1999.

CHEN, C.-L.; MALAVIYA, R.; CHEN, H.; LIU, X.-P.; UCKUN, F. M.; 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**, 727(1-2):205-12, 1999.

CIARDIELLO, F.; Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. **Drugs**, 60 Suppl 1:25-32; discussion 41-2, 2000.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H.; Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. **J Biol Chem**, 274(20):13729-32, 1999.

COWART, M.; LEE, C.H.; GFESSER, G. A.; BAYBURT, E. K.; BHAGWAT, S. S.; STEWART, A. O.; Structure-Activity Studies of 5-Substituted Pyridopyrimidines as Adenosine Kinase Inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, 11(1):83-6, 2001.

CROSS, H. R.; MURPHY, E.; BLACK, R. G.; 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**, 283(4):H1562-8, 2002.

DOMINGOS, P. P.; FONSECA, P. M.; NADRUZ, JR. W.; FRANCHINI, K. G.; Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 282(2):H556-64, 2002.

ELLIS, A. G.; NICE, E. C.; WEINSTOCK, J.; LEVTZKI, A.; BURGESS, A. W.; WEBSTER, L. K.; 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**, 754(1):193-9, 2001.

FRANCHINI, K. G.; TORSONI, A. S.; SOARES, P. E. A.; SAAD, M. J. A. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. **Circ Res**, 87(7):558-65, 2000.

FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; KLOTZ, K. N.; LINDEN, J.; International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev**, 53(4):527-52, 2001.

FRY, D. W.; KRABER, A. J.; MCMICHAEL, A.; AMBROSO, L. A.; NELSON, J. M.; LEOPOLD, W. R.; A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. **Science**, 265(5175):1093-5, 1994.

FRY, D.W.; 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**, 82(2-3):207-18, 1999.

GAZIT, A.; CHEN, J.; MCMAHON, 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** 4(8):1203-7, 1996.

GOFF, D. C.; PANDEY, D. K.; CHAN, F. A. et al; Congestive heart failure in the United States: is there more than meets the I(CD code)? The Corpus Christi Heart Project. **Arch Intern Med**, 160(2):197-202, 2000.

HENNEQUIN, L. F.; THOMAS, A. P.; JONHSTONE, C.; STOKES, E. S. E.; PLÉ, P. A.; LOHMANN, J. J. M.; Design and structure-activity relationship of a new class of potent VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. **J Med Chem**, 42(26):5369-89, 1999.

HO, K. K. L.; PINSKY, J. L.; KANNEL, W. B.; The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. **J Am Coll Cardiol**, (4 Suppl A):6A-13A, 1993.

JARVIS, M. F. 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: In Vitro Characterization and Acute Antinociceptive Effects in the Mouse. **The J Pharmacol and Exp Ther**, , 295: 1156-1164, 2000.

JEHL, F.; DEBS, J.; Determination of navelbine and desacetylnavelbine in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr**, 525(1):225-33, 1990.

KAISER, S. M.; QUINN, R. J.; Adenosine receptors as potential therapeutic targets. **Drug Discov Today**, 12:542-551, 1999.

KATZ, A. M.; Heart failure in 2001: a prophecy revisited. **Am J Cardiol**, 87(12):1383-6, 2001.

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

KLONER, R. A.; JENNINGS, R. B.; Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2, **Circulation**, 104(25):3158-67, 2001.

LABAUNE, J.-P.; *Farmacocinética*, **Andrei Editora LTDA**, 1993.

LEE, C. H.; JIANG, M.; COWART, M.; GFESSER, G.; PERNER, R.; KIM, K. H.; 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**, 44(13):2133-8, 2001.

LEVITZKI, A.; GAZIT, A.; Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. **Science**, 267(5205):1782-8, 1995.

LEVITZKI, A.; Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. **Pharmacol Ther**, 82(2-3):231-9, 1999.

LINDEN, J.; Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 41:775-87, 2001.

MCCULLOUGH, P. A.; PHILBIN, E. F.; SPERTUS, J. A. et al.; Confirmation of a heart failure epidemic: findings from the Resource Utilization Among Congestive Heart Failure (REACH) study. **J Am Coll Cardiol**, 39(1):60-9, 2002.

