



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto do Coração Edson Saad
Laboratório de Farmacologia Cardiovascular



**NOVO INIBIDOR DE MAPK P38 α REDUZ
DISFUNÇÃO VENTRICULAR INDUZIDA PELA
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM RATOS**

GRAZIELLE FERNANDES DA SILVA

Orientadora: Gisele Zapata-Sudo
Co-orientador: Roberto Takashi Sudo

(Setembro de 2018)

SUMÁRIO

	4
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Planejamento e desenvolvimento de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos	4
1.2 Hipertensão Pulmonar	7
1.2.2 Modelo de HAP induzida por Monocrotalina	9
1.2.3. Modelo de HAP induzido por <i>Sugen 5416</i> /hipóxia	10
1.3 Justificativa	13
2.OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos Gerais	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Substâncias Utilizadas	16
3.2 Avaliação Farmacológica Dos Derivados <i>N</i> -Acilidrazônicos Em Preparações De Músculo Liso Arterial	16
3.2.1 Registro de tensão isométrica em artéria pulmonar isolada de rato	16
3.3 MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA	18
3.4 MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR HIPÓXIA <i>SUGEN-5416</i>	19
3.4.1 Teste de esforço	20
3.4.2 Ecocardiografia transtorácica	21
3.4.3 Medida da pressão sistólica do ventrículo direito	21
3.4.4 Análise histopatológica do pulmão	22

3.4.5 Imunohistoquímica	22
3.4.6 Western Blot	22
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4. RESULTADOS PRELIMINARES	24
REFERÊNCIAS	27
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	31

1. INTRODUÇÃO

1.1. Planejamento e desenvolvimento de derivados *N*-acilidrazônicos

Há alguns anos, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LASSBio-UFRJ) apresenta como principal meta o planejamento, a síntese e a avaliação das propriedades farmacológicas de novos derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) bioativos (BARREIRO, 2002). Foram identificados inúmeros compostos com promissoras propriedades antiinflamatória, antitrombótica e analgésica (LIMA et al., 2000). O emprego da estratégia de simplificação molecular (figura 1) sobre derivados diidro(2*H*)piridazinônicos (importantes inibidores de fosfodiesterases), representado pela simples ruptura da ligação **a**, permitiu ser identificada a função NAH, anteriormente mascarada nos derivados diidro(2*H*)piridazinônicos.

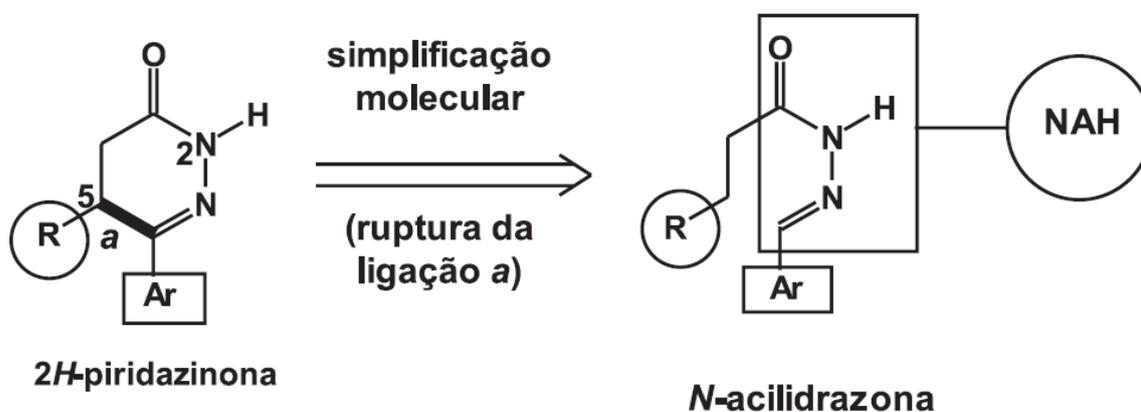


Figura 1: Esquema representativo da estratégia de simplificação molecular utilizada para romper a ligação **a** dos derivados 2*H*-piridazinônicos obtendo-se como produto um derivado que apresentou a função NAH, antes mascarada. Adaptado de BARREIRO (2002).

A aplicação desta técnica de simplificação molecular sobre os inibidores de fosfodiesterases (PDE), que possuem importante propriedade inotrópica positiva, permitiu o reconhecimento da similaridade molecular existente entre estes e os derivados *N*-acilidrazônicos, o que estimulou o grupo do LASSBio a planejar novos derivados NAH (**1**) (figura 2) (BARREIRO, et al., 2002).

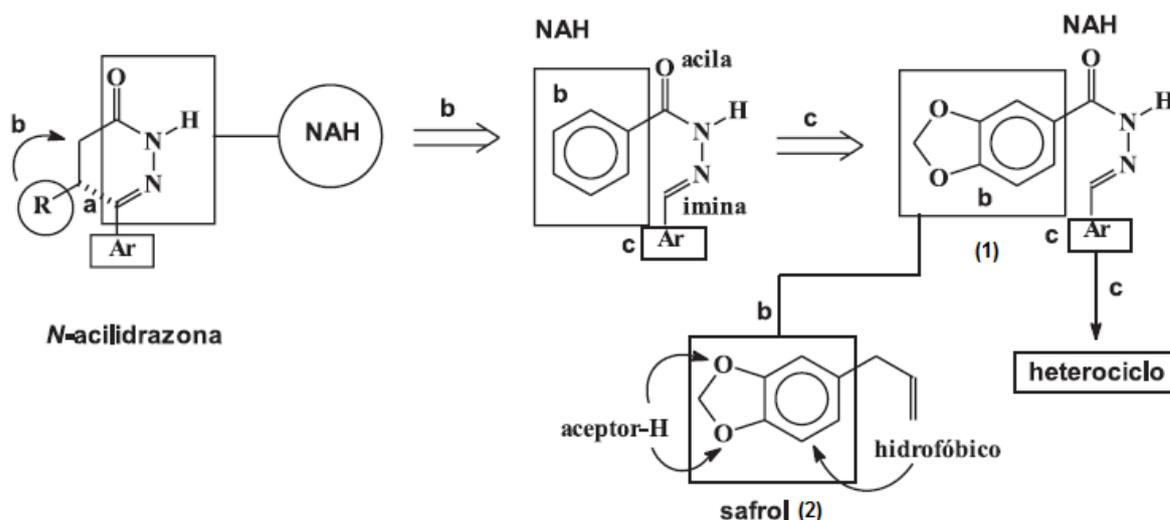


Figura 2: Esquema representativo da síntese de novos derivados *N*-acilidrazônicos pelo LASSBio-UFRJ. Adaptado de BARREIRO (2002).

A gênese da nova série de derivados NAH (**1**) fundamentou-se na inclusão de uma unidade aromática *b* na função acila, eliminando-se o carbono estereogênico C-5, presente em derivados (2*H*)-piridazinônicos ativos (figura 2).

A natureza da subunidade estrutural *b* inserida nos novos derivados NAH (**1**) inspirou-se na molécula do safrol (**2**), um produto natural brasileiro obtido do óleo de sassafrás (*Ocotea pretiosa*) e amplamente estudado no LASSBio como matéria-prima para a síntese de compostos bioativos (BARREIRO, 2002).

Uma vez sintetizados, os novos derivados NAH foram testados em ensaios farmacológicos para avaliação do efeito cardiotônico. Dentre os novos compostos sintetizados foi identificado a substância LASSBio-1824 (figura 3) como um novo inibidor de MAPK p38 α , e assim um promissor protótipo anti-inflamatório. (ROSANA, 2017).

