

Artigo

Inibidores da PDE4: da Descoberta e Fracasso Anunciado ao seu Ressurgimento

de Azevedo, L. L.; Kümmerle, A. E.*

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (2), 465-494. Data de publicação na Web: 30 de dezembro de 2014

<http://www.uff.br/rvq>

PDE4 inhibitors: From Discovery and Announced Failure to its Resurgence

Abstract: Phosphodiesterase 4 (PDE4) acts in the control of cAMP levels, which are involved in modulation of inflammatory processes. This characteristic has made this enzyme a very attractive target for development of anti-inflammatory drugs and numerous PDE4 inhibitors have been described. However, as soon these compounds were discovered, their side effects such as emesis were revealed and doubts about the therapeutic use of these inhibitors in humans grew up. Nevertheless, the synthesis of more selective compounds, summed up to the great ability in inhibiting inflammatory events, led to FDA approval of roflumilast in 2011 for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). This resurgence encouraged the discovery of other therapeutic applications such as treatment of cancer and diseases associated to the immune system, culminating with the approval of apremilast in 2014 for treating psoriatic arthritis. Thus, this review aims to show the stages of development of PDE4 inhibitors, since its discovery until its resurgence with the approval for clinical use, passing through the disbelief that one day this could be possible.

Keywords: PDE4; anti-inflammatory; COPD; therapeutic applications.

Resumo

A fosfodiesterase 4 (PDE4) atua no controle dos níveis de AMPc, o qual está envolvido na modulação de processos inflamatórios. Esta característica tornou este alvo bastante atraente para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios e diversos inibidores de PDE4 foram descritos. Entretanto, logo se descobriu que estes compostos causavam efeitos colaterais, como êmese, o que levou à descrença de que estes pudessem ter alguma aplicação terapêutica e serem usados em humanos. Apesar disto, a síntese de compostos mais seletivos, além da grande capacidade de inibir eventos inflamatórios no sistema respiratório levou a aprovação do roflumilaste pelo FDA, em 2011, para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Este ressurgimento incentivou a descoberta de outras aplicações terapêuticas como o tratamento do câncer e doenças correlacionadas com o sistema imunológico, culminando com a aprovação do apremilaste em 2014 para uso na artrite psoriásica. Assim, esta revisão busca mostrar as etapas de desenvolvimento dos inibidores da PDE4, desde sua descoberta até seu ressurgimento com aprovação para uso clínico, passando pela descrença de que isso fosse possível um dia.

Palavras-chave: PDE4; anti-inflamatório; DPOC; aplicações terapêuticas.

* Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, CEP 23897-000, Seropédica-RJ, Brasil.

✉ akummerle@ufrj.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150022](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150022)

Inibidores da PDE4: da Descoberta e Fracasso Anunciado ao seu Ressurgimento

Luciana Luiz de Azevedo,^{a,b} Arthur Eugen Kümmerle^{a,b,*}

^a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, CEP 23897-000, Seropédica-RJ, Brasil.

^b LaDMol-QM, Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química sala 51, CEP 23897-000, Seropédica-RJ, Brasil.

* akummerle@ufrj.br

Recebido em 1 de dezembro de 2014. Aceito para publicação 2 de dezembro de 2014

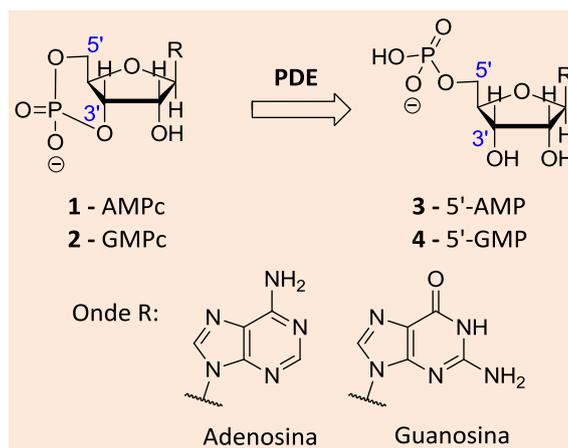
1. A Classe das Fosfodiesterases e sua Caracterização
2. A Fosfodiesterase 4 (PDE4) e sua Função
3. Os Inibidores da PDE4
 - 3.1. Compostos Importantes e Requisitos Estruturais
 - 3.2. A Descoberta de um Novo Padrão de *N*-metil-NAH Inibidor da PDE4
 - 3.3. Efeitos Colaterais Frequentes da Classe dos Inibidores da PDE4
4. A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)
 - 4.1. Tratamentos Disponíveis para a DPOC
 - 4.2. O Ressurgimento dos Inibidores de PDE4 e suas vantagens na DPOC
5. Novas Aplicações da Classe dos Inibidores da PDE4
6. Conclusão

1. A Classe das Fosfodiesterases e sua Caracterização

As fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) foram descritas pela primeira vez em 1962 pelo Dr. Earl Sutherland e seus colaboradores logo após a descoberta do 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (1) em 1958.¹⁻³

Atualmente, entende-se que estas enzimas desempenham um papel crítico na

regulação indireta da sinalização de diversas vias do metabolismo intracelular. Este controle se dá através da hidrólise seletiva de ligações fosfodiéster de substratos específicos como o AMPc (1) e o GMPc (3',5'-monofosfato cíclico de guanósina) (2) que atuam como segundos mensageiros nestas vias de sinalização. A hidrólise das ligações fosfodiéster destes nucleotídeos culmina na inativação dos mesmos, através da formação de 5'-monofosfato de adenosina (5'-AMP) (3), para o substrato AMPc (1), e 5'-monofosfato de guanósina (5'-GMP) (4), para o substrato GMPc (2) (Esquema 1).^{2,4-6}



Esquema 1. Hidrólise da ligação 3'-fosfodiéster para AMPc (**1**) e GMPc (**2**) através da atividade catalítica das PDEs. Onde R = adenosina para AMPc (**1**) e 5'-AMP (**3**) e R = guanosina para GMPc (**2**) e 5'-GMP (**4**)⁶

Após a identificação inicial da classe das fosfodiesterases, percebeu-se que havia mais de uma isoforma destas enzimas com diferentes propriedades cromatográficas, cinéticas, diferentes substratos, especificidade e propriedades farmacológicas que foram identificadas em extratos de cérebro e em outros órgãos de roedores.⁷ Atualmente, relata-se na literatura que há 11 famílias de isoenzimas da classe das PDEs que são nomeadas com algarismos arábicos de 1 a 11, como por exemplo PDE1-PDE11, apresentando distribuições teciduais diferenciadas (Tabela 1). Adicionalmente, cada família possui de 1 a 4 genes distintos, originando mais de 20 genes em mamíferos que decodificam mais de 50 proteínas diferentes. Estes genes são então representados com letras maiúsculas após a numeração respectiva, *i.e.* PDE1A, PDE1B e PDE1C.⁴

Em geral, as PDEs são observadas em sua forma dimérica, ou seja, através da associação de duas subunidades enzimáticas.⁴ A estrutura monomérica de

todas as isoformas é composta por 3 domínios distintos: um domínio catalítico, uma subunidade *N*-terminal e outra *C*-terminal.⁸⁻¹⁰

O domínio *C*-terminal é similar em todas as famílias de PDEs, com exceção da PDE6, que compartilha de 18 a 46% de homologia.¹¹ Este domínio está envolvido em processos de regulação enzimática por fosforilação,¹² mas a sua função fisiológica permanece desconhecida.¹¹ O domínio *N*-terminal difere de forma pronunciável entre as famílias das PDEs e, por isso, auxilia na caracterização das mesmas. Por fim, o domínio catalítico é o responsável pela hidrólise da ligação fosfodiéster presente nos substratos monofosfatos cíclicos, devido à presença de um centro metálico em sua estrutura constituído do íon Zn^{+2} e por vezes também do Mg^{2+} .⁴ O domínio catalítico conserva certa semelhança, pois compartilha de 25 à 52% de homologia entre as famílias de PDE encontradas em mamíferos, tornando a busca por inibidores seletivos de PDEs um grande desafio.⁴

Tabela 1. Família das PDEs: seus respectivos substratos e distribuição tecidual⁴⁻⁶

Família	Substrato	Distribuição em tecido
PDE1	AMPC e GMPc	Coração, cérebro, pulmão e músculo liso
PDE2	AMPC e GMPc	Glândula supra-renal, coração, pulmão, fígado, plaquetas e células endoteliais
PDE3	AMPC e GMPc	Coração, músculo liso, pulmão, fígado, plaquetas, adipócitos e células do sistema imunológico
PDE4	AMPC	Cérebro, rim, fígado, coração, músculo liso, pulmão, células endoteliais e células do sistema imunológico
PDE5	GMPc	Pulmão, plaquetas, músculo liso, coração, células endoteliais e cérebro
PDE6	GMPc	Fotorreceptores, glândula pineal e pulmão
PDE7	AMPC	Músculo esquelético, coração, rim, cérebro, pâncreas e linfócitos T
PDE8	AMPC	Testículos, olhos, fígado, músculo esquelético, coração, rim, ovário, cérebro, linfócitos T e tireoide
PDE9	GMPc	Rim, fígado, pulmão e cérebro
PDE10	AMPC e GMPc	Testículos, cérebro e tireoide
PDE11	AMPC e GMPc	Músculo esquelético, próstata, glândula pituitária, fígado e coração

2. A Fosfodiesterase 4 (PDE4) e sua Função

As fosfodiesterases do tipo 4 (PDE4) são responsáveis pela hidrólise seletiva de AMPC, sendo classificadas como metaloidrolases. Esta enzima possui em seu sítio catalítico íons de Zn^{+2} e Mg^{+2} capazes de formar complexos com o substrato nucleotídico em questão que auxiliam na reação de hidrólise.¹³ Estas enzimas estão presentes em uma gama de diferentes tecidos como células do sistema imunológico, linfócitos T,^{14,15} neutrófilos,¹⁶ monócitos,¹⁷ eosinófilos,¹⁸ basófilos,¹⁹ endotélio e músculo liso de vias aéreas, e cérebro.²⁰

A família PDE4 é codificada por 4 genes

conhecidos como PDE4A (hcl¹:19p13.2), PDE4B (hcl:1p31), PDE4C (hcl:19p13.1) e PDE4D (hcl:5p12), que através de “*splicing* alternativo” originam mais de 25 isoformas humanas distintas de PDE4, tornando esta a família mais extensa dentre as fosfodiesterases.^{4,21} A expressão das isoformas varia de acordo com o tipo celular e o sítio intracelular em que estas estão compartimentalizadas (Tabela 2).^{22,23} Cabe ressaltar que o domínio catalítico das diferentes isoenzimas pertencentes a esta família se conserva na ordem de, aproximadamente, 75% da sequência de aminoácidos.⁵

¹ *human chromosome location*

Tabela 2. Isoformas da família PDE4: distribuição tecidual²⁴

Distribuição em tecido	PED4A	PDE4B	PDE4C	PDE4D
Pulmão e traqueia	**	**	**	**
Linfócitos B	**	**	-	-
Linfócitos T	**	-	-	-
Eosinófilos	**	**	-	**
Neutrófilos	*	**	-	*
Macrófagos	**	-	-	-
Músculo esquelético	***	***	***	***
Fígado, rins e coração	**	**	**	**
Cérebro	-	*	-	**

*** forte expressão; ** expressão; * fraca expressão; - sem expressão.

Estudos de cristalografia de raios-X feitos com a isoforma PDE4B demonstraram que a estrutura do sítio ativo é formada por uma reentrância profunda presente no domínio catalítico da enzima, ficando voltado diretamente para face externa e exposto ao solvente. Este sítio é dividido em três regiões com funções e características físico-químicas distintas (Figura 1).¹³

A primeira região é formada pelo centro metálico composto de íons divalentes, no qual está presente o Zn^{+2} (coordenado com resíduos de histidina e aspartato, além de duas moléculas de água) e o íon Mg^{+2} (coordenado com o mesmo resíduo de aspartato que coordena o Zn^{+2} , bem como mais cinco moléculas de água). Esta região é a responsável pela hidrólise da ligação fosfodiéster do substrato AMPc.^{13,20,25-28}

A segunda região possui uma cavidade hidrofóbica com resíduos de aminoácidos apolares, como isoleucina e fenilalanina, capazes de interagir por interações hidrofóbicas e do tipo π - π *stacking*, respectivamente, com o anel planar purínico presente no AMPc (Figura 1). Nesta mesma região, encontra-se ainda o resíduo de

glutamina 369 que é responsável por uma importante interação com os nitrogênios da adenosina através de ligação hidrogênio.^{13,20,25-28}

A terceira região possui uma cavidade hidrofílica constituída essencialmente de resíduos de aminoácidos hidrofílicos e preenchida com uma rede de moléculas de água.^{13,20,25-28}

Estas regiões são denominadas respectivamente, sítio M, sítio Q e sítio S (Figura 1).^{13,20,25-28}

A hidrólise do AMPc ocorre através da interação desta molécula com os resíduos de aminoácidos presentes nos subdomínios Q e M. No sítio Q ocorre o reconhecimento do núcleo adenosina presente na estrutura do substrato, e no sítio M ocorre a reação de hidrólise propriamente dita. Neste, os átomos de oxigênio presentes na estrutura do substrato interagem com os íons Zn^{+2} e Mg^{+2} , que atuam como ácidos de Lewis (Figura 2), tornando o átomo de fósforo mais eletrofílico e suscetível ao ataque do grupo hidroxila, gerado pela desprotonação de uma molécula de água coordenada nesta região (Figura 2).^{13,22,29}