MCGARAUGHTY, S.; COWART, M.; JARVIS, M. F.; Recent developments in the discovery of novel adenosine kinase inhibitors: mechanism of action and therapeutic potential. **CNS Drug Ver**, 7(4):415-32, 2001.

MCMURRAY, J.; PFEFFER, M. A.; New therapeutic options in congestive heart failure: Part II. **Circulation**, 105(18):2223-8, 2002.

MENDEZ, G. F.; COWIE, M. R.; The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. **Int J Cardiol**, 80(2-3):213-9, 2001.

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.**;8(11):1353-8, 1998.

MONAHAN, T. S.; SAWMILLER, D. R.; FENTON, R. A.; DOBSON, J. G. J.; Adenosine A2a-receptor activation increases contractility in isolated perfused hearts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**; 279: 1472 – 81, 2000.

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**, 663(2):390-4, 1995.

MOYER, J.D.; BARBACCI, E. G.; IWATA, K. K.; ARNOLD, L.; BOMAN, B.; CUNNINGHAM, A. et al., Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. **Cardiovasc Res**, 52(1):25-39, 2001.

MORRISON R. R.; TALUKDER, M. A. H.; LEDENT, C.; MUSTAFA, S. J.; Cardiac effects of adenosine in A2A receptor knockout hearts: uncovering A2B receptors, **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 282: 437 – 444, 2002.

NOMOTO, Y.; OBASE, H.; TAKAI, H.; TADASHI, H.; TERANISHI, M.; NAKAMURA, J.; Studies on cardiogenic agents. I. Synthesis of some quinazoline derivatives. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**,38(6):1591-5, 1990.

OSHEROV, N.; LEVITZKI, A.; Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. **Eur J Biochem**, 225(3):1047-53, 1994.

RAPUNDALO, S. T.; Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates, **Cardiovasc Res**, 38(3):559-88, 1998.

RAYMOND, E.; SANDRINE, F.; ARMAND, J. P.; Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. **Drugs**, 60 Suppl 1:15-23; discussion 41-2, 2000.

REWCASTLE, G. W.; DENNY, W. A.; BRIDGES, A. J.; ZHOU, H. ; CODY, D. R.; FRY, D. W.; 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**, 38(18):3482-7, 1995.

REYNOLDS, M.M.; 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**, 57(21):4838-48, 1997.

ROCCO, S. A.; *Tese de Doutorado*, UNICAMP (2002).

SAFRAN, N.; SHNEYVAYS, V.; BALAS, N.; JACOBSON, K. A.; NAWRATH, H.; SHAINBERG, A.; Cardioprotective effects of adenosine A1 and A3 receptor activation during hypoxia in isolated rat cardiac myocytes. **Mol Cell Biochem**, 217(1-2):143-52, 2001.

SCHLESSINGER, J.; How receptor tyrosine kinases activate Ras. **Trends Biochem Sci**, 18(8):273-5, 1993.

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**, 43(1):133-8, 2000.

SHRYOCK, J.C.; BELARDINELLI, L.; Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology, **Am J Cardiol**; 79(12A):2-10, 1997.

SMALL, J. B.; REWCASTLE, G. W.; BRIDGES, A. J.; ZHOU, H.; SHOWALTER, H. D. H.; FRY, D. W. 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**, 43(7):1380-97, 2000.

STEWART, S.; MACINTYRE, K.; HOLE, D. J.; et al.; More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. **Eur J Heart Fail**, 3(3):315-22, 2001.

SUTTON, M.G.; SHARPE, N.; Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. **Circulation**, 101(25):2981-8, 2000.

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**, 37, 2106-22, 1994.

TSOU, H.-R.; MAMUYA, N.; JOHNSON, B. D.; REICH, M. F.; GRUBER, B. C.; 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**, 44(17):2719-34, 2001.

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**, 44(13):2204-18, 2001.

WARD, W. H. J.; COOK, P. N.; SLATER, A. M.; DAVIES, H.; HOLDGATE, G. A.; GREEN, L. R.; Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. **Biochem Pharmacol**; 48(4):659-66, 1994.

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**, 43(13):2523-9, 2000.

WOODBURN, J. R.; BARKER, A. J.; GIBSON, K. H.; Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines. **Breast Cancer Res Treat**; 38(1):67-73, 1996.

YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; YAZAKI, Y.; Signalling pathways for cardiac hypertrophy. **Cell Signal**, 10:693-8, 1998.