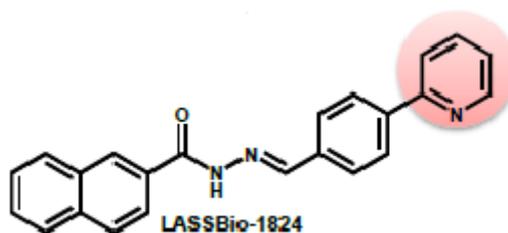


Figura 3: Estrutura química do novo derivado NAH LASSBio-1824.

A avaliação do mecanismo de ação para este composto mostrou que, além de uma ação anti-proliferativa, LASSBio-1824 reduziu a produção de TNF- α in vivo. (ROSANA, 2017).

1.2 Hipertensão Pulmonar

A HP é uma doença das artérias pulmonares caracterizada por proliferação vascular e remodelamento da paredes desses vasos, resultando em um aumento progressivo da resistência vascular pulmonar e consequentemente na falência do ventrículo direito (VD) e morte. A HP é definida hemodinamicamente por uma pressão arterial pulmonar média > 25 mmHg em repouso (Galie *et al.*, 2016).

Essa doença cardiovascular pode ter origem desconhecida (idiopática), ou ser associada a causas secundárias (Galie *et al.*, 2016). As diferenças entre os vários grupos de classificações da HP tem bastante relevância no que diz respeito ao prognóstico, características histológicas e respostas clínicas (Stenmark *et al.*, 2009). Características histológicas das diferentes lesões vasculares nos pulmões estão intimamente ligadas à fisiopatologia da HP e também à elucidação de quais alvos podem ser promissores para estratégias terapêuticas futuras.

Embora todas as formas de HP possam contribuir para a alta morbidade e mortalidade entre os pacientes, a hipertensão arterial pulmonar (HAP) é a forma da doença particularmente mais severa, progressiva e com maiores chances de levar à insuficiência ventricular direita (Chin *et al.*, 2005; Hemnes e Champion, 2008; Humbert, 2009). Assim, quando um paciente é diagnosticado com HAP, a sua avaliação deve incluir uma série de parâmetros clínicos definidos, os quais se estendem a várias elevações significativas nas pressões arteriais pulmonares. Por exemplo, doenças da vasculatura pulmonar caracterizadas como HAP compartilham características comuns, tais como hipertensão pré-capilar pulmonar, arteriopatia pulmonar hipertensiva (usualmente com lesões endoteliais plexiformes), evolução clínica lenta (meses ou anos), com estágio crônico alcançado ao longo de anos e caracterizado por deterioração progressiva do sistema cardiopulmonar (Stenmark *et al.*, 2009). Além disso, pacientes com HAP frequentemente demonstram respostas similares às terapias atuais disponíveis na clínica (antagonistas da endotelina, inibidores da fosfodiesterase 5, prostanóides e estimuladores da guanilil ciclase solúvel). Entretanto, esses pacientes também exibem diferenças relevantes, por exemplo, no que diz respeito à etiologia em casos de HAP associada à doença pulmonar veno-oclusiva e à doença cardíaca congênita (Stenmark *et al.*, 2009).

A patogênese da resistência aumentada nos pré-capilares pulmonares em pacientes com HAP é geralmente atribuída aos efeitos combinados entre a

vasoconstricção persistente, remodelamento das paredes de artérias pulmonares e trombose *in situ* (Galie et al., 2016; Rabinovitch, 2007; Chan e Loscalzo, 2008). O que parece distinguir a HAP de outras formas de HP é a severidade da arteriopatia. Embora todas as formas de HP apresentem alterações que incluem aumentada espessura das camadas íntima, média e adventícia nas paredes de pequenas artérias pulmonares, e, indiscutivelmente, perda do volume intravascular, a principal característica que define o subgrupo HAP é a chamada arteriopatia plexogênica, uma alteração vascular que, em última instância, dá origem a lesões plexiformes (Stenmark *et al.*, 2009). Os estágios iniciais da HAP são histologicamente não específicos, com hipertrofia da camada média, espessamento da adventícia e aparência muscular em paredes normalmente não-musculares. O avanço da fisiopatologia envolve a formação de lesões plexiformes e fibróticas complexas na camada neointima, que obstruem as médias e pequenas arteríolas pulmonares, limitando significativamente o fluxo sanguíneo nesses vasos (Chazova *et al.*, 1995; Meyrick, 2001; Tuder *et al.*, 2007; Stenmark *et al.*, 2009). Por essa razão, o diagnóstico de pacientes com HAP não deve ser feito em casos nos quais ainda não houve avanço para as características histopatológicas citadas anteriormente. A figura 6 representa os estágios evolutivos da fisiopatologia da HAP.



Figura 7: Representação esquemática evolutiva da fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar. Note que as lesões plexiformes são características em um estágio avançado da doença.

Embora ainda não existam modelos animais de HP com similaridade em todos os aspectos fisiopatológicos e de severidade da doença em humanos (Stenmark *et al.*, 2009), esses modelos dão suporte à ideia de que a HP é iniciada por vários estímulos e que as mudanças estruturais observadas na vasculatura

pulmonar estão relacionadas ao tipo de evento desencadeante (Tuder *et al.*, 2013). Em camundongos, o modelo clássico de HP induzida por hipóxia produz a doença com alguma variabilidade entre as linhagens de animais (Gomez-Arroyo *et al.*, 2012). O desenvolvimento de HP está associado com vários graus de muscularização das pequenas arteríolas pulmonares, que podem variar de leve a moderada, e isso está comumente relacionado à hipertrofia e/ou hiperplasia das células musculares lisas. O espessamento da camada adventícia e a infiltração de células inflamatórias nessa região também são descritos. Essas mudanças vasculares em pacientes com HP são de fato mais leves e menos robustas do que acontece em modelos animais da doença e refletem em diferenças sobre um nível de expressão gênica (Hoshikawa *et al.*, 2003). Novos modelos em camundongos tem explorado essas alterações genéticas de forma mais específica. Por exemplo, camundongos que são mutantes para o gene do BMPR2 (*bone morphogenetic protein receptor type 2*), que apresenta mutações em quase todas as formas de HP em humanos até o momento (Soubrier *et al.*, 2013), desenvolvem HP quando submetidos à hipóxia (West *et al.*, 2004). Todavia, ainda que exista benefícios através da modificação genética como ferramenta, a similaridade com o que ocorre em humanos ainda não consegue ser totalmente reproduzida.

Os modelos animais de HP mais comumente usados são o de hipóxia crônica e o de HP induzida pelo alcaloide mitogênico monocrotalina (MCT). Esses modelos vem sendo usados há décadas e tem, sem dúvida, contribuído para o melhor entendimento do processo hipertensivo pulmonar.

1.2.2 Modelo de HP Induzida por Monocrotalina

A MCT é um alcaloide presente na planta *Crotalaria spectabilis*. A administração de MCT resulta no desenvolvimento progressivo de HP em várias espécies de animais e foi descrito primeiramente após a administração oral repetida em ratos de laboratório há mais de 40 anos atrás (Kay *et al.*, 1967). Sabe-se que a MCT leva à injúria vascular. Particularmente em ratos, o modelo de MCT é atualmente desenvolvido através da injeção parenteral desse alcaloide em solução, fazendo desse protocolo um método simples e viável para um grande espectro de investigações. A espécie atualmente mais usada no modelo de MCT é o rato. Apesar de o exato mecanismo pelo qual a MCT induz a HP ser desconhecido,

sugere-se que ela pode causar injúria endotelial direta que desencadeia o desenvolvimento e progressão de HP severa e eventualmente letal (Jasmin *et al.*, 2001). Outros pesquisadores sugerem que o aumento da pressão arterial pulmonar e remodelamento vascular são causados pelo acúmulo intenso de células inflamatórias na camada adventícia nos pequenos vasos (Wilson, D. W. *et al.*, 1989). Essas modificações ocorrem em artérias e veias e precedem as evidências de hipertrofia do músculo liso na camada média. Assim, a inflamação da adventícia, particularmente o acúmulo de macrófagos, é sugerido por alguns estudos como tendo mais efeitos importantes na patogênese da HP do que as células endoteliais (Stenmark *et al.*, 2009).