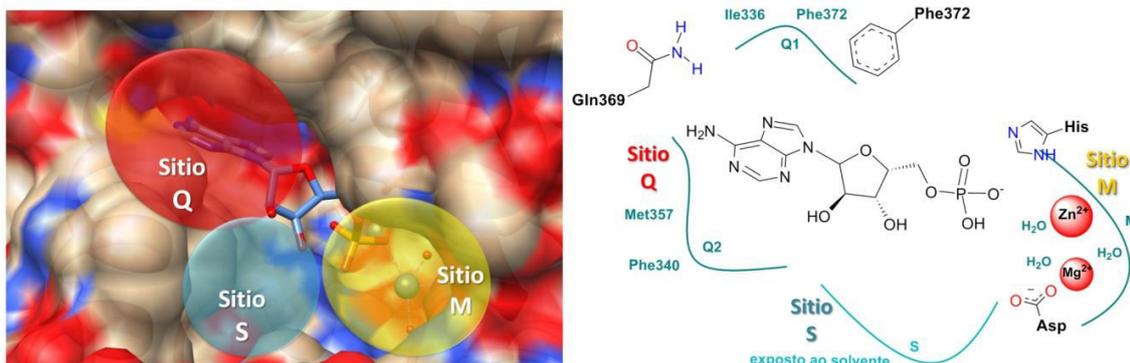


Figura 1. Domínio catalítico da PDE4 com o AMP. Subdomínios destacados em verde, para o subdomínio S, em amarelo, para o subdomínio M, e em vermelho para o subdomínio Q

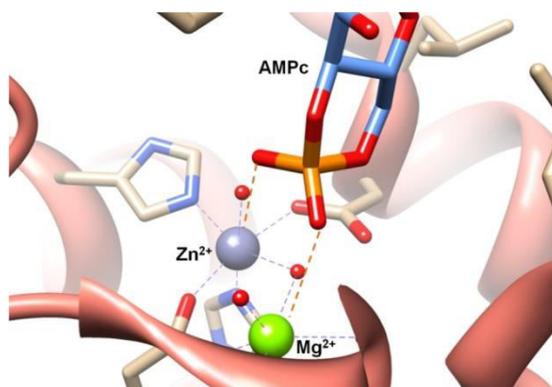


Figura 2. Modelo de interação que leva à hidrólise

Todo este processo enzimático descrito e os níveis de PDE4 são regulados basicamente através de dois processos: transcrição e fosforilação. O processo de transcrição de RNAm (RNA mensageiro), que leva à produção da PDE4, é observado para algumas isoformas após o estímulo ao aumento da concentração de AMPc no meio.^{30,31} Já o processo de fosforilação é regulado através de proteínas dependentes de AMPc. O aumento da concentração deste promove a ativação de proteínas quinases como a PKA (proteína quinase A) e a ERK (quinase reguladora de sinais extracelulares), que por sua vez, atuam na fosforilação da PDE4 regulando a sua atividade.³²

3. Os Inibidores da PDE4

3.1. Compostos Importantes e Requisitos Estruturais

O fato da PDE4 estar envolvida com o controle dos níveis de AMPc, o qual está envolvido na modulação de processos inflamatórios, e possuir distribuição variada no corpo humano relacionada a seus subtipos, *i.e.* A-D, criou ao mesmo tempo oportunidades e desafios para programas de desenvolvimento de fármacos que visavam, num primeiro momento, a busca por novos anti-inflamatórios.

A teofilina (5) (Figura 3) foi o primeiro inibidor de PDEs a ser utilizado na terapêutica. No entanto, este composto é um

inibidor pouco potente e pouco seletivo entre as diferentes isoformas de PDEs (Cl_{50} PDE1 = 134 μ M; PDE2 = 264 μ M; PDE3 = 110 μ M; PDE4 = 322 μ M; PDE6 = 582 μ M; PDE10 = 307 μ M),³³ pertencente a uma família de derivados da metilxantina, como a 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (**6**), arofilina (**7**), doxofilina (**8**), cipamfilina (**9**) e a pentoxifilina

(**10**) (Figura 3).²⁰ Efeitos colaterais são observados com a utilização desta classe, pois a mesma apresenta janela terapêutica estreita, limitando seu uso na terapia medicamentosa.^{34,35} Embora não sejam mais comumente utilizados, estes fármacos são bastante conhecidos por suas atividades broncodilatadora e anti-inflamatória.^{36,37}

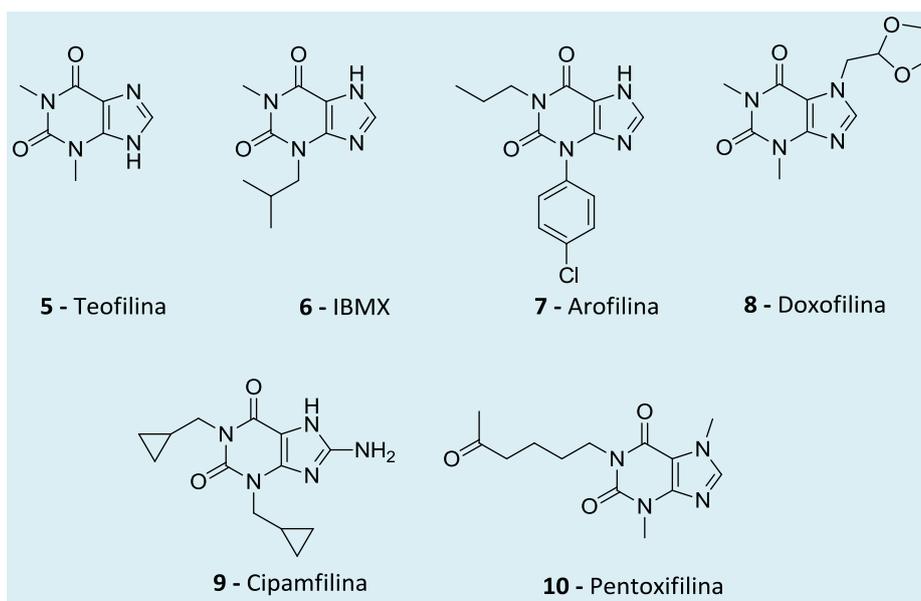


Figura 3. Derivados da metilxantina inibidores de PDEs

Um dos representantes da primeira geração de inibidores de PDE4 é o rolipram (**11**) (Figura 4).³⁸ Este composto é um potente e seletivo inibidor da PDE4 (Cl_{50} = 800nM),³⁹ apresentando 100 vezes mais seletividade por esta isoforma com relação às outras PDEs.^{5,33,40} Curiosamente, o rolipram (**11**) foi planejado como um composto antidepressivo,^{38,41} mas se mostrou ser um inibidor promissor da hidrólise do AMPc em tecidos cerebrais e um eficaz modulador da atividade anti-inflamatória e imunológica.^{42,43,44}

O rolipram (**11**), assim como outros inibidores de PDE4 de primeira geração, apresentou efeitos colaterais indesejados como náuseas, vômitos e diarreia.^{5,11,20} Entretanto, o grande potencial anti-inflamatório destes compostos serviu de incentivo a pesquisadores de universidades e indústrias, o que acabou levando ao desenvolvimento de inibidores de PDE4 mais seletivos e avançados como o roflumilaste (**12**) e o cilomilaste (**13**) (Figura 4), ditos inibidores da PDE4 de segunda geração.^{40,45}

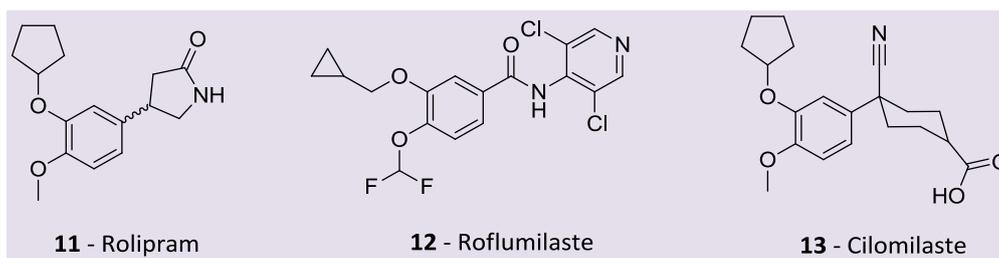
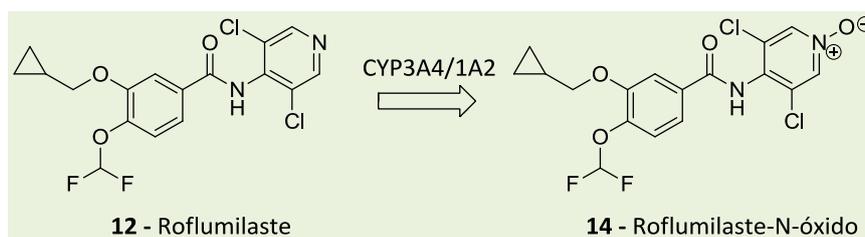


Figura 4. Inibidores da PDE4 da 1ª e 2ª geração

O roflumilaste (**12**) foi identificado, inicialmente, em 1993 a partir de uma série de benzamidas em um programa de triagem em alta escala. Este composto apresentou potência elevada (Tabela 3) e alta seletividade para inibição da enzima PDE4,^{40,46} sem, entretanto, mostrar seletividade entre as diferentes isoformas de PDEs4, com exceção da PDE4C, que é inibida com uma potência ligeiramente inferior às

outras (Tabela 3).⁴⁷ Curioso destacar que este composto pode ser rapidamente metabolizado a sua forma *N*-oxidada (Esquema 2) pelo complexo enzimático citocromo P450 (CYP3A4 e CYP1A2).⁴⁸ O roflumilaste-*N*-óxido (**14**) é apenas duas a três vezes menos potente do que o composto não metabolizado com relação à inibição da PDE4 (Tabela 3), mas mantém alta seletividade para esta família enzimática.³³



Esquema 2. Roflumilaste (**12**) e seu produto de metabolização³³

O cilomilaste (**13**) também é um potente inibidor seletivo da PDE4, assim como o roflumilaste (**12**), sendo aproximadamente 10 vezes mais seletivo para a isoforma PDE4D se comparado às outras isoformas (Tabela 3). A introdução do grupo carboxilato em sua estrutura faz com que, em pH fisiológico, este permaneça desprotonado diminuindo sua lipofilicidade e dificultando uma possível passagem do fármaco para o sistema nervoso central, onde o mesmo poderia exercer efeitos colaterais indesejáveis.^{33,49,50}

Uma característica em comum de um grupo extenso de inibidores da PDE4, incluindo os anteriormente citados rolipram (**11**), roflumilaste (**12**) e cilomilaste (**13**) é a presença do grupo dialcoxi-fenila, como pode ser visto nas estruturas químicas destes compostos.²⁰ Adicionalmente, é possível perceber a presença de outras funções químicas com características e disposições espaciais semelhantes. De fato, isto ocorre devido a grande similaridade entre as estruturas proteicas das PDEs4.

Tabela 3. Valores de CI_{50} para as isoformas de PDE4³³

Composto	CI_{50} (nM)									
	4A1	4B2	4C2	4D2	1A3	2A3	3A1	5A1	6	7A1
Roflumilaste	0,7	0,2	4,3	0,3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	4500	4200	$>10^3$
Roflumilaste-N-óxido	1,4	1,1	7,8	0,4	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	6300	$>10^3$
Cilomilaste (μ M)	0,11	0,09	0,63	0,018	48	84	>100	>100	24	>100

Os subdomínios Q, M e S do sítio catalítico das PDE4s apresentam diferenças muito sutis em termos de conformação, visto que estas regiões compartilham mais de 80% de homologia na sequência de aminoácidos entre os subtipos de PDE4.^{24,51} Assim, o planejamento de inibidores de PDE4 pode ser feito a partir do mapa farmacofórico descrito na Figura 5A.

As análises estruturais a partir de *docking* molecular e de co-cristais sugerem que o inibidor ideal de PDE4 deve ter: a) uma subunidade aromática que possa realizar interações π - π *stacking* com resíduos de fenilalanina e interações hidrofóbicas com resíduos de isoleucina e metionina (Figura 5A, região azul); b) possibilidade de atuar comoceptor de ligações de hidrogênio para interagir com Gln369 (Figura 5A, região laranja); c) apresentar grupos hidrofóbicos ligados ao anel aromático que possam ser acomodados nos bolsões hidrofóbicos Q1 e Q2 (Figura 5A, região vermelha); d) um grupo polar, ligado ao anel aromático anteriormente citado por meio de espaçadores, que possa realizar interações eletrostáticas com os átomos do metal ou de

ligações de hidrogênio com as águas presentes neste subdomínio M (Figura 5A, região verde); e) apesar de não obrigatório, grupos polares também podem ser ligados ao anel aromático visando interações com o subdomínio de acesso ao solvente, que é rico em resíduos de aminoácidos polares, e desta forma podem auxiliar no aumento da hidrossolubilidade dos compostos (Figura 5A, região verde).²⁴

Na figura 5B, temos o cilomilaste (**13**) incluído no modelo farmacofórico e podemos perceber como ele se sobrepõe perfeitamente aos descritores de inibição enzimática da PDE4.

Estas características estruturais se encontram presentes não só no cilomilaste (**13**), como também em diferentes exemplos de reconhecidos iPDEs4 como a zardaverina (**15**), o filaminaste (**16**), o mesopram (**17**), o piclamilaste (**18**), o tetomilaste (**19**) e o apremilaste (**20**) (Figura 6). Dentre estes compostos, percebe-se que todos lançam mão do uso de grupos dialcoxi-fenila como grupos aceptores de ligação-H na interação com a glutamina 369.