Apesar da sucinta similaridade do modelo de HP induzida por MCT, no que diz respeito à fisiopatologia em nível de vasos pulmonares com o que ocorre na clínica em humanos, a injeção da MCT induz significativa hipertrofia e disfunção do ventrículo direito, principais determinantes de sobrevida em pacientes com todas as formas de HP, tornando esse modelo importante para avaliação de novas estratégias que possam promover a cardioproteção em animais. Após altas doses de MCT i.p. em ratos, a pressão sistólica do ventrículo direito pode aumentar significativamente e está associada com baixa taxa de sobrevivência (~35%) 28 dias após a administração desse alcaloide (Roth *et al.*, 1981; Jasmin *et al.*, 2001; Zapata-Sudo *et al.*, 2012; Alencar *et al.*, 2013; Alencar *et al.*, 2014; Alencar *et al.*, 2017).

1.2.3 *Sugen 5416*/hipóxia: um modelo de HAP

Taraseviciene-Stewart e colaboradores (Taraseviciene-Stewart *et al.*, 2001) desenvolveram um modelo de HAP severa que reproduz, de forma mais aproximada ao que ocorre em humanos, os mecanismos etiológicos envolvidos na hiperproliferação das células endoteliais que caracterizam as lesões plexiformes. Baseados no conceito de que o VEGF é um importante fator para a manutenção e diferenciação das células endoteliais, esses investigadores desenharam experimentos para inibir a sinalização desse mediador vascular em ratos expostos a normóxia ou hipóxia crônica. Eles mostraram que o antagonista do receptor de VEGF, *Sugen 5416* (SU-5416), causou leve HP e remodelamento vascular pulmonar em ratos submetidos à normóxia, mas um severa e irreversível HP associada à proliferação predominantemente pré-capilar das células endoteliais em ratos

submetidos à hipóxia crônica. Eles apresentaram evidências que os ratos tratados com o SU-5416 também tinham proliferação de células musculares lisas, indicando que os receptores de VEGF das células endoteliais podem regular o crescimento das células musculares lisas pulmonares. Devido ao fato desses pesquisadores terem mostrado que o bloqueio do receptor de VEGF pode causar também apoptose de células endoteliais, e que em condições de hipóxia desencadeou a proliferação de células endoteliais no lúmen dos pequenos vasos, eles especularam que a hipóxia crônica, per si, e/ou a vasoconstrição excessiva estimularam a proliferação de uma linhagem de células endoteliais resistentes à apoptose.

Interessantemente, foi visto que a hipóxia crônica, juntamente ao bloqueio do receptor VEGF, causaram severa e persistente HP, mesmo após os animais terem sido removidos dos estímulos hipóxicos, algo que não acontece no modelo de hipóxia crônica sozinha, na qual os animais deixam de apresentar as características fisiopatológicas da HP com o passar do tempo. A persistência e progressão da doença vascular pulmonar e da insuficiência ventricular direita com morte de alguns, mas não de todos os animais é, de alguma maneira similar, embora obviamente diferente em seu curso temporal, à progressão das desordens hipertensivas pulmonares em humanos (Stenmark *et al.*, 2009). Uma das vantagens mais importantes desse modelo, é que a injeção de SU-5416 afeta apenas os receptores presentes nas células endoteliais pulmonares e não em outros órgãos (Burke *et al.*, 2009).

Não houve aparecimento de infiltrado perivascular de monócitos e macrófagos neste modelo. Esse fato é importante de ser comparado com o que acontece no modelo de hipóxia crônica sozinha, o qual mostrou claramente causar ambos os infiltrados e um influxo persistente de células mononucleares dentro das paredes de artérias pulmonares (Burke *et al.*, 2009). Devido à severidade do modelo SU-5416, formação de lesões na camada íntima e a natureza progressiva da fisiopatologia da doença em roedores, essa técnica experimental tem sido atualmente a mais usada para o estudo de novas terapias para o tratamento da HAP (Stenmark *et al.*, 2009).

Concluindo, apesar de ainda existirem controvérsias acerca dos modelos experimentais de HP e HAP relacionadas à similaridade com o que ocorre em humanos, o que deve ser preconizado na avaliação de novos candidatos a fármacos para o tratamento dessas condições é a avaliação das substâncias em diferentes

protocolos. De acordo com a viabilidade dos modelos SU-5416/hipóxia - por induzir lesões pulmonares e insuficiência cardíaca que melhor reproduzem o cenário clínico - e MCT - que apesar de promover hipertensão em vasta gama de vasos pulmonares, inflamação e ter efeitos sistêmicos tóxicos, ainda assim promove intensa insuficiência ventricular direita - ambos representam uma boa opção para comparação de potenciais farmacológicos de novos candidatos a fármacos.

1.3 Justificativa

Atualmente, não existe cura para a HP e há pouca evidência dos benefícios advindos dos tratamentos disponíveis para progressão da mesma. As terapias medicamentosas mais usadas na atualidade lançam mão da administração de anticoagulantes para as alterações trombóticas, diuréticos (quando há insuficiência cardíaca direita), oxigenioterapia com uso de aparelho adequado, bloqueadores de canais de cálcio (aumentam a sobrevida dos pacientes que respondem ao tratamento, mas estes representam menos de 10% das pessoas com HP) (Galie *et al.*, 2016).

Assim também, análogos da prostaciclina são bastante utilizados, porém apresentam várias complicações devido à administração intravenosa, inalatória ou subcutânea. O único análogo que pode ser administrado por via oral possui meia-vida de 35-40 minutos e não têm apresentado bons resultados clínicos (Galie *et al.*, 2016).

Antagonistas de receptores de endotelina tem sido bastante utilizados, já que foi observado que pacientes com HP possuem níveis elevados do agonista endógeno, sendo um potente vasoconstritor produzido pelas células endoteliais. No entanto, alguns destes fármacos provocam alterações hepáticas, como aumento dos níveis de aminotransferase e hepatite aguda, necessitando de contínuo monitoramento da função hepática dos pacientes.

Assim, é interessante que se busque novas abordagens terapêuticas, para melhorar a condição dos portadores dessa doença.

Um dos mecanismos de sinalização celular envolvidos na fisiopatologia da doença é a via de MAPK p38 α . MAPKs são uma família de proteínas intracelulares ativadas por fosforilação, e uma delas é a MAPK p38 α . Essas quinases são ativadas via receptor de membrana do tipo tirosina quinase, ativados por meio de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, estresse celular, assim como hipóxia, esses receptores de membrana se autofosforilam e desencadeiam uma cascata de fosforilação até chegar a MAPK p38 α , que é translocada para o núcleo onde ativa fatores de transcrição que controlam a expressão de enzimas envolvidas na inflamação, proliferação celular, apoptose.

Sabe-se que a ativação de p38 α exerce um papel essencial na produção de citocinas próinflamatórias (IL1b, TNF-alfa, IL-6). (ZARUBIN, 2005). Assim como na

diferenciação celular e proliferação em artérias. (SHUANGQUAN, 2016). Eventos celulares envolvidos fortemente na fisiopatologia da doença.

CHURCH e colaboradores, 2015, por meio de coloração imuno-histoquímica de secções de pulmões de pacientes com HAP que sofreram transplante pulmonar, mostraram aumento da expressão de MAPK p38 α fosforilada em comparação com pulmões controle. Isso foi visto em todas as camadas das paredes dos vasos. Além disso, nas lesões plexiformes identificadas, houve forte coloração para p38 MAPK em células ao redor dos canais vasculares tanto no citosol quanto no núcleo.

Assim, este trabalho tem como objetivo estudar as ações de um novo inibidor de MAPK p38 α no remodelamento vascular e cardíaco, ambos resultantes da HAP induzida por monocrotalina ou hipóxia/SUGEN em ratos, fornecendo, subsequentemente, dados adicionais à literatura, acerca da identificação dessa via como alvo promissor para o tratamento da HAP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliação farmacológica de um novo inibidor de MAPK p38 α , LASSBio-1824, na hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina ou hipóxia/SUGEN em ratos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de LASSBio-1824 na função vascular pulmonar;
- Parâmetros hemodinâmicos em ratos com HAP tratados ou não com LASSBio-1824;
- Alterações histopatológicas de artérias pulmonares e cardíacas após o tratamento com veiculo e LASSBio-1824;
- Investigar ação de LASSBio-1824 na via de sinalização MAPK-p38;
- Avaliar a intolerância ao exercício em animais tratados ou não com LASSBio-1824;
- Avaliar a via de sinalização MAPK p38 α , após inibição com LASSBio-1824, por meio da técnica de *western blot*;
- Investigar a inflamação e estresse oxidativo no modelo de hipóxia-SUGEN;
- Avaliar a expressão de proteínas relacionadas ao remodelamento vascular e cardíaco por técnicas de imunoeletoforese e imunohistoquímica;
- Avaliar o efeito cardioprotetor em cardiomiócitos isolados de ventrículo direito através de medidas de estresse oxidativo e da integridade mitocondrial por citometria de fluxo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais de Experimentação do Centro de Ciências da Saúde (CEUA-CCS) da UFRJ, sob protocolo número 106/16. Os animais provindos do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ (ICB-UFRJ) foram mantidos em sala com temperatura (25°C) e umidade (50-60%) controladas, em um ciclo de 12h/12h, claro/escuro. Água e ração foram disponibilizadas sem restrição.

3.1 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

O derivado *N*-acilidrazônico LASSBio-1824 utilizado neste trabalho foi gentilmente cedidos pelo Prof. Eliezer J. Barreiro, coordenador do LASSBio, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ. Esses derivados serão dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração do DMSO nas cubas experimentais não ultrapassou 0.6% (v/v) e a administração por via oral não ultrapassou 200 µL por animal, não produzindo, assim, nenhum efeito significativo nos parâmetros avaliados. Fenilefrina e acetilcolina e foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (USA) e dissolvidos em água.

3.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS EM PREPARAÇÕES DE MÚSCULO LISO ARTERIAL

3.2.1 Registro de tensão isométrica em artéria pulmonar isolada de rato

Este protocolo será executado de acordo com o que já foi publicado por (Alencar *et al.*, 2014; Alencar *et al.*, 2017). Ratos Wistar (220 - 300 g) serão eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia geral com éter etílico. A região adjacente ao VD da artéria pulmonar será rapidamente retirada e transferida para uma pequena cuba contendo solução Tyrode modificada, constituída de (mM): NaCl, 123; KCl, 4,7; MgCl₂, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; dextrose, 11,5; NaHCO₃, 15,5; CaCl₂, 1,2. Cada anel, possuindo em média 2-3 mm de comprimento, será posicionado em

duas hastas experimentais (uma fixa e outra móvel) dentro das cubas verticais preenchidas com 20 mL de solução Tyrode modificada, continuamente oxigenada com mistura carbogênica (95% O₂/5% CO₂), e mantida à 37°C (Figura 16). Uma das extremidades do tecido é conectada a um transdutor de força (Grass FT 03, USA) para o registro de tensão isométrica. Os sinais gerados serão digitalizados (Digidata 1322, USA) e armazenados em computador para análise através do programa Axoscope (Axon Instruments, Inc, USA).

Após o período de estabilização da preparação (2 horas com lavagens a cada intervalo de 30 minutos), a contração do músculo liso vascular será induzida com a adição de 10 µM de fenilefrina (agonista α₁ adrenérgico - produz contração do músculo liso vascular pelo aumento do Ca²⁺ intracelular) à cuba. Estabelecido o platô da contratura, será adicionada a acetilcolina (agonista muscarínico - promove a liberação de NO das células endoteliais e relaxamento vascular) (10 µM) para que seja determinada a integridade do endotélio vascular. O endotélio é considerado íntegro, nas artérias pulmonares, quando o relaxamento induzido pela acetilcolina é maior que 60%. Todos os experimentos foram realizados com integridade deste tecido epitelial especializado.

Para investigar o efeito vasodilatador do derivado *N*-acilidrazônico ele será adicionados às cubas experimentais, em concentrações crescentes (5 × 10⁻⁶ - 5 × 10⁻⁴ M), após a estabilização da contração do vaso, novamente induzida com 10 µM de fenilefrina.

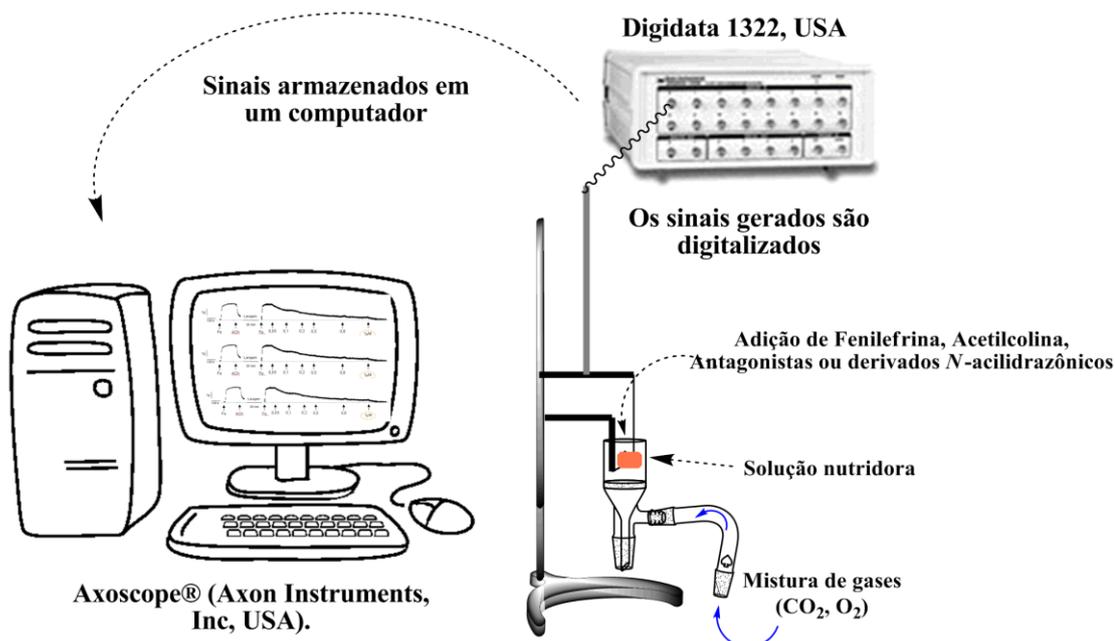


Figura 8: Esquema representativo do sistema de aparelhos utilizados para registrar a tensão isométrica nas artérias pulmonares.

Para avaliar a reatividade vascular das artérias pulmonares de animais com HP, estas preparações passarão pelo mesmo protocolo descrito anteriormente e serão, em seguida, expostas a concentrações crescentes de fenilefrina (1 nM – 10 μ M). Logo após a estabilização do platô da resposta contrátil obtida com a adição da maior concentração de fenilefrina, serão adicionadas concentrações crescentes de acetilcolina (1 nM – 10 μ M) e calculados os valores de relaxamento máximo. As CE_{50} serão calculadas para um efeito máximo de 100%.