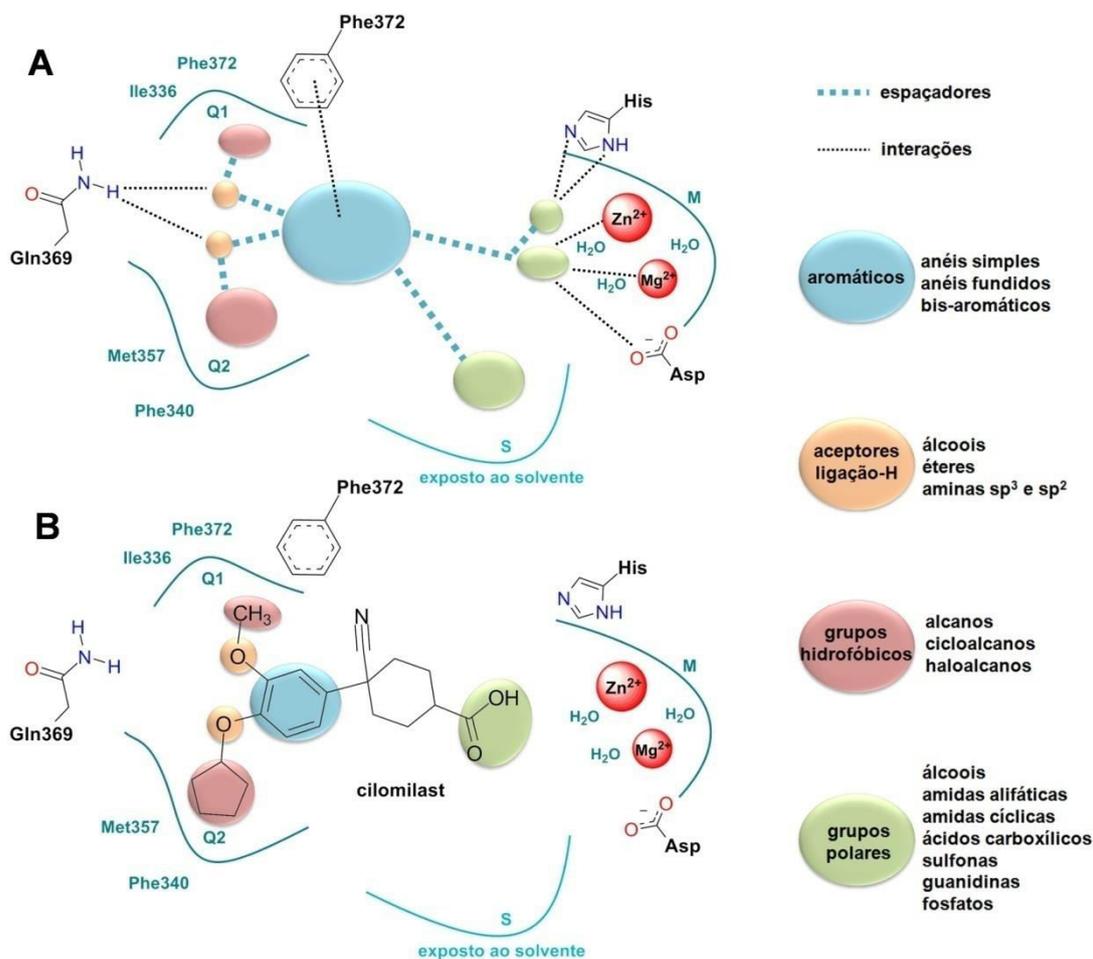


Figura 5. A. Mapa fármacofórico com a disposição e tipos de grupos funcionais necessários a inibição da PDE4; **B.** Sobreposição do iPDE4 cilomilaste (**13**) ao mapa farmacofórico

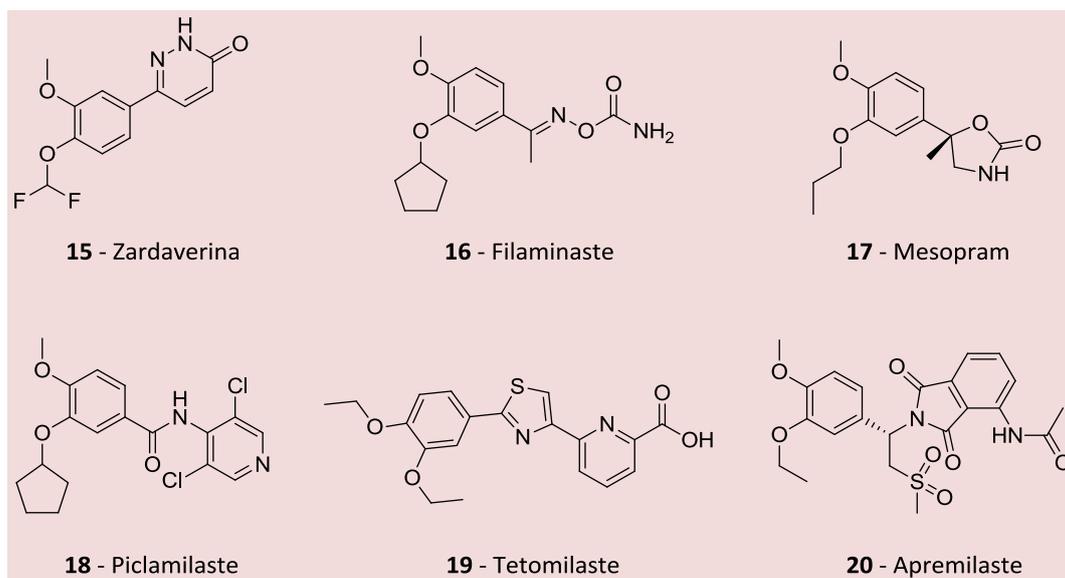


Figura 6. Inibidores da PDE4 do grupo dialcoxifenila

Entretanto, diversos outros inibidores descritos na literatura possuem estruturas completamente diferentes dos representantes dos dialcoxi-fenilas. Nas Figuras 7 a 9 estão representados compostos (**21-25**) de algumas das séries recentemente descritas que apresentam grande potência sobre a inibição da PDE4, mas onde este

grupamento não está presente.⁵²⁻⁵⁶ Alguns destes compostos, como **21**, foram planejados utilizando a estratégia de bioisosterismo não clássico de restrição conformacional, onde se pode vislumbrar a anelação da uma das metoxilas, originando os aza-heterociclos metoxilados que podem mimetizar as dialcoxi-fenilas (Figura 7).⁵²

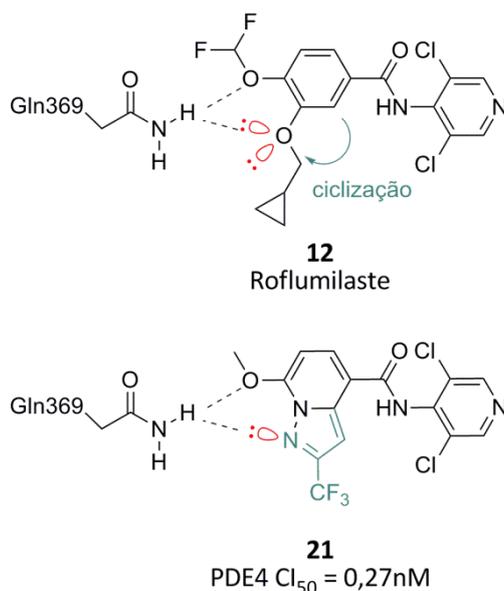


Figura 7. Composto heterociclo (**21**) planejado por anelação da metoxila do roflumilaste (**12**)

Já outros compostos (**22-25**) possuem grupamentos bastante diferenciados e podem inibir a PDE4 de formas distintas (Figura 8). Um exemplo são os benzoxaboróis (**25**),⁵⁵ pequenas moléculas contendo um átomo de boro ciclizado em um anel de cinco membros fundido a um anel benzeno, que demonstram um modo de ligação ao sítio da

PDE4 diferenciado com relação aos derivados catecólicos. Esta classe de compostos se liga a PDE4 principalmente através da sua função oxa-borol por meio de interações diretas com o sítio bimetálico, como pode ser observado em sua estrutura cristalográfica, sem interagir com a glutamina 369 (Figura 9).⁵⁷

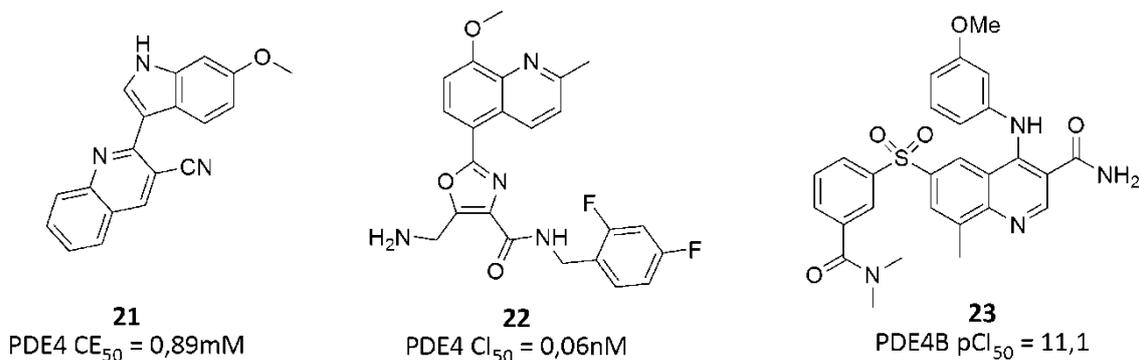


Figura 8. Novas estruturas de inibidores de PDE4 com diferentes arcaouços moleculares.

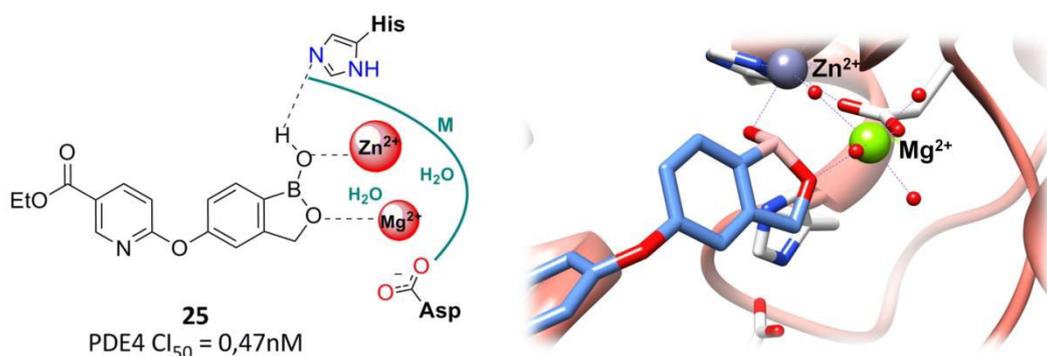


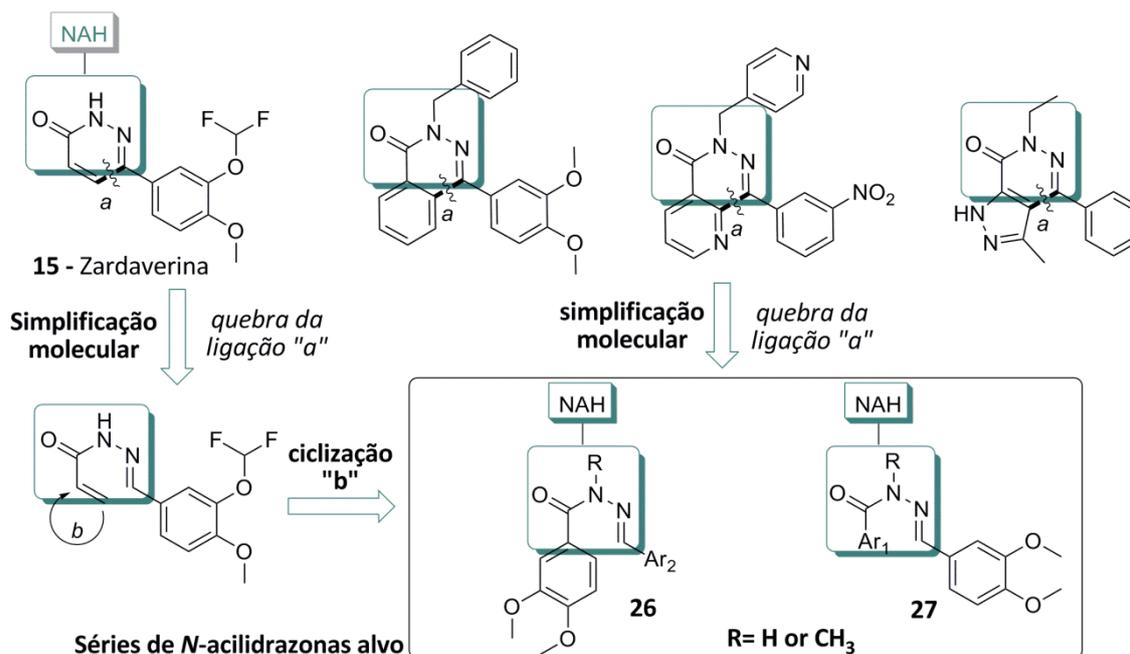
Figura 9. Modo de interação dos derivados oxa-boróis (**25**) com a PDE4

Além da potência frente a PDE4, a busca por seletividade frente às isoformas, já que estas estão distribuídas de maneira diferenciada pelos tecidos, é também um grande desafio. O desenho destes inibidores não deve passar por um planejamento baseado exclusivamente no sítio catalítico, mas sim explorando as diferenças de sequências fora do sítio ativo. Uma maior seletividade entre as PDE4B e PDE4D, por exemplo, pode ser atingida pelo planejamento de moléculas que possam atingir hélice C-terminal reguladora, atualmente denominada CR3 (Região de Controle 3), a partir do sítio ativo, numa conformação que impeça o acesso do AMPc ao mesmo.^{13,58} A seletividade frente a PDE4B é dirigida por um único polimorfismo sobre o aminoácido na CR3 (Leu674 na PDE4B1 frente a Gln594 na PDE4D). As mutações recíprocas sobre a PDE4B e PDE4D podem causar uma mudança de 70-80 vezes na seletividade. No entanto, diversas vezes os compostos seletivos frente aos diferentes subtipos enzimáticos podem apresentar mecanismos de inibição complexos, o que gera a necessidade de análises mais aprofundadas através da resolução completa da proteína por meio de estudos estruturais como, por exemplo, a difração de raios-X.⁵⁸

3.2. A Descoberta de um Novo Padrão de *N*-metil-NAH Inibidor da PDE4

Recentemente, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) deu uma grande contribuição para o entendimento de como as *N*-acilidrazonas (NAH) poderiam atuar como iPDE4, através da *N*-metilação da subunidade amídica destes compostos.³⁹ Apesar de uma grande variedade de estruturas químicas terem sido descritas como iPDE4, este foi o primeiro relato desta classe de compostos.