3.3 MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

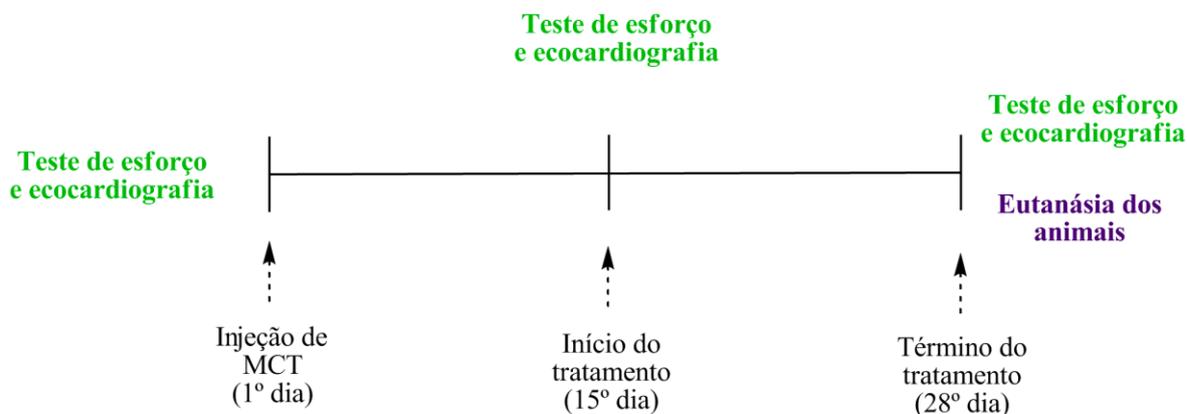
A HAP será induzida através da administração de MCT, um alcalóide presente na *Crotalaria spectabilis*, que produz lesão endotelial nas artérias pulmonares (Thomas, 1998). Essa lesão leva a um remodelamento da parede dos vasos, maior resistência vascular pulmonar, e consequente HAP com hipertrofia ventricular direita. A MCT será administrada numa dose única de 60 mg/kg i.p nos ratos Wistar. O tratamento terapêutico com os derivados será feito durante 14 dias e terá início no 14^o dia após a injeção da MCT, período necessário para a estabilização da doença (esquema 1), de acordo com o que já foi descrito por (Alencar *et al.*, 2014; Alencar *et al.*, 2017).

Os grupos experimentais serão os seguintes:

1. Sem administração de MCT (grupo controle);
2. com administração de MCT + salina (grupo MCT + salina);
3. com administração de MCT + veículo (grupo MCT + DMSO);
4. com administração de MCT + LASSBio-1824

Os ratos serão pesados diariamente e as doses ajustadas apropriadamente, de acordo com as variações nos pesos corporais.

Protocolo terapêutico



Esquema 1: Esquema representativo dos protocolos experimentais realizados no modelo de HP. Monocrotalina (MCT) é administrada em dose única i.p. 60 mg/kg para a indução da HP em ratos. O tratamento terapêutico é iniciado após 14 dias da indução da HAP e finalizado no 28º dia (ALENCAR et al., 2017).

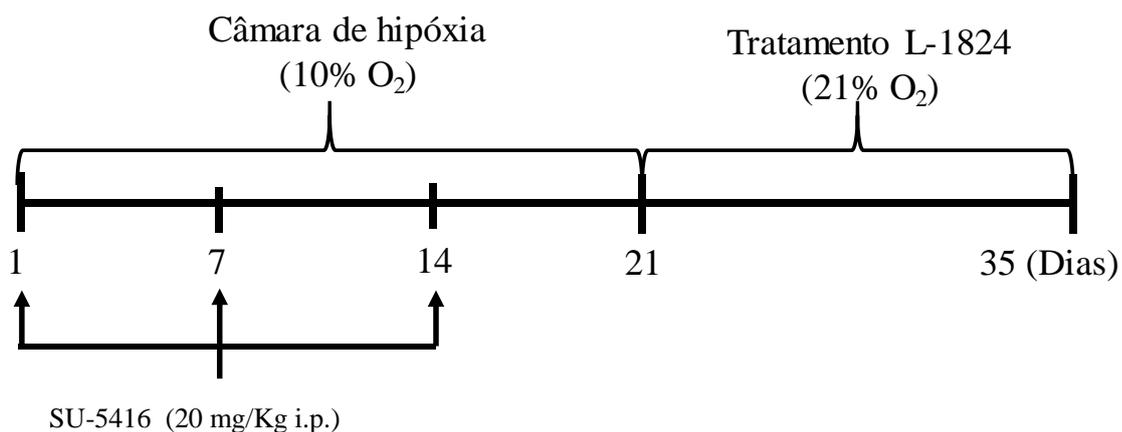
3.3 MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR HIPÓXIA *SUGEN-5416*

Nesse modelo os animais são acondicionados numa câmara de hipóxia a 10% de oxigênio por três semanas. Durante esse período uma vez por semana eles recebem uma injeção via i.p. de *Sugen-5416*, na dose de 20mg/Kg, os ratos serão pesados semanalmente e as doses ajustadas apropriadamente, de acordo com as variações nos pesos corporais. *Sugen-5416* é um antagonista do receptor de VEGF. O bloqueio desse receptor pode causar apoptose de células endoteliais, porém foi visto que a hipóxia crônica estimulava a proliferação de uma linhagem de células endoteliais resistentes a apoptose, levando a proliferação de células endoteliais no lúmen dos vasos, predominantemente pré-capilar, em ratos submetidos a hipóxia crônica, causando severa e persistente HAP, mesmo após os animais terem sido removidos dos estímulos hipóxicos.

A persistência e progressão da doença vascular pulmonar e da insuficiência ventricular direita com morte de alguns, mas não de todos os animais é, de alguma maneira similar, embora obviamente diferente em seu curso temporal, à progressão das desordens hipertensivas pulmonares em humanos (Stenmark et al., 2009).

Os grupos experimentais serão os seguintes:

1. Normóxia (grupo controle);
2. Hipóxia Sugén-5416 + salina
3. Hipóxia Sugén-5416 + DMSO
4. Hipóxia Sugén-5416 + LASSBio-1824



Esquema 2

3.4.1 Teste de esforço

Para a avaliação da intolerância ao exercício físico, realiza-se o teste de esforço nos ratos. Os animais que não forem capazes de andar durante aclimatização serão excluídos do teste.

Este teste será executado entre 8 e 11 horas da manhã, para evitar a interferência da variação da concentração de glicogênio do animal que poderia influenciar nos resultados.

3.4.2 Ecocardiografia transtorácica

A ecocardiografia é um método não-invasivo, que possibilita a determinação do volume, massa e função mecânica do coração, através da análise da anatomia e da função sistólica e diastólica das câmaras cardíacas. Eixo curto e eixo longo paraesternal B dimensional visualizações do ventrículo esquerdo e direito serão adquiridos para obter a imagem em modo-M. Eixo curto B-dimensional pontos de vista de ambos os ventrículos, em nível dos músculos papilares serão adquiridos para obter áreas ventriculares esquerdas e direitas. Débito cardíaco, volume sistólico

e fração de ejeção serão obtidos a partir do eixo modo B-long de acordo com o método de Simpson. As seguintes variáveis serão obtidas em modo-M: o septo, a parede posterior do ventrículo esquerdo e do diâmetro ventricular interna esquerda na diástole, o diâmetro da aorta e do átrio esquerdo e sua relação, o diâmetro pulmonar, a espessura da parede eo diâmetro da via de saída do ventrículo direito na diástole. Doppler da artéria aorta foi aplicado para obter a velocidade integrante do fluxo aórtico e tempo de aceleração do fluxo aórtico. Todas as medidas serão obtidas segundo a Sociedade Americana de Ecocardiografia Diretrizes.