Estas NAHs (**26** e **27**) foram planejadas lançando-se mão de estratégia de simplificação molecular de inibidores conhecidos da PDE4,⁵⁹ através de uma simples ruptura da ligação entre as posições 5 e 6 do anel piridazinona central, o que permitiu identificar as semelhanças estruturais entre estes compostos e as NAHs (Esquema 3). Vale destacar que esta estratégia já havia sido previamente utilizada pelo LASSBio na descoberta do protótipo cardioativo LASSBio-294, um agente inotrópico positivo e vasodilatador que atua através da modulação dos níveis de GMPc,^{60,61} demonstrando uma relação bioisotérica entre as NAHs e a zardaverina (**15**), um iPDE4.⁶²



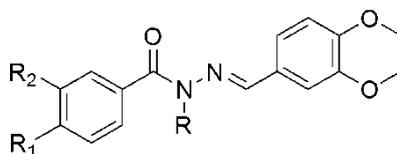
Esquema 3. Planejamento da série das *N*-acilidrazonas iPDE4 **26** e **27**³⁹

Os grupos farmacofóricos para a inibição da PDE4, como anéis dialcoxi-fenila, foram escolhidos para serem ligados ao grupo carbonila (Ar_1) e/ou ao grupo imina (Ar_2). Adicionalmente, foi selecionado um conjunto de anéis aromáticos com diferentes substituintes, visando à modulação de parâmetros estéricos e eletrônicos em Ar_1 e Ar_2 . Por fim, o grupo explorou o efeito da *N*-metilação das NAHs ($R = H$ ou Me), uma estratégia anteriormente utilizada na síntese de potentes NAHs vasodilatadoras que demonstrou a grande importância do grupo metila na modificação das conformações bioativas desta classe de compostos.^{63,64}

De fato, os resultados farmacológicos demonstraram o acerto no planejamento da série, nos quais foram obtidos compostos com potência inibitória da PDE4 de até 50 nM, além de seletividade frente a outras isoformas de até 182 vezes (Tabela 4). Interessantemente, os compostos que apresentaram atividade inibitória tinham alguns requisitos estruturais bastante marcantes como: 1- o grupo farmacofórico dialcoxi-fenila precisava estar ligado à subunidade imina das NAHs; 2- o anel fenila

ligado a carbonila, apesar de não alterar sobremaneira a potência frente a PDE4, alterava drasticamente a seletividade frente a outras isoformas; e 3- a *N*-metilação se mostrava crucial para a atividade iPDE. Sem a presença da metila, os compostos não apresentavam atividade.³⁹

O uso de cálculos teóricos de *docking* molecular entre as NAHs (**27**) e a PDE4 ajudou a explicar a importância destes requisitos farmacofóricos para a atividade (Figura 10). O grupo dialcoxi-fenila ligado à imina se posicionava na subunidade Q do sítio (cavidade hidrofóbica) realizando interações π - π *stacking* com as fenilalaninas 340 e 372, bem como duas ligações de hidrogênio com a glutamina 369. Estas interações direcionavam a carbonila amídica diretamente para o sítio de hidrólise do AMPc, onde esta realiza ligações de hidrogênio com os resíduos de água próximos aos metais. Todo esse arranjo só era possível devido a *N*-metilação das NAHs que fazia com que o oxigênio da sua função amida assumisse uma conformação *cis* com relação à metila.³⁹

Tabela 4. Atividades e seletividades das NAHs (**27**) frente à inibição da PDE4³⁹

R	R ₁	R ₂	PDE4 Cl ₅₀ ^a	Selet.
H	H	H	-	-
H	OCH ₂ O		-	-
H	Cl	H	-	-
H	OCH ₃	H	-	-
H	OH	H	-	-
CH ₃	H	H	140nM	140
CH ₃	OCH ₂ O		110nM	>90
CH ₃	Cl	H	150nM	45
CH ₃	OCH ₃	H	105nM	1,5
CH ₃	OH	H	50nM	182

^a não foram representados os Cl₅₀ quando as % de inibição foram menores do que 50% à 10μM.

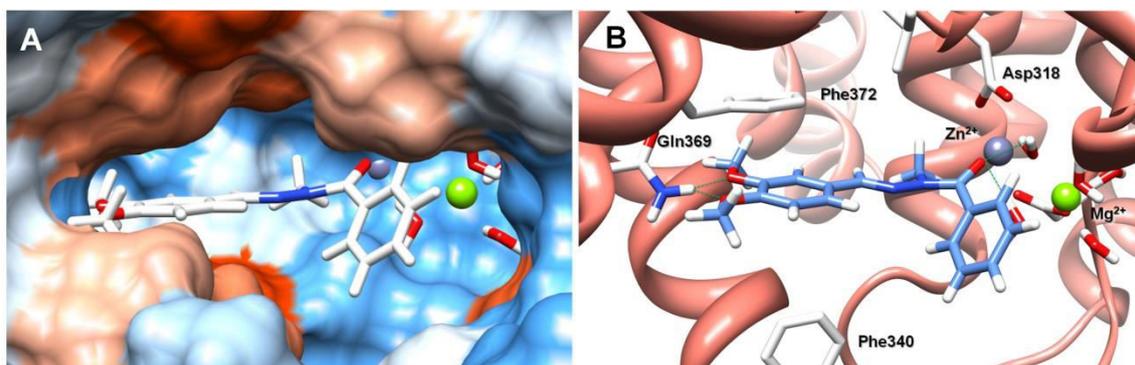


Figura 10. *N*-metil-NAH posicionada no sítio catalítico da PDE. **A.** Visualização da cavidade de acesso ao solvente. **B.** Interações com o sítio catalítico³⁹

A avaliação *in vivo* destes compostos em modelos de inflamação respiratória, administrados por via oral, demonstrou a importância desta classe de compostos. Todas as *N*-metil-NAHs foram capazes de reverter parâmetros inflamatórios como a produção das citocinas TNF- α e IL-6; e a migração celular de leucócitos e neutrófilos,

bem como levar a uma broncodilatação com eficácia semelhante ao composto referência rolipram (**11**) no modelo de hiperreatividade pulmonar induzida por metacolina. Adicionalmente, os compostos NAHs se mostraram isentos dos efeitos colaterais típicos desta classe de inibidores quando testados *in vivo* no modelo de anestesia

induzida por xylazina, mesmo em altas doses de 200 $\mu\text{mol/Kg}$ administradas por via subcutânea.³⁹

3.3. Efeitos Colaterais Frequentes da Classe dos Inibidores da PDE4

Como exposto, efeitos colaterais são comumente relatados e associados ao uso da teofilina (**5**) e dos derivados da xantina que não apresentam seletividade entre as diferentes PDEs. Entretanto, diversos inibidores seletivos da PDE4 também produzem uma quantidade considerável de efeitos adversos como náuseas, vômito, diarreia, dores abdominais, dores de cabeça, dentre outros, que são desvantagens significantes para a utilização terapêutica destes fármacos.⁶⁵⁻⁶⁷

Os mecanismos responsáveis pelo aparecimento de efeitos colaterais têm sido investigados para auxiliar na descoberta de novos inibidores de PDE4 mais seguros. Uma hipótese levantada inicialmente tem correlação com a inibição de PDE4 em tecidos que não são os alvos, especialmente nos sistemas nervoso central e gastrointestinal.⁶⁸ Uma segunda hipótese considera que estes efeitos secundários são causados pela interação com o sítio de alta afinidade, chamado de sítio de ligação de alta afinidade do rolipram (**11**), no sistema nervoso central e em células secretoras de ácido gástrico.⁶⁹ Outra proposição enfatiza que a inibição de uma isoforma específica de PDE4, mais provavelmente a PDE4D, seria a fonte dos efeitos eméticos ocorridos com a utilização de inibidores desta família enzimática.^{68,70-72} No entanto, ainda não se tem uma resposta definitiva de qual dos mecanismos descritos, ou até mesmo um novo, seria o real responsável pelos efeitos colaterais.

Esta problemática de diversos representantes da classe dos inibidores da PDE4 apresentarem efeitos colaterais gerou um grande ceticismo da comunidade científica quanto à possibilidade de um dia

estes inibidores se tornarem fármacos, o que num primeiro momento pareceu verdade. No entanto, apesar destes efeitos colaterais, a falta de alternativas efetivas para o tratamento de doenças inflamatórias de cunho respiratório estimulou esforços visando à descoberta de novos inibidores de PDE4 mais seguros, pois estes demonstram grande potencial terapêutico nestes quadros inflamatórios.

Este esforço foi recompensado recentemente, com a aprovação do roflumilaste (**12**) para uso no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), uma doença que afeta o sistema respiratório na qual os inibidores de PDE4 tem se mostrado extremamente eficazes.⁷³

4. A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A DPOC é uma enfermidade respiratória que se caracteriza pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo que não é totalmente reversível. Esta obstrução é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos.⁷⁴ É um importante problema de saúde pública com uma prevalência global de 10,1%,⁷⁵ tendo causado mais de 3 milhões de mortes no mundo em 2012 e prevista para ser a quarta causa de morte em 2030.^{76,77}

Embora a DPOC comprometa os pulmões, ela também produz consequências sistêmicas significativas como a depleção nutricional, disfunção do músculo esquelético periférico, perda de peso, inflamação sistêmica, dentre outras.^{74,78} Há um consenso de longa data que o tabagismo é o fator etiológico mais comum em pacientes com DPOC,⁷⁹ mas a patogênese exata ainda é desconhecida. Sabe-se que a disfunção do músculo liso e a inflamação crônica das vias aéreas desempenham papéis importantes no estabelecimento e progressão da doença. Consequentemente, os anti-inflamatórios e medicamentos broncodilatadores são

utilizados extensivamente para o tratamento da DPOC.⁸⁰

4.1. Tratamentos Disponíveis para a DPOC

A teofilina (**5**) tem sido utilizada no tratamento da asma e DPOC desde 1930, embora sua popularidade tenha diminuído devido à introdução dos broncodilatadores e glicocorticoides. A teofilina (**5**) é utilizada muitas vezes associada com corticosteroides como segunda e terceira linha de escolha terapêutica para o tratamento da asma e em combinação com broncodilatadores de longa

ação na DPOC.^{25,34,81-83}

Os agonistas dos receptores β_2 adrenérgicos também são usados no tratamento de asma e DPOC, devido ao seu efeito broncodilatador.⁸⁴ Estes receptores são encontrados nos pulmões e estão presentes na superfície muscular, epitélio, glândulas cerosas e mucosas, pneumócitos, fibroblastos e músculo liso vascular deste órgão.⁸⁵ Atualmente existem duas classes de agonistas dos receptores β_2 : os de curta duração como o salbutamol (**28**) e fenoterol (**29**), por exemplo, e de longa duração como o salmeterol (**31**) e formoterol (**30**) (Figura 11).⁸⁶

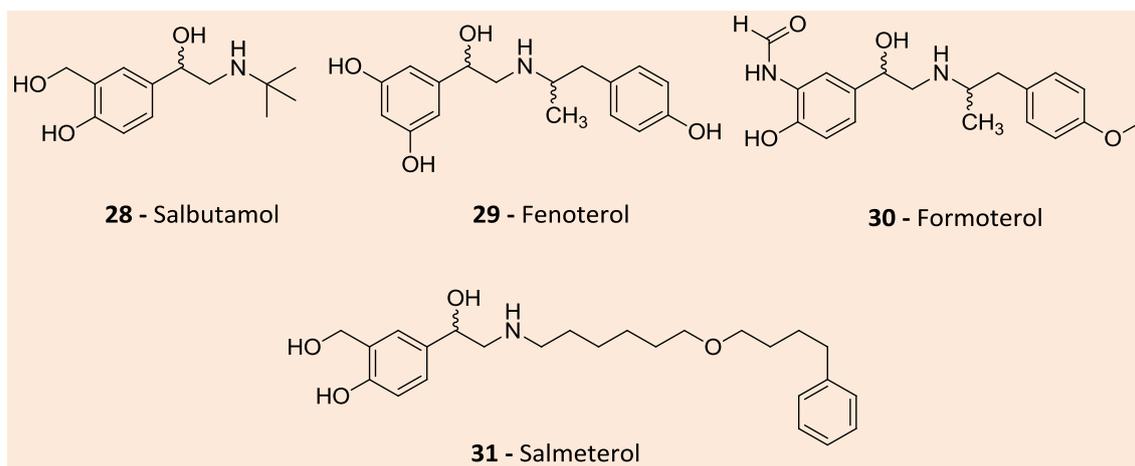


Figura 11. Agonistas dos receptores β_2 adrenérgicos

Outra classe de broncodilatadores utilizada no tratamento da DPOC é a dos anticolinérgicos ou antimuscarínicos. Receptores muscarínicos dos tipos M1 e M3 estão localizados nas vias respiratórias humanas e quando estimulados promovem a broncoconstrição e estimulam a secreção de muco.^{87,88} Desta maneira, os antagonistas dos

receptores muscarínicos atuam basicamente na inibição deste processo de broncoconstrição das vias aéreas. Como exemplos de anticolinérgicos disponíveis para o tratamento da DPOC têm-se os brometos de ipatrópio (**33**) e de tiotrópio (**32**) (Figura 12).⁸⁹

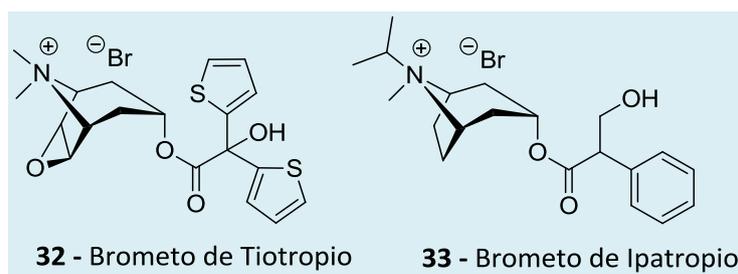


Figura 12. Moduladores da atividade dos receptores M3 muscarínicos

Os glicocorticoides são os fármacos anti-inflamatórios mais eficazes utilizados para o tratamento de diversas doenças inflamatórias crônicas, incluindo a asma e artrite reumatoide, mas são pouco eficazes na

DPOC.⁹⁰ Como exemplo desta classe utilizada para o tratamento da DPOC têm-se o propionato de fluticasona (35) e a budesonida (34) (Figura 13).⁸⁹

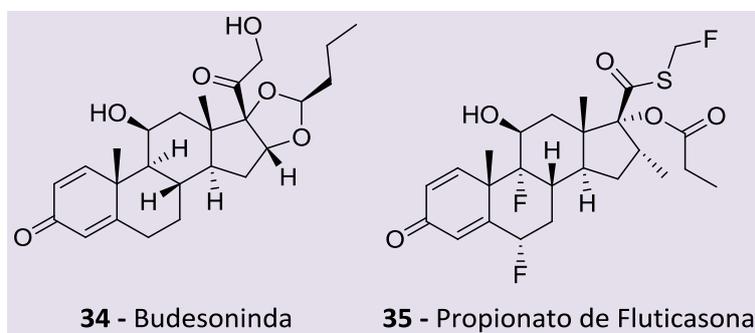


Figura 13. Glicocorticoides utilizados no tratamento da DPOC

Os sintomas multifacetados associados à DPOC levaram a utilização de medicamentos associados como o Advair® (salmeterol e propionato de fluticasona), quarto fármaco mais vendido do mundo em 2012, e Symbicort® (formoterol e budesonida).^{89,91}

4.2. O Ressurgimento dos Inibidores de PDE4 e suas vantagens na DPOC

Até o ano de 2010 não havia grandes opções farmacoterapêuticas disponíveis no mercado para o tratamento da DPOC. Como dito anteriormente, o tratamento baseava-se na administração de broncodilatadores inalatórios e glicocorticoides que atuavam no alívio dos sintomas.^{92,93} Em geral, as terapias disponíveis não suprimiam adequadamente a inflamação e, até mesmo os corticosteroides

que atuavam bem para o tratamento da asma, não reduziam a progressão da DPOC.^{33,94}

Nos últimos anos, os inibidores de PDE4 foram avaliados como terapias promissoras para o tratamento de distúrbios inflamatórios pulmonares, incluindo asma e DPOC.^{39,95} Como já descrito, as fosfodiesterases são enzimas que atuam na hidrólise do AMPc. Este nucleotídeo é o responsável pelo bloqueio da proliferação e quimiotaxia de células inflamatórias, pela inibição da atividade de células pró-inflamatórias, e pela supressão da liberação de mediadores inflamatórios e citotóxicos nos pulmões. Desta maneira, inibidores de PDE4 podem bloquear a hidrólise do AMPc e proporcionar uma atividade anti-inflamatória nas vias aéreas e sistêmica pela inibição da atividade desta enzima (Figura 14).⁹⁶

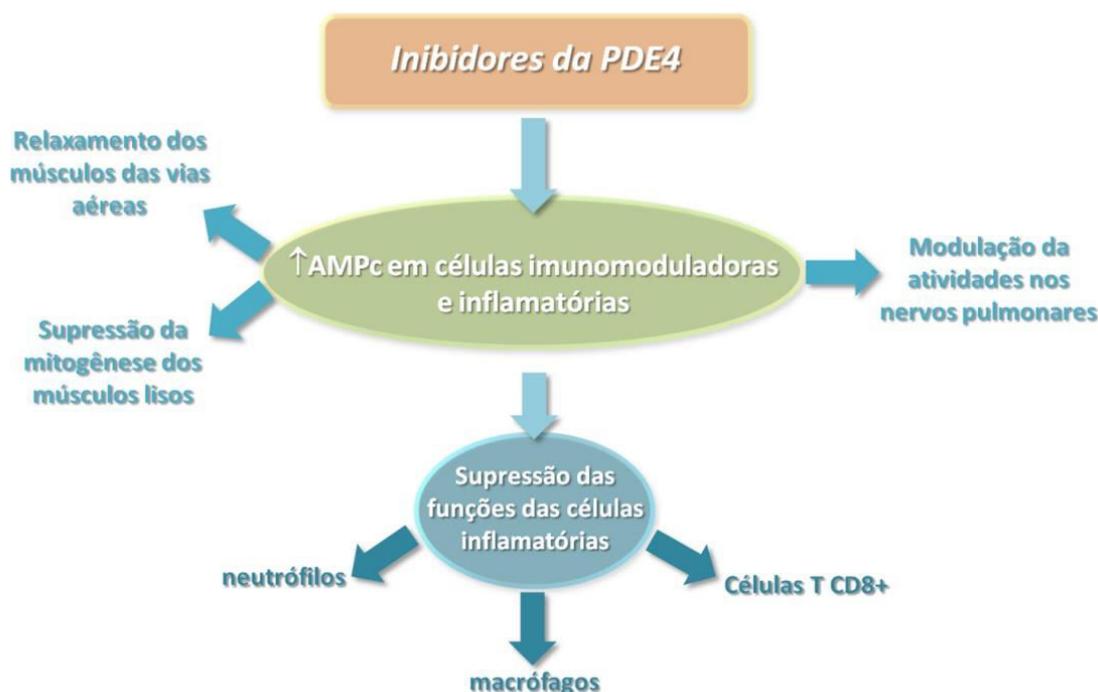


Figura 14. Mecanismo de inibição da PDE4 na DPOC⁹⁵

De fato, esta classe de medicamentos tem se mostrado tão promissora no tratamento da DPOC que em 2011 foi concedida a aprovação ao roflumilaste (**12**) pelo FDA como uma nova alternativa para o tratamento da DPOC. Este fármaco foi o primeiro inibidor seletivo de PDE4 a ser aprovado para este fim. Ele apresenta eficácia clínica comprovada na diminuição do processo inflamatório estabelecido na patologia e significativa melhora da função pulmonar de pacientes em fases mais avançadas da DPOC.^{4,33} Estes efeitos benéficos também foram observados quando o fármaco foi associado a broncodilatadores de ação prolongada (tanto agonistas dos receptores β_2 , quanto antagonistas dos receptores muscarínicos), ressaltando a atividade anti-inflamatória de roflumilaste (**12**) na DPOC.^{33,73}

Os testes clínicos de fase III demonstraram que uma dose de 500 mg de roflumilaste (**12**) por dia promovia uma melhora na função pulmonar de pacientes

em fases moderada à severa da doença, o que tornou a utilização deste fármaco uma alternativa no tratamento da DPOC.^{33,73}

Mesmo com esta aprovação, o cenário de pesquisa atual mostra uma busca por inibidores de PDE4 que ofereçam menos efeitos colaterais indesejados frente ao uso contínuo para o tratamento da DPOC. Uma possibilidade seria a obtenção de inibidores mais seletivos para as isoformas PDE4A e B e menos seletivos para a isoforma D.^{68,70-72}

Recentemente, Naganuma e colaboradores descreveram a síntese e a avaliação de derivados da 2-arilpirimidina que apresentaram perfil de seletividade aproximadamente 100 vezes maior para a isoforma B se comparada com a D (Figura 15, estrutura **36**).⁹⁷ Outros derivados da 2-arilpirimidina também foram avaliados por Goto e colaboradores. Estes pesquisadores sintetizaram um composto capaz de inibir a isoforma B com seletividade aproximadamente 430 vezes maior do que para a isoforma D (Figura 15, estrutura **37**).⁹⁸

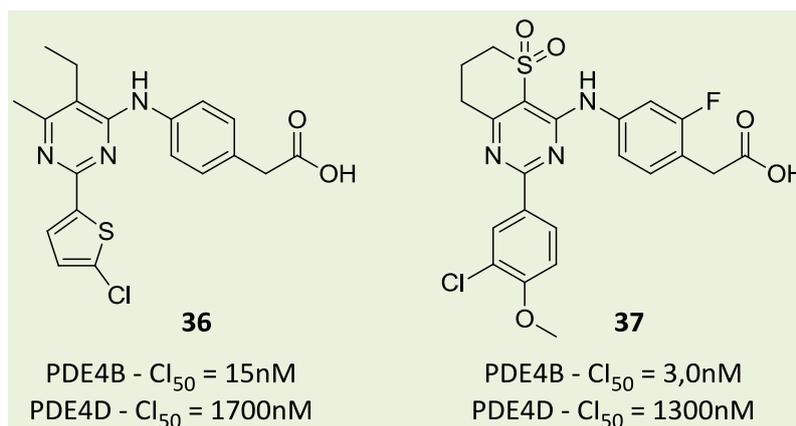


Figura 15. Inibidores seletivos da PDE4B

Outra abordagem seria aumentar a seletividade dos inibidores para o tecido alvo da DPOC, como pulmões e células do sistema imunológico. Savi e colaboradores desenvolveram uma série de inibidores de PDE4 que podem ser administrados por via inalatória. A estrutura **38** (Figura 16) representa a molécula com o melhor perfil de atividade anti-inflamatória quando administrada por inalação em cobaias.⁹⁹ Ting e colaboradores também desenvolveram inibidores de PDE4 inalatórios como exemplificado na Figura 16, estrutura **39**.¹⁰⁰

Kawasaki e colaboradores propuseram uma abordagem diferente das apresentadas anteriormente. Eles sintetizaram moléculas para serem administradas por via oral, mas que não fossem capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica e causar os efeitos colaterais indesejados no sistema nervoso central, por conta da sua hidrofobicidade. De fato, esta estratégia se mostrou correta e os efeitos eméticos desta classe de foram abolidos (Figura 16, estrutura **40**).¹⁰¹

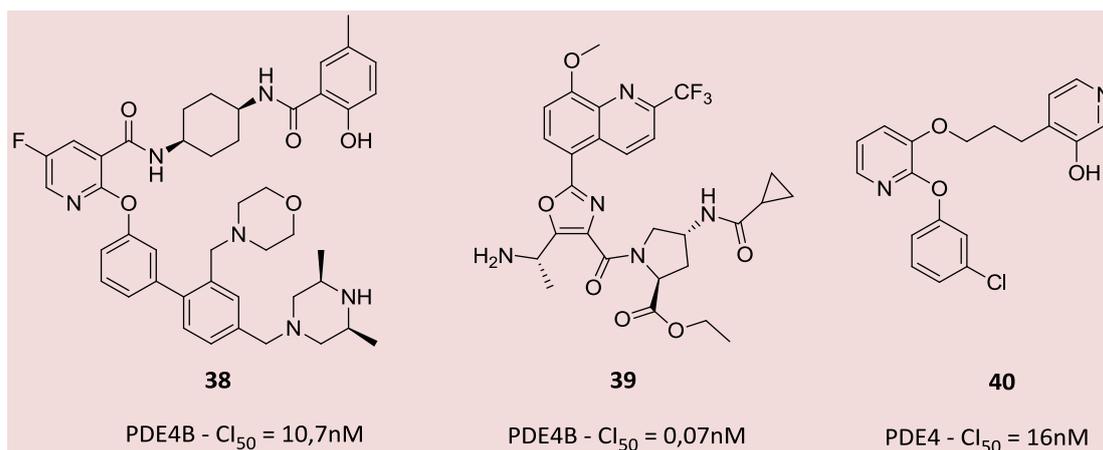


Figura 16. Inibidores da PDE4 seletivos frente ao tecido alvo

Embora a utilização dos inibidores de PDE4 possa provocar alguns efeitos colaterais, a grande eficácia desta classe de compostos em doenças inflamatórias, assim como a recente aprovação do roflumilaste (**12**) para uso em humanos, mostrou a

possibilidade de estudo destes inibidores frente a outras doenças.