Os animais dos diferentes grupos experimentais serão anestesiados com isoflurano por via inalatória para a avaliação da função cardíaca. O exame será realizado utilizando-se um equipamento de ecocardiografia acoplado a transdutor mecânico de 10 MHz (modelo Vevo 770, Visualsonics, Toronto, Canadá). Todas as medidas serão obtidas de acordo com os manuais da Sociedade Americana de Ecocardiografia e da Associação Européia de Ecocardiografia (Alencar, 2013).

3.4.3 Medida da pressão sistólica do ventrículo direito

Um dia após a medida dos parâmetros ecocardiográficos, os animais serão anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg; i.p.) e xilazina (15 mg/kg; i.p.) para a medida da pressão no ventrículo direito. Esta avaliação será realizada através de punção direta no ventrículo direito utilizando-se um cateter venoso scalp weplast (19G) preenchido com soro fisiológico heparinizado conectado a um transdutor de pressão calibrado (MLT884, ADInstruments, USA). A pressão ventricular será registrada e armazenada no computador para posterior análise (Powerlab, ADInstruments, USA) utilizando o programa Lab Chart® (7.0, ADInstruments). Após a medida da pressão intracavitária, os ratos serão sacrificados para retirada do coração e pulmões a fim de realizar a análise histopatológica. Além disso, o coração será pesado e dividido em duas partes: ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo junto com o septo intraventricular (VE + S). A artéria pulmonar será retirada para registro de tensão isométrica como foi descrito anteriormente (Alencar, 2013).

3.4.4 Análise histopatológica do pulmão

Após a retirada, os pulmões serão mantidos em solução de formaldeído 10 % em tampão-fosfato para fixação. O tecido será então seccionado em micrótomo (Lupe modelo MRP 03) em frações de 4 μ m. Após a avaliação das lâminas em microscópio, as alterações histológicas serão classificadas com base na frequência e na extensão das lesões (Alencar et al., 2017).

3.4.5 Imunohistoquímica

Para a realização das técnicas de imunohistoquímica, serão utilizados anticorpos para detecção do receptor MAPK p38, ERK, eNOS e iNOS (ab15323) e alfa-actina de músculo liso.

3.4.6 Western Blot

A expressão de proteínas nos tecidos pulmonar e cardíaco será avaliada através da realização de "western blot". Os homogenatos serão adquiridos a partir de pulmões e corações provenientes dos diferentes grupos experimentais. Os tecidos serão removidos imediatamente após a eutanásia dos animais, cortados, mantidos em solução a 4°C contendo (em mM): sacarose, 250, HEPES-Tris (pH 7,6), 10, EDTA, 2 e PMSF, 1 e homogeneizados em homogeneizador (Potter) com pistilo de teflon.

O homogenato será centrifugado a 20000 g por 10 min a 4°C em centrífuga (SCR20B) usando o rotor RPR12-2 (Hitachi). Após a centrifugação, será descartado o precipitado e o sobrenadante será coletado e estocado a -80°C para futura dosagem de proteína pelo método de Bradford. A imunodeteção de proteínas nos homogenatos será determinada por eletroforese seguida de imunodeteção. Os homogenatos serão solubilizados em tampão de amostra para eletroforese (glicerol, 10%; azul de bromofenol, 0,02%; 100 mM; SDS 5%) e a solução final fracionada em gel SDS-PAGE 9%. A transferência das proteínas para as membranas de nitrocelulose será realizada no sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot, Bio-Rad). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose serão incubadas com anticorpo primário por 12 h (durante a noite), diluído na proporção de 1:1000, em

solução tampão fosfato salino contendo 0,1% de tween 20 (TBS-T) contendo leite em pó desnatado (5%). Após este período, as membranas serão lavadas com TBS-T e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário na proporção de 1:10000, em solução tampão de TBS-T contendo leite pó desnatado (5%).

A imunodeteccção de proteínas será observada pela reação quimioluminescente do sistema ECL (western blotting system detection) para western blotting. Após a incubação da membrana com essa solução de deteccção, por 5 min, à temperatura ambiente, a membrana será exposta imediatamente ao filme de raio-X (Kodak X-Omat K), por curtos intervalos de tempo, até a obtenção de uma imagem adequada.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

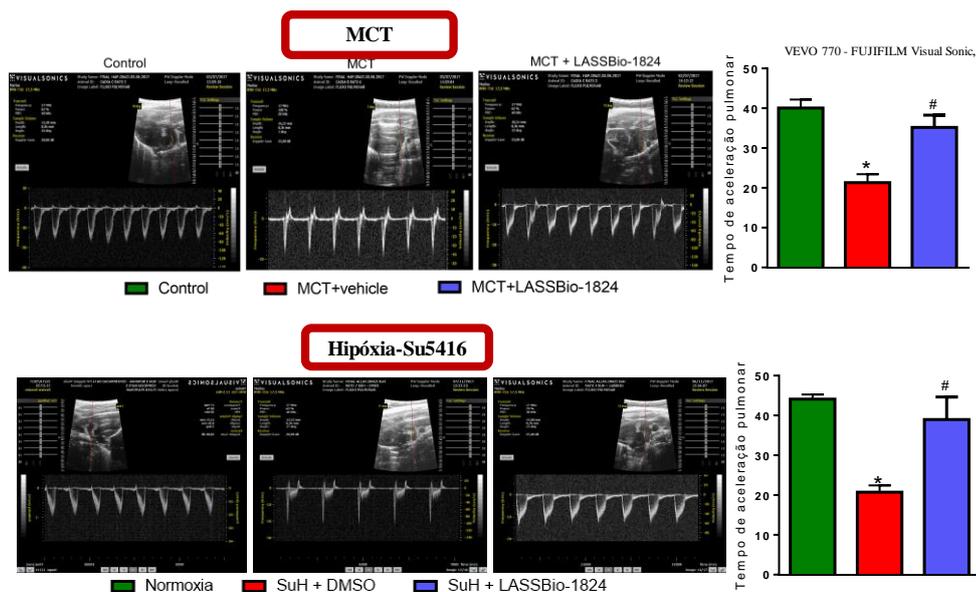
Todos os resultados foram expressos como média \pm E.P.M.. Os valores correspondentes a 50 % de inibição (CI_{50}) foram calculados utilizando programa GraphPad Prism® 5.