Certamente esta aprovação foi uma surpresa para muitos pesquisadores, pois os inibidores da PDE4 chegaram a ser

considerados compostos sem possibilidade de aplicação terapêutica devido a seus efeitos colaterais, o que poderia ter levado a um declínio nas pesquisas sobre este alvo. No entanto, um levantamento recente feito na base de dados Scopus¹⁰² utilizando as

palavras chaves “PDE4”, “*phosphodiesterase 4*” e “*phosphodiesterase-4*”, mostrou como as pesquisas envolvendo a PDE4 vem crescendo ao longo do tempo, totalizando 2400 artigos, sendo 105 somente até o início do mês de julho do ano de 2014 (Gráfico 1).

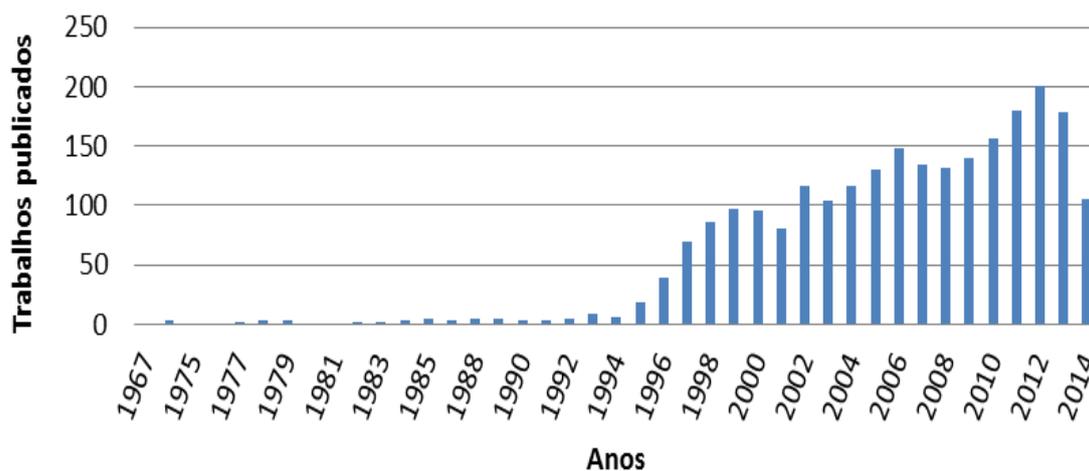


Gráfico 1. Levantamento da frequência de artigos publicados na literatura abordando a PDE4. Base Scopus (01/07/2014)

Apesar do ressurgimento da classe ter ocorrido pela grande eficácia no tratamento da DPOC, este crescimento tem sido impulsionado também pelas diversas novas aplicações que vêm sendo estudadas para estes iPDE4 com resultados bastante promissores, o que mostra um verdadeiro ressurgimento desta classe de compostos.

5. Novas Aplicações da Classe dos Inibidores da PDE4

Inibidores de PDE4 de 1ª e 2ª geração já estudados para o tratamento de doenças respiratórias como o rolipram (**11**), o roflumilaste (**12**) e o apremilaste estão em avaliação através de triagens clínicas para o tratamento de diversas outras doenças. O rolipram (**11**) está em fase I para o tratamento da depressão (NCT00369798). O roflumilaste (**12**) está em fase I para o

tratamento da esquizofrenia (NCT02079844) e da doença de Alzheimer (NCT02051335), em fase II para o tratamento de dermatite atópica (NCT01856764), demência (NCT01433666) e obesidade (NCT01862029) e em fase IV para o tratamento da sarcoidose (NCT01830959). O apremilaste (**20**) está em fase II para o tratamento da acne (NCT01074502), psoríase (NCT01130116), dermatite (NCT02087943) e artrite reumatoide (NCT01250548).

Pesquisas recentes com novos inibidores de PDE4 demonstraram que estes podem também ser explorados em diferentes abordagens terapêuticas como o câncer, doenças envolvendo o sistema nervoso central e correlacionadas com o sistema imunológico.^{103,104,107,109,113}

A inibição da PDE4 em tecidos tumorais é uma nova abordagem terapêutica para o tratamento do câncer, pois dados recentes revelam que estas enzimas estão

amplamente expressas em células oncogênicas.¹⁰³ Há relatos na literatura de inibidores de PDE4 com a capacidade de inibir o crescimento de células em tumores cerebrais, de reduzir a proliferação e a angiogênese de células de linhagens de câncer de pulmão e de levar células malignas à apoptose de forma seletiva, sem afetar as células normais.¹⁰³

Mareddy e colaboradores desenvolveram compostos triazólicos derivados da nimesulida com atividade inibitória sobre a

PDE4B e células de câncer de cólon da linhagem HCT-15. Um exemplo desta classe é o triazol **41** (Figura 17) que apresentou inibição de 64% da PDE4B na concentração de 30 μM .¹⁰³ Praveena e colaboradores também sintetizaram derivados inspirados na nimesulida que apresentaram atividade sobre a PDE4B e células de câncer de pulmão da linhagem A549. Um exemplo desta classe é o triazol **42** que apresentou 58% de inibição da PDE4B à 30 μM .¹⁰⁴

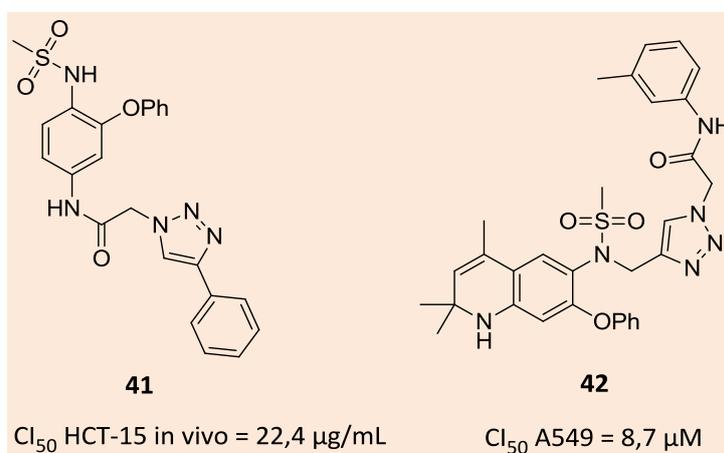


Figura 17. Inibidores da PDE4B avaliados para o tratamento do câncer

A PDE4 é amplamente expressa no sistema nervoso central,^{105,106} mas ainda não se sabe seu papel exato na maior parte das funções neurais. Estudos com o rolipram (**11**) demonstram que a PDE4 está associada com o processo de depressão e também possui papel importante em processos cognitivos.¹⁰⁷ Desta forma, o desenvolvimento de inibidores da PDE4 passou a ser considerado importante para obtenção de novos agentes terapêuticos para doenças que causam danos cognitivos como a Doença de Alzheimer e para outras doenças que afetam o sistema nervoso central, como a depressão e a esquizofrenia, por exemplo.^{108,109}

Zhang e colaboradores desenvolveram um composto denominado clorbipram (**43**) que apresentou atividade sobre as isoformas

PDE4B e PDE4D, sendo mais potente para esta última (Figura 18). Utilizando testes comportamentais sensíveis a antidepressivos, verificou-se que após administração única de clorbipram (0.075 – 0.6 mg/kg) um efeito antidepressivo foi observado em cobaia.¹⁰⁷

Uma abordagem terapêutica nova tem sido proposta nos últimos anos através da inibição da PDE4 para o tratamento da esquizofrenia.¹¹⁰ Os fármacos antipsicóticos, utilizados para o tratamento desta doença, atuam no antagonismo de receptores de dopamina D2, que por sua vez aumentam o nível de AMPc. Este fato é comum entre os antipsicóticos e os inibidores de PDE4, o que tornam estes últimos interessantes do ponto de vista terapêutico para a doença em questão.¹⁰⁹

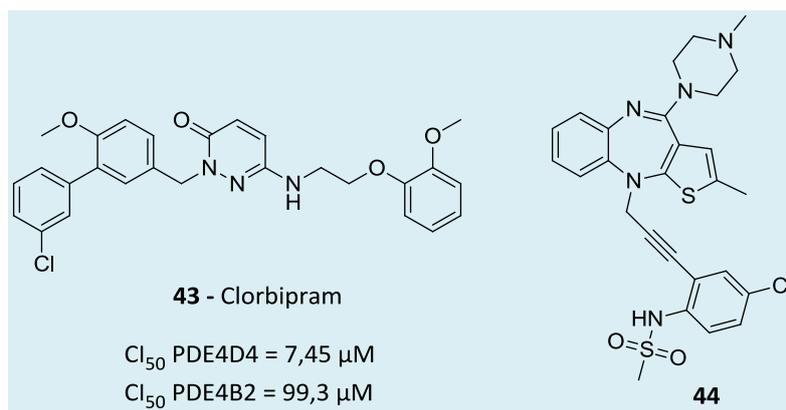


Figura 18. Inibidores da PDE4B avaliados para o tratamento de doenças do sistema nervoso central

Babu e colaboradores desenvolveram uma série de compostos derivados do antipsicótico olanzapina com atividade sobre a PDE4, planejados para o tratamento da esquizofrenia. Um exemplo da série está ilustrado na Figura 18 (estrutura **44**), com 63,11% de inibição sobre a PDE4B à 30 μ M. Cabe ressaltar que as avaliações com relação à atividade antipsicótica ainda não foram realizadas pelo grupo.¹⁰⁹

Devido às propriedades anti-inflamatórias dos inibidores de PDE4, já discutidas anteriormente, estes podem ser úteis para o tratamento de doenças que envolvem respostas do sistema imunológico como dermatite atópica, artrite reumatoide e psoríase.^{40,111,112} Um representante desta classe é o fármaco apremilaste (**20**) que, recentemente, foi aprovado pelo FDA para o tratamento da artrite psoriásica.¹¹³

Ishii e colaboradores relatam a avaliação do composto E6005 (Figura 19, estrutura **45**) para o tratamento da dermatite atópica. Este apresenta potente e seletiva inibição da atividade da PDE4 com Cl_{50} = 2,8 nM e suprime a produção de citocinas em linfócitos e monócitos com Cl_{50} de 0,49 à 3,1 nM. Em modelo de dermatite atópica realizado em camundongos, a aplicação tópica de E6005 produz um imediato efeito antipruriginoso, bem como um efeito anti-inflamatório.¹¹⁴

6. Conclusão

A classe dos inibidores da PDE4 surgiu de forma promissora no tratamento de doenças de cunho inflamatório. Entretanto, seus efeitos colaterais, principalmente os distúrbios gastrointestinais, quase levaram esta classe ao fracasso. A despeito destes efeitos colaterais ainda não serem totalmente compreendidos, a aprovação de dois medicamentos para uso em humanos, ie. roflumilaste (**12**) e apremilaste (**20**), mostrou o quanto as atividades farmacológicas desta classe de medicamentos são úteis no tratamento de desordens inflamatórias e auto-imunes. Com esta aprovação para uso em humanos, esta classe de inibidores ganhou novo fôlego e seu uso em diversas outras patologias como doenças do sistema nervoso central e câncer vêm sendo investigado com bons resultados. Este ressurgimento como agente anti-inflamatório, somado a suas novas aplicações terapêutica, indica que esta classe terapêutica ainda é um bom campo para pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPERJ, CAPES e CNPq pelas bolsas e apoio financeiro às pesquisas.

Referências Bibliográficas

¹ Butcher, R. W.; Sutherland, E. W. Adenosine 3',5'-phosphate in biológicas materials. *The Journal of Biological Chemistry* **1962**, *237*, 1244. [PubMed]

² Beavo, J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiological Reviews* **1995**, *75*, 725. [PubMed]

³ Sutherland, E. W.; Rall, T. W. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *The Journal of Biological Chemistry* **1958**, *232*, 1077. [PubMed]

⁴ Keravis, T.; Lugnier, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *British Journal of Pharmacology* **2012**, *165*, 1288. [CrossRef] [PubMed]

⁵ Bender, A. T.; Beavo, J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Regulation to Clinical Use. *Pharmacological Reviews* **2006**, *58*, 488. [CrossRef] [PubMed]

⁶ Lugnier, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agentes. *Pharmacology & Therapeutics* **2006**, *109*, 366. [CrossRef] [PubMed]

⁷ Thompson, W. J.; Appleman, M. M. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **1971**, *246*, 3145. [PubMed]

⁸ Thompson, W. J. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: pharmacology, biochemistry and function. *Pharmacology & Therapeutics* **1991**, *51*, 13. [CrossRef]

⁹ Bolger, G. B. Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes. *Cell Signal* **1994**, *6*, 851. [CrossRef]

¹⁰ Conti, M.; Beavo, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annual Review of Biochemistry* **2007**, *76*, 481. [CrossRef] [PubMed]

¹¹ Halpin, D. M. G. ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in DPOC. *International Journal of DPOC* **2008**, *3*, 543. [PubMed]

¹² Lenhard, J. M.; Kassel, D. B.; Rocque, W. J.; Hamacher, L.; Holmes, W. D.; Patel, I.; Hoffman, C.; Luther, M. Phosphorylation of a cAMP-specific phosphodiesterase (HSPDE4B2B) by mitogen-activated protein kinase. *The Biochemical Journal* **1996**, *316*, 751. [PubMed]

¹³ Xu, R. X.; Hassell, A. M.; Vanderwall, D.; Lambert, M. H.; Holmes, W. D.; Luther, M. A.; Rocque, W. J.; Milburn, M. V.; Zhao, Y.; Ke, H.; Nolte, R. T. Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism a specificity. *Science* **2000**, *288*, 1822. [CrossRef] [PubMed]

¹⁴ Tenor, H.; Staniciu, L.; Schudt, C.; Hatzelmann, A.; Wendel, A.; Djukanovic, R.; Church, M. K.; Shute, J. K. Cyclic nucleotide phosphodiesterases from purified human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Clinical & Experimental Allergy* **1995**, *25*, 616. [CrossRef]

¹⁵ Giembycz, M. A.; Corrigan, C. J.; Seybold, J.; Newton, R.; Barnes, P. J. Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4+ and CD8+ T-lymphocytes: role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2. *British Journal of Pharmacology* **1996**, *118*, 1945. [PubMed]

¹⁶ Nielson, C. P.; Vestal, R. E.; Sturm, R. J. Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **1990**, *86*, 801. [CrossRef]

¹⁷ Seldon, P. M.; Barnes, P. J.; Meja, K.; Giembycz, M. A. Suppression of

- lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α generation from human peripheral blood monocytes by inhibitors of phosphodiesterase 4: interaction with stimulants of adenylyl cyclase. *Molecular Pharmacology* **1995**, *48*, 747. [PubMed]
- ¹⁸ Dent, G.; Giembycz, M. A.; Evans, P. M.; Rabe, K. F.; Barnes, P. J. Suppression of human eosinophil respiratory burst and cyclic AMP hydrolysis by inhibitors of type IV phosphodiesterase: interaction with the beta adrenoceptor agonist albuterol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1994**, *271*, 1167. [PubMed]
- ¹⁹ Peachell, P. T.; Udem, B. J.; Schleimer, R. P.; Macglashan, D. W.; Lichtenstein, L. M.; Cieslinski, L. B.; Torphy, T. J. Preliminary identification and role of phosphodiesterase isozymes in human basophils. *The Journal of Immunology* **1992**, *148*, 2503. [PubMed]
- ²⁰ Houslay, M. D.; Schafer, P.; Zhang, K. Y. J. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1503. [CrossRef]
- ²¹ Bolger, G. B. Em *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*; Beavo, J. A.; Francis, S. H.; Houslay, M. D. CRC Press: Boca Raton 2006, cap. 2. [CrossRef]
- ²² Houslay, M. D.; Adams, D. R. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *The Biochemical Journal* **2003**, *370*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Shakur, Y.; Pryde, J. G.; Houslay, M. D. Engineered deletion of the unique N-terminal domain of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase RD1 prevents plasma membrane association and the attainment of enhanced thermostability without altering its sensitivity to inhibition by rolipram. *The Biochemical Journal* **1993**, *292*, 677. [PubMed]
- ²⁴ Srivani, P.; Usharani, D.; Jemmis, E. D.; Sastry, G. N. Subtype Selectivity in Phosphodiesterase 4 (PDE4): A Bottleneck in Rational Drug Design. *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14*, 3854. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Spina, D. PDE4 inhibitors: current status. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *155*, 308. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Ke, H. Implications of PDE4 structure on inhibitor selectivity across PDE families. *International Journal of Impotence Research* **2004**, *16*, S24. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ Card, G. L.; England, B. P.; Suzuki, Y.; Fong, D.; Powell, B.; Lee, B.; Luu, C.; Tabrizizad, M.; Gillette, S.; Ibrahim, P. N.; Artis, D. R.; Bollag, G.; Milburn, M. V.; Kim, S. H.; Schlessinger, J.; Zhang, K. Y. Structural Basis for the Activity of Drugs that Inhibit Phosphodiesterases. *Structure* **2004**, *12*, 2233. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Wang, H.; Peng, M. S.; Chen, Y.; Geng, J.; Robinson, H.; Houslay, M. D.; Cai, J.; Ke, H. Structures of the four subfamilies of phosphodiesterase-4 provide insight into the selectivity of their inhibitors. *The Biochemical Journal* **2007**, *408*, 193. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁹ Huai, Q.; Wang, H.; Sun, Y.; Kim, H. Y.; Liu, Y.; Ke, H. Three-dimensional structures of PDE4D in complex with roliprams and implication on inhibitor selectivity. *Structure* **2003**, *11*, 865. [CrossRef]
- ³⁰ Swinnen, J. V.; Joseph, D. R.; Conti, M. The mRNM encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by hormones and cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, 8197. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Swinnen, J. V.; Tsikalas, K. E.; Conti, M. Properties and hormonal regulation of two structurally related cAMP phosphodiesterases from the rat Sertoli cell. *The Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 18370. [PubMed]
- ³² Sette, C.; Vicini, E.; Conti, M. The rat PDE3/IVd phosphodiesterase gene codes for multiple proteins differentially activated by cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 18271. [PubMed]
- ³³ Hatzelmann, A.; Morcillo, E. J.; Lungarella, G.; Adnot, S.; Sanjar, S.; Beume, R.; Schudt, C.; Tenor, H. The preclinical pharmacology of roflumilast: a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive

- pulmonary disease. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **2010**, *23*, 235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Weinberger, M.; Hendeles, L. Theophylline in asthma. *The New England Journal of Medicine* **1996**, *334*, 1380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ Diamant, Z.; Spina, D. PDE4-inhibitors: A novel, targeted therapy for obstructive airways disease. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **2011**, *24*, 353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ Banner, K. H.; Page, C. P. Theophylline and selective phosphodiesterase inhibitors as anti-inflammatory drugs in the treatment of bronchial asthma. *The European Respiratory Journal* **1995**, *8*, 996. [[PubMed](#)]
- ³⁷ Barnes, P. J. Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: new horizons. *Proceedings of the American Thoracic Society* **2005**, *2*, 334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Schwabe, U.; Miyake, M.; Ohgam Y.; Daly, J. W. 4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711): a potent inhibitor of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterases in homogenates and tissue slices from rat brain. *Molecular Pharmacology* **1976**, *12*, 900. [[PubMed](#)]
- ³⁹ Kümmerle, A. E.; Schmitt, M.; Cardozo, S. V. S.; Lugnier, C.; Villa, P.; Lopes, A. B.; Romeiro, N. C.; Justiniano, H.; Martins, M. A.; Fraga, C. A. M.; Bourguignon, J.; Barreiro, E. J. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of N-Acylhydrazones and Novel Conformationally Constrained Compounds as Selective and Potent Orally Active Phosphodiesterase-4 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 7525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Maurice, D. H.; Ke, H.; Ahmad, F.; Wang, Y.; Chung, J.; Manganiello, V. C. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nature Reviews* **2014**, *13*, 290. [[CrossRef](#)]
- ⁴¹ Wachtel, H. Characteristic behavioural alterations in rats induced by rolipram and other selective adenosine cyclic 3,5-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Psychopharmacology* **1982**, *77*, 309. [[CrossRef](#)]
- ⁴² Lugnier, C.; Stierle, A.; Beretz, A.; Schoeffter, P.; Le Bec, A.; Wermuth, C. G.; Cazenave, J. P.; Stoclet, J. C. Tissue and substrate specificity of inhibition by alkoxy-aryl-lactams of platelet and arterial smooth muscle cyclic nucleotide phosphodiesterases relationship to pharmacological activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1983**, *113*, 954. [[CrossRef](#)]
- ⁴³ Komasa, N.; Lugnier, C.; Le Bec, A.; Serradeil-Le Gal, C.; Barthelemy, G.; Stoclet, J. C. Differential sensitivity to cardiotonic drugs of cyclic AMP phosphodiesterases isolated from canine ventricular and sinoatrial-enriched tissues. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **1989**, *14*, 213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Sanz, M. J.; Cortijo, J.; Morcillo, E. J. PDE4 inhibitors as new antiinflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacology & Therapeutics* **2005**, *106*, 269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Mokry, J.; Mokra, D. Immunological aspects of phosphodiesterase inhibition in the respiratory system. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **2013**, *187*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Hatzelmann, A.; Schudt, C. Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, *297*, 267. [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Claveau, D.; Chen, S. L.; O'keefe, S.; Zaller, D. M.; Styhler, A.; Liu, S.; Huang, Z.; Nicholson, D. W.; Mancini, J. A. Preferential inhibition of T helper 1, but not T helper 2, cytokines in vitro by L-826,141 [4-[2-(3,4-Bisdifluoromethoxyphenyl)-2-[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxy-propan-2-yl) phenyl]-ethyl]3-methylpyridine-1-oxide], a potent and selective phosphodiesterase 4 inhibitor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, *310*, 752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Bethke, T. D.; Bohmer, G. M.; Hermann, R.; Hauns, B.; Fux, R.; Morike, K. Doseproportional intraindividual single- and repeated-dose pharmacokinetics of roflumilast, an oral, once-daily

- phosphodiesterase 4 inhibitor. *The Journal of Clinical Pharmacology* **2007**, *47*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Torphy, T. J.; Barnette, M. S.; Underwood, D. C.; Griswold, D. E.; Christensen, S. B.; Murdoch, R. D.; Nieman, R. B.; Compton, C. H. Ariflo® (SB 207499), a Second Generation Phosphodiesterase 4 Inhibitor for the Treatment of Asthma and DPOC: from Concept to Clinic. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **1999**, *12*, 131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Giembycz, M. A. Cilomilast: a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2001**, *10*, 1361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Houslay, M. D. PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **2001**, *69*, 249. [[CrossRef](#)]
- ⁵² Kojima, A.; Takita, S.; Sumiya, T.; Ochiai, K.; Iwase, K.; Kishi, T.; Ohinata, A.; Yageta, Y.; Yasue, T.; Kohno, Y. Phosphodiesterase inhibitors. Part 6: Design, synthesis, and structure–activity relationships of PDE4-inhibitory pyrazolo[1,5-a]pyridines with anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 5311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Kuang, R.; Shue, H.; Xiao, L.; Blythin, D. J.; Shih, N.; Chen, X.; Gu, D.; Lin, J. S. L.; Ting, P. C.; Cao, J.; Aslanian, R.; Piwinski, J. J.; Prelusky, D.; Wu, P.; Zhang, J.; Zhang, X.; Celly, C. S.; Billah, M.; Wang, P. Discovery of oxazole-based PDE4 inhibitors with picomolar potency. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 2594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Kumar, K. S.; Kumar, S. K.; Sreenivas, B. Y.; Gorja, D. R.; Kapavarapu, R.; Rambabu, D.; Krishna, G. R.; Reddy, C. M.; Rao, M. V. B.; Parsa, K. V. L.; Pal, M. C–C bond formation at C-2 of a quinoline ring: Synthesis of 2-(1H-indol-3-yl)quinoline-3-carbonitrile derivatives as a new class of PDE4 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 2199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁵ Zhang, Y.; Plattner, J. J.; Akama, T.; Baker, S. J.; Hernandez, V. S.; Sanders, V.; Freund, Y.; Kimura, R.; Bu, W.; Hold, K. M.; Lu, X. Design and synthesis of boron-containing PDE4 inhibitors using soft-drug strategy for potential dermatologic anti-inflammatory application. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 2270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Woodrow, M. D.; Ballantine, S. P.; Barker, M. D.; Clarke, B. J.; Dawson, J.; Dean, T. W.; Delves, C. J.; Evans, B.; Gough, S. L.; Guntrip, S. B.; Holman, S.; Holmes, D. S.; Kranz, M.; Lindvaal, M. K.; Lucas, F. S.; Neu, M.; Ranshaw, L. E.; Solanke, Y. E.; Somers, D. O.; Ward, P.; Wiseman, J. O. Quinolines as a novel structural class of potent and selective PDE4 inhibitors. Optimisation for inhaled administration. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 5261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Freund, Y. R.; Akama, T.; Alley, M. R.; Antunes, J.; Dong, C.; Jarnagin, K.; Kimura, R.; Nieman, J. A.; Maples, K. R.; Plattner, J. J.; Rock, F.; Sharma, R.; Singh, R.; Sanders, V.; Zhou, Y. Boron-based phosphodiesterase inhibitors show novel binding of boron to PDE4 bimetal center. *FEBS Letters* **2012**, *586*, 3410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Fox 3rd, D.; Burgin, A. B.; Gurney, M. E. Structural basis for the design of selective phosphodiesterase 4B inhibitors. *Cellular Signalling* **2014**, *26*, 657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Barreiro, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a Descoberta de novo agente cardioativo. *Química Nova* **2002**, *25*, 1172. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁰ Sudo, R. T.; Zapata-Sudo, G.; Barreiro, E. J. LASSBio 294, a novel cardionotropic agent, increases the calcium content in the sarcoplasmic reticulum of saponin-skinned cardiac fibres. *British Journal of Pharmacology* **2001**, *134*, 603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶¹ Silva, C. L. M.; Noel, F.; Barreiro, E. J. Vasodilatory properties of LASSBio 294 and its dependence on cGMP increase. *British Journal of Pharmacology* **2002**, *135*, 293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶² Lima, L. M.; Barreiro, E. J. Bioisosterism, an useful strategy for molecular modification

and drug design. *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 23. [CrossRef] [PubMed]

⁶³ Kümmerle, A. E.; Raimundo, J. M.; Leal, C. M.; Da Silva, G. S.; Balliano, T. L.; Pereira, M. A.; De Simone, C. A.; Sudo, R. T.; Zapata-Sudo, G.; Fraga, C. A.; Barreiro, E. J. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene N -acylhydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44*, 4004. [CrossRef] [PubMed]