Para comparar os grupos experimentais com o grupo controle foi utilizado o teste de análise de variância (One Way – ANOVA) seguido do teste de Dunnett. Para a comparação de múltiplos grupos foi usado ANOVA seguido pelo teste de Newman Keuls. A diferença entre os grupos experimentais foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS PRELIMINARES

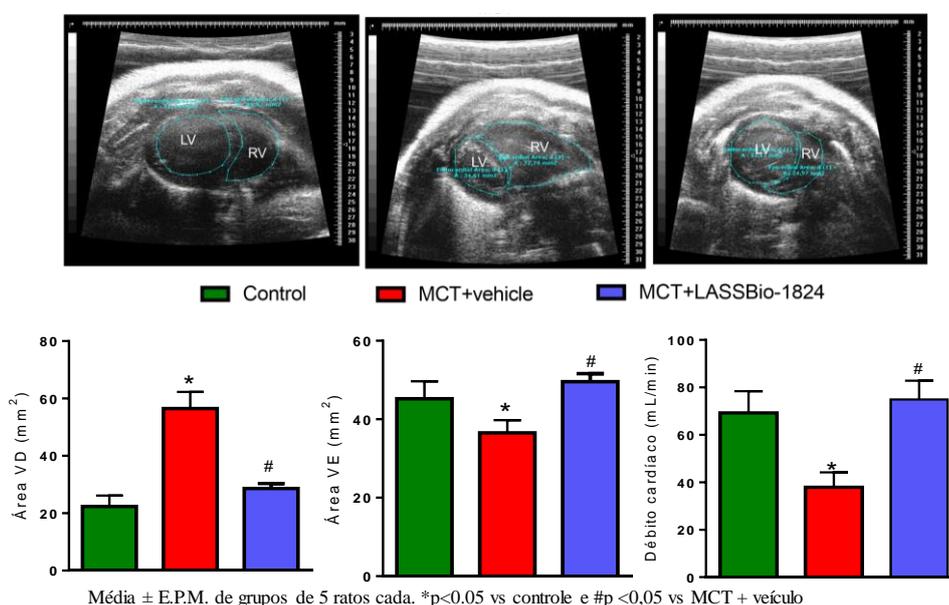
Ecocardiografia transtorácica

Tempo de aceleração do fluxo sanguíneo pulmonar: LASSBIO-1824 Melhorou o fluxo sanguíneo pulmonar; indicando uma ação tanto protetora para o sistema pulmonar como para o coração, ao reduzir a sobrecarga do ventrículo direito (VD).

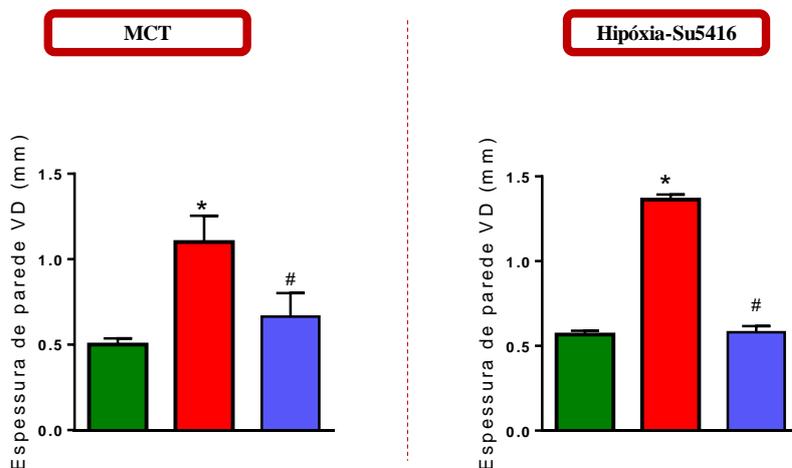


Média ± E.P.M. de grupos de 5 ratos cada. * $p < 0.05$ vs controle ou normoxia e # $p < 0.05$ vs MCT + veículo ou SuH + DMSO.

Área cardíaca e débito cardíaco: LASSBio-1824 reduziu a área do VD, aumentou a área do ventrículo esquerdo (VE), promovendo alterações estruturais e funcionais, como a melhora do débito cardíaco.



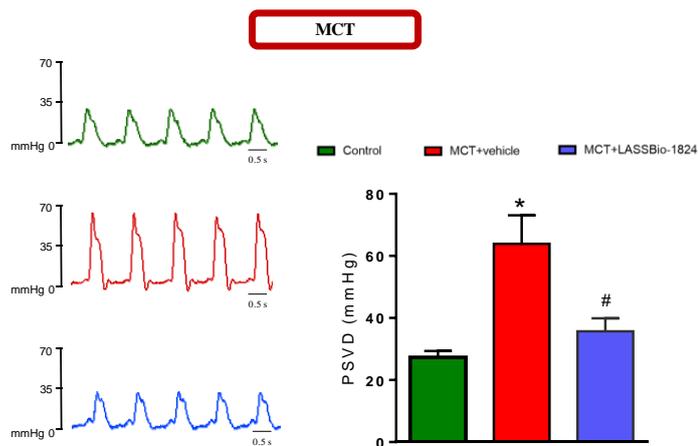
Espessura de parede do ventrículo direito: LASSBio-1824 reduziu a espessura do VD.



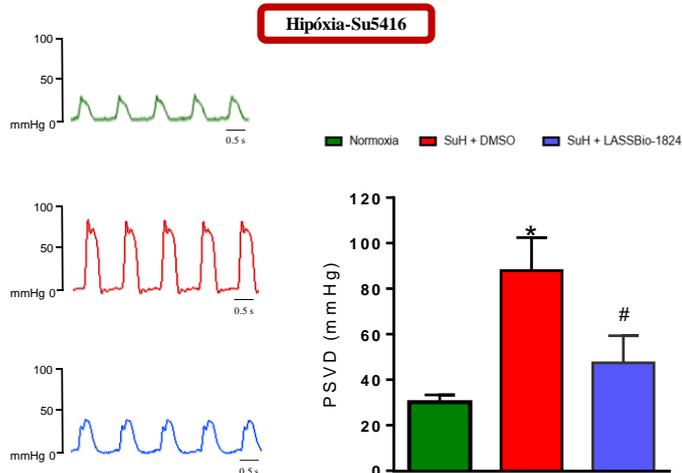
Média ± E.P.M. de grupos de 5 ratos cada. * $p < 0.05$ vs controle ou normoxia e # $p < 0.05$ vs MCT + veículo ou SuH + DMSO.

Hemodinâmica ventricular invasiva

Pressão sistólica do ventrículo direito: LASSBio-1824 reduziu a pressão sistólica do VD, confirmando uma melhora na resistência vascular pulmonar.



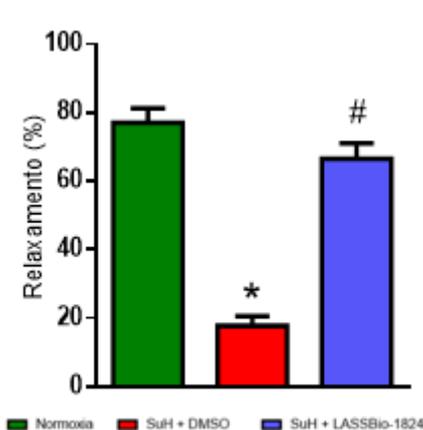
Média ± E.P.M. de grupos de 5 ratos cada. * $p < 0.05$ vs controle e # $p < 0.05$ vs MCT + veículo.



Média ± E.P.M. de grupos de 5 ratos cada. * $p < 0.05$ vs normoxia e # $p < 0.05$ vs SuH + DMSO.

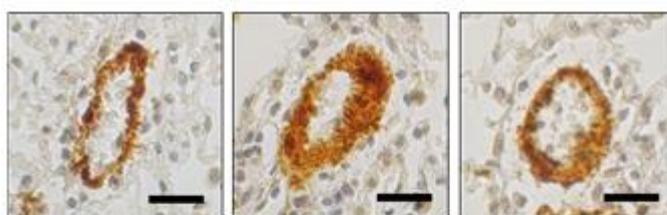
Reatividade vascular: Reverteu a disfunção endotelial das artérias pulmonares

Hipóxia-Su5416
20mg/Kg I.P.

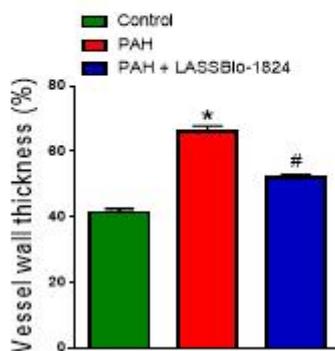


Média ± E.P.M. de grupos de 5 ratos cada. *p<0.05 vs normoxia e #p <0,05 vs SuH + DMSO.