⁶⁴ Barreiro, E. J.; Kümmerle, A. E.; Fraga, C. A. M. The methylation effect in medicinal chemistry. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 5215. [CrossRef] [PubMed]

⁶⁵ Calverley, P. M.; Sanchez-Toril, F.; Mcivor, A.; Teichmann, P.; Bredenbroeker, D.; Fabbri, L. M. Effect of 1-year treatment with roflumilast in severe chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2007**, *176*, 154. [CrossRef] [PubMed]

⁶⁶ Rabe, K. F.; Bateman, E. D.; O'donnell, D.; Witte, S.; Bredenbroeker, D.; Bethke, T. D. Roflumilast—an oral anti-inflammatory treatment for chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* **2005**, *366*, 563. [CrossRef]

⁶⁷ Rennard, S. I.; Schachter, N.; Strek, M.; Rickard, K.; Amit, O. Cilomilast for DPOC: results of a 6-month, placebo-controlled study of a potent, selective inhibitor of phosphodiesterase 4. *Chest* **2006**, *129*, 56. [CrossRef] [PubMed]

⁶⁸ Robichaud, A.; Stamatiou, P. B.; Jin, C.; Lachance, N.; Macdonald, D.; Laliberté, F.; Liu, S.; Huang, Z.; Conti, M.; Chan, C. C. Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens alpha2-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioural correlate of emesis. *The Journal of Clinical Investigation* **2002**, *110*, 1045. [CrossRef]

⁶⁹ Dal-Piaz, V.; Giovannoni, M. P. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *35*, 463. [CrossRef]

⁷⁰ Giembycz, M. A. 4D or not 4D: the emetogenic basis of PDE4 inhibitors

uncovered? *Trends in Pharmacological Sciences* **2002**, *23*, 548. [CrossRef]

⁷¹ O'byrne, P. M.; Gauvreau, G. Phosphodiesterase-4 inhibition in DPOC. *Lancet* **2009**, *374*, 665. [CrossRef]

⁷² Houslay, M. D.; Adams, D. R. Putting the lid on phosphodiesterase 4. *Nature Biotechnology* **2010**, *28*, 38. [CrossRef] [PubMed]

⁷³ Giembycz, M. A.; Field, S. K. Roflumilast: The first in class phosphodiesterase 4 inhibitor approved for the treatment of DPOC. *Journal of Drug Design, Development and Therapy* **2010**, *4*, 147. [Link]

⁷⁴ Dourado, V. Z.; Tanni, S. E.; Vale, S. A.; Faganello, M. M.; Sanchez, F. F.; Godoy, I. J. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* **2006**, *32*, 161. [CrossRef] [PubMed]

⁷⁵ Buist, A. S.; Mccburnie, M. A.; Vollmer, W. M.; Gillespie, S.; Burney, P.; Mannino, D. M.; Menezes, A. M. B.; Sullivan, S. D.; Lee, T. A.; Weiss, K. B.; Jensen, R. L.; Marks, G. B.; Gulsvik, A.; Nizankowska-Mogilnicka, E. International variation in the prevalence of DPOC (The BOLD study): a population-based prevalence study. *Lancet* **2007**, *370*, 741. [CrossRef]

⁷⁶ The Top 10 Causes of Death; Fact Sheet no. 310; World Health Organization: Geneva, May 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 01 julho 2014. [Link]

⁷⁷ Mathers, C. D.; Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine* **2006**, *3*, 2011. [PubMed]

⁷⁸ Sinden, N. J.; Stockley, R. A. Systemic inflammation and comorbidity in DPOC: a result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax* **2010**, *65*, 930. [CrossRef] [PubMed]

⁷⁹ Rodriguez-Roisin, R.; Anzeuto, A.; Bourbeau, J.; Calverley, P. S.; De Guia, T.; Fukuchi, Y. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Disponível em:

<<http://www.goldcopd.org/uploads/users/fil>

- [es/GOLD_Report_2013_Feb20.pdf](#)>. Acesso em: 01 julho 2014. [Link]
- ⁸⁰ Liu, A.; Huang, L.; Wang, Z.; Luo, Z.; Mao, F.; Shan, W.; Xie, J.; Lai, K.; Li, X. Hybrids consisting of the pharmacophores of salmeterol and roflumilast or phthalazinone: dual β_2 -adrenoceptor agonists-PDE4 inhibitors for the treatment of DPOC. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 1548. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸¹ Sullivan, P.; Bekir, S.; Jaffar, Z.; Page, C.; Jeffery, P.; Costello, J. Antiinflammatory effects of low-dose oral theophylline in atopic asthma. *Lancet* **1994**, *343*, 1006. [CrossRef]
- ⁸² Lim, S.; Jatakanon, A.; Gordon, D.; Macdonald, C.; Chung, K. F.; Barnes, P. J. Comparison of high dose inhaled steroids, low dose inhaled steroids plus low dose theophylline, and low dose inhaled steroids alone in chronic asthma in general practice. *Thorax* **2000**, *55*, 837. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸³ Rennard, S. I. Treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* **2004**, *364*, 791. [CrossRef]
- ⁸⁴ ⁸⁴ Waldeck, B. Beta-adrenoceptor agonists and asthma: 100 years of development. *European Journal of Pharmacology* **2002**, *445*, 1. [CrossRef]
- ⁸⁵ Giembycz, M. A.; Newton, R. Beyond the dogma: novel beta2-adrenoceptor signalling in the airways. *European Respiratory Journal* **2006**, *27*, 1286. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸⁶ Hughes, A. D.; Chin, K. H.; Dunham, S. L.; Jasper, J. R.; King, K. E.; Lee, T. W.; Mammen, M.; Martin, J.; Steinfeld, T. Discovery of muscarinic acetylcholine receptor antagonist and beta 2 adrenoceptor agonist (MABA) dual pharmacology molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 1354. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸⁷ Barnes, P.J. The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease. *The American Journal of Medicine* **2004**, *20*, 24. [PubMed]
- ⁸⁸ Moulton, B. C.; Fryer, A. D. Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and DPOC. *British Journal of Pharmacology* **2011**, *163*, 44. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸⁹ Ngkelo, A.; Adcock, I. M. New treatments for DPOC. *Current Opinion in Pharmacology* **2013**, *13*, 362. [CrossRef]
- ⁹⁰ Barnes, P.J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2010**, *120*, 76. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹¹ Barnes, P. J. Development of new drugs for DPOC. *Current Medicinal Chemistry* **2013**, *20*, 1531. [CrossRef]
- ⁹² Singh, S.; Loke, Y. K. An overview of the benefits and drawbacks of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **2010**, *5*, 189. [CrossRef]
- ⁹³ Celli, B.; Vestbo, J.; Jenkins, C. R.; Jones, P. W.; Ferguson, G. T.; Calverley, P. M.; Yates, J. C.; Anderson, J. A.; Willits, L. R.; Wise, R. A. Sex differences in mortality and clinical expressions of patients with chronic obstructive pulmonary disease. The TORCH experience. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2011**, *183*, 317. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹⁴ Cazzola, M.; Molimard, M. The scientific rationale for combining long-acting beta2-agonists and muscarinic antagonists in DPOC. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **2010**, *23*, 257. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹⁵ Vignola, A. M. PDE4 inhibitors in DPOC: a more selective approach to treatment. *Respiratory Medicine* **2004**, *98*, 495. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹⁶ Schalkwyk, E. V.; Strydom, K.; Williams, Z.; Venter, L.; Leichtl, S.; Wirlitsch, C. S.; Bredenbröcker, D.; Bardin, P. G. Roflumilast, an oral, once-daily phosphodiesterase 4 inhibitor, attenuates allergen-induced asthmatic reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2005**, *116*, 292. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹⁷ Naganuma K.; Omura, A.; Maekawara, N.; Saitoh, M.; Ohkawa, N.; Kubota, T.; Nagumo, H.; Kodama, T.; Takemura, M.; Ohtsuka, Y.; Nakamura, J.; Tsujita, R.; Kawasaki, K.; Yokoi, H.; Kawanishi, M. Discovery of selective PDE4B inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 3174. [CrossRef] [PubMed]

- ⁹⁸ Goto, T.; Shiina, A.; Murata, T.; Tomii, M.; Yamazaki, T.; Yoshida, K.; Yoshino, T.; Suzuki, O.; Sogawa, Y.; Mizukami, K.; Takagi, N.; Yoshitomi, T.; Etori, M.; Tsuchida, H.; Mikkaichi, T.; Nakao, N.; Takahashi, M.; Takahashi, H.; Sasaki, S. Identification of the 5,5-dioxo-7,8-dihydro-6H-thiopyrano[3,2-d] pyrimidine derivatives as highly selective PDE4B inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 893. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹⁹ Savi, C.; Cox, R. J.; Warner, D. J.; Cook, A. R.; Dickinson, M. R.; McDonough, A.; Morrill, L. C.; Parker, B.; Andrews, G.; Young, S. S.; Gilmour, P. S.; Riley, R.; Dearman, M. S. Efficacious Inhaled PDE4 Inhibitors with Low Emetic Potential and Long Duration of Action for the Treatment of DPOC. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 4661. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰⁰ Ting, P. C.; Lee, J. F.; Kuang, R.; Cao, J.; Gu, D.; Huang, Y.; Liu, Z.; Aslanian, R. G.; Feng, K.; Prelusky, D.; Lamca, J.; House, A.; Phillips, J. E.; Wang, P.; Wud, P.; Lundell, D.; Chapman, R. W.; Celly, C. S. Discovery of oral and inhaled PDE4 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 5528. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰¹ Kawasaki, M.; Fusano, A.; Nigo, T.; Nakamura, S.; Ito, M. N.; Teranishi, Y.; Matsumoto, S.; Toda, H.; Nomura, N.; Sumiyoshi, T. Identification of 2,3-disubstituted pyridines as potent, non-emetic PDE4 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 2689. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰² SCOPUS. Disponível em: <<http://www.scopus.com>>. Acesso em: 01 julho 2014.
- ¹⁰³ Mareddy, J.; Nallapati, S. B.; Anireddy, J.; Devi, Y. P.; Mangamoori, L. N.; Kapavarapu, R.; Pal, S. Synthesis and biological evaluation of nimesulide based new class of triazole derivatives as potential PDE4B inhibitors against cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 6721. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰⁴ Praveena, K. S. S.; Durgadas, S.; Babu, N. S.; Akkenapally, S.; Kumar, C. G.; Deora, G. S.; Murthy, N. Y. S.; Mukkanti, K.; Pal, S. Synthesis of 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoliny substituted 1,2,3-triazole derivatives: Their evaluation as potential PDE 4B inhibitors possessing cytotoxic properties against cancer cells. *Bioorganic Chemistry* **2014**, *53*, 8. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰⁵ Fujita, M.; Imaizumi, M.; D'sa, C.; Zoghbi, S. S.; Crescenzo, M. S.; Hong, J.; Musachio, J. L.; Gee, A. D.; Seidel, J.; Green, M. V.; Pike, V. W.; Duman, R. S.; Innis, R. B. In vivo and in vitro measurement of brain phosphodiesterase 4 in rats after antidepressant administration. *Synapse* **2007**, *61*, 78. [PubMed]
- ¹⁰⁶ Mcphee, I.; Cochran, S.; Houslay, M. D. The novel long PDE4A10 cyclic AMP phosphodiesterase shows a pattern of expression within brain that is distinct from the long PDE4A5 and short PDE4A1 isoforms. *Cellular Signalling* **2001**, *13*, 911. [CrossRef]
- ¹⁰⁷ Zhang, M.; Zhou, Z.; Yuan, X.; Cheng, Y.; Bi, B.; Gong, M.; Chen, Y.; Xu, J. Chlorbipram: A novel PDE4 inhibitor with improved safety as a potential antidepressant and cognitive enhancer. *European Journal of Pharmacology* **2013**, *721*, 56. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰⁸ García-Osta, A.; Cuadrado-Tejedor, M.; García-Barroso, C.; Oyarzábal, J.; Franco, R. Phosphodiesterases as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience* **2012**, *3*, 832. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰⁹ Babu, P. V.; Gorja, D. R.; Meda, C. L. T.; Deora, G. S.; Kolli, S. K.; Parsa, K. V. L.; Mukkanti, K.; Pal, M. Synthesis of N-(3-arylprop-2-ynyl)substituted olanzapine derivatives as potential inhibitors of PDE4B. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55*, 3176. [CrossRef]
- ¹¹⁰ Siuciak, J. A. The role of phosphodiesterases in schizophrenia: therapeutic implications. *CNS Drugs* **2008**, *22*, 983. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹¹ Wittmann, M.; Helliwell, P. S. Phosphodiesterase 4 inhibition in the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Dermatology and Therapy* **2013**, *3*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹² Keravis, T.; Monneaux, F.; Yougbare, I.; Gazi, L.; Bourguignon, J. J.; Muller, S.; Lugnier, C. Disease progression in MRL/lpr lupus-

prone mice is reduced by NCS 613, a specific cyclic nucleotide phosphodiesterase type 4 (PDE4) inhibitor. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

¹¹³ Ishii, N.; Shirato, M.; Wakita, H.; Miyazaki, K.; Takase, Y.; Asano, O.; Kusano, K.; Yamamoto, E.; Inoue, C.; Hishinuma, I.

Antipruritic Effect of the Topical Phosphodiesterase 4 Inhibitor E6005 Ameliorates Skin Lesions in a Mouse Atopic Dermatitis Models. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2013**, *346*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]