Imunohistoquímica: A espessura da parede medial das arteríolas pulmonares distais (<50 µm) foi medida por imuno-histoquímica para expressão de alfa-SMA que aumentou de 40,7 ± 3,5% (controle) para 64,1 ± 3,1% em animais com HAP (P <0,05) e foi reduzida no grupo tratado (52,2 ± 2,9).



Hipóxia-Su5416
20mg/Kg I.P.



Média ± E.P.M. de grupos de 5 ratos cada. *p<0.05 vs normoxia e #p <0,05 vs SuH + DMSO.

REFERÊNCIAS

ALENCAR AK, Montes GC, Montagnoli T, Silva AM, Martinez ST, Fraga AG, et al. (2017b). Activation of GPER ameliorates experimental pulmonary hypertension in male rats. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 97: 208-217.

ALENCAR, A. K. et al. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine A₂R activity. *Int J Cardiol*, v. 173, n. 2, p. 154-62, May 1 2014.

ALENCAR, A.K.N., et al. Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A_{2A} receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Brit. J. Pharmacol.* v. 169, p. 953–962, 2013.

BARREIRO, E. J. Estratégia de Simplificação Molecular no Planejamento Racional de Fármacos: A Descoberta de Novo Agente Cardioativo. *Química Nova*, v. 25, no. 6B, p. 1172-1180, 2002.

CHAN, S. Y.; LOSCALZO, J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol*, v. 44, n. 1, p. 14-30, Jan 2008.

CHAZOVA, I. et al. Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. *Am J Pathol*, v. 146, n. 2, p. 389-97, Feb 1995.

CHIN, K. M.; KIM, N. H.; RUBIN, L. J. The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coron Artery Dis*, v. 16, n. 1, p. 13-8, Feb 2005.

GALIE N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. (2016). 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal* 37(1): 67-119.

GOLEMBIOWSKA, K.; DZIUBINA, A. The effect of adenosine A_{2A} receptor antagonists on hydroxyl radical, dopamine, and glutamate in the striatum of rats with altered function of VMAT2. *Neurotox. Res.* v. 22(2), p. 150–157, 2012.

GOMEZ-ARROYO, J. et al. A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 302, n. 10, p. L977-91, May 15 2012.

HEMNES, A. R.; CHAMPION, H. C. Right heart function and haemodynamics in pulmonary hypertension. *Int J Clin Pract Suppl*, n. 160, p. 11-9, Jul 2008.

HOSHIKAWA, Y. et al. Hypoxia induces different genes in the lungs of rats compared with mice. **Physiol Genomics**, v. 12, n. 3, p. 209-19, Feb 6 2003.

HUMBERT, M. Update in pulmonary hypertension 2008. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 179, n. 8, p. 650-6, Apr 15 2009.

JASMIN, J. F. et al. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 103, n. 2, p. 314-8, Jan 16 2001.

KAY, J. M.; HARRIS, P.; HEATH, D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. **Thorax**, v. 22, n. 2, p. 176-9, Mar 1967.

KÜMMERLE, A. E. **Uma Quimioteca de *N*-acilidrazonas (NAH): A Influência da Metila na Modulação das Propriedades Analgésicas e Antiinflamatórias de Novos Candidatos a Fármacos**. Tese de Doutorado, IQ – UFRJ – Rio de Janeiro, 2009.

LIMA, P.C., et al. Synthesis and analgesic activity of novel *N*-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. **European Journal of Medicinal Chemistry**; v. 35(2), p. 187–203, 2000.

MEYRICK, B. The pathology of pulmonary artery hypertension. **Clin Chest Med**, v. 22, n. 3, p. 393-404, vii, Sep 2001.

MONTANI, D.; CHAUMAIS, M.C.; SAVALE, L.; NATALI, D.; PRICE, L.C.; JAÏS, X.; HUMBERT M.; SIMONNEAU G.; SITBON O. Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors in Pulmonary Arterial Hypertension. **Adv. Ther.** V. 26(9), p. 813-825, 2009.

RABINOVITCH, M. Pathobiology of pulmonary hypertension. **Annu Rev Pathol**, v. 2, p. 369-99, 2007.

RAY C.J.; MARSHALL J.M. The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. **J. Physiol.** v. 570.1, p. 85–96, 2006.

ROTH, R. A. et al. Effect of monocrotaline ingestion on liver, kidney, and lung of rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 60, n. 2, p. 193-203, Sep 15 1981.

SCARAMELLO, C.B.V.; CUNHA, V.M.N.; RODRIGUEZ, J.B.R.; NOEL, F. Characterization of subcellular fractions and distribution profiles of transport components involved in Ca²⁺ homeostasis in rat vas deferens. **J. Pharmacol. and Toxicol. Methods**. v. 47, p. 93– 98, 2002.

SILVA, A. G.; et al. Synthesis and vasodilatory activity of new *N*-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 3431-3437, 2005.

SOUBRIER, F. et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 25 Suppl, p. D13-21, Dec 24 2013.

STENMARK, K. R. et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 297, n. 6, p. L1013-32, Dec 2009.

THOMAS, H.C. et al. Monocrotaline Pyrrole Induces Apoptosis in Pulmonary Artery Endothelial Cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 151, p. 236-244, 1998.

TUDER, R. M. et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 25 Suppl, p. D4-12, Dec 24 2013.

TUDER, R. M. et al. Pathology of pulmonary hypertension. **Clin Chest Med**, v. 28, n. 1, p. 23-42, vii, Mar 2007.

WEST, J. et al. Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle. **Circ Res**, v. 94, n. 8, p. 1109-14, Apr 30 2004.

WILSON, D. M. et al. Effects of elevated serum insulinlike growth factor-II on growth hormone and insulinlike growth factor-I mRNA and secretion. **Metabolism**, v. 38, n. 1, p. 57-62, Jan 1989.

XU, M.H., et al. Absence of the adenosine A_{2A} receptor confers pulmonary arterial hypertension and increased pulmonary vascular remodeling in mice. **J. Vasc. Res.** v. 48, p. 171-183, 2011.

ZAPATA-SUDO, G. et al. Benzenesulfonamide attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in a rat model. **Eur J Pharmacol**, v. 690, n. 1-3, p. 176-82, Sep 5 2012.

TARASEVICIENE-STEWART, L. et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. **FASEB J**, v. 15, n. 2, p. 427-38, Feb 2001. ISSN 0892-6638.

BURKE, D. L. et al. Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 297, n. 2, p. L238-50, Aug 2009. ISSN 1522-1504

ROSANA et al, Discovery of naphthyl-N- acylhydrazone p38 α MAPK inhibitors with in vivo anti-inflammatory and anti-TNF- α activity. *Chem Biol Drug Des.* 2017;1–7.

ZARUBIN et al, Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway *Cell Research*,v.15(1), p.11-18), 2015.

SHUANGQUAN Yan et al, Baicalin Attenuates Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension to Improve Hypoxic Cor Pulmonale by Reducing the Activity of the p38 MAPK Signaling Pathway and MMP-9, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, p. 1.

CHURCH et al, The reversal of pulmonary vascular remodeling through inhibition of p38 MAPK-alpha: a potential novel anti-inflammatory strategy in pulmonary Hypertension, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309: L333–L347, 2015.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

ATIVIDADES	2018/1	2018/2	2019/1	2019/2	2020/1	2020/2
Início do doutorado	X					
Modelo de HP induzida por MCT-VO	X	X	X			
Modelo de HP induzida por hipóxia/SUGEN - VO	X	X	X			
Obtenção de créditos	X	X	X	X	X	
Publicação de resultados em eventos		X		X		X
Submissão de artigos científicos				X		X
Defesa do doutorado						X