



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Instituto do Coração Edson Saad

Programa de pós-Graduação em Cardiologia

Laboratório de Farmacologia Cardiovascular



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

Grazielle Fernandes da Silva

Tese de doutorado

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zapata-Sudo

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo (*in memoriam*)

Rio de Janeiro, RJ
Setembro de 2022

Grazielle Fernandes da Silva

**NOVO INIBIDOR DE MAPK p38 α REDUZ DISFUNÇÃO VENTRICULAR
INDUZIDA PELA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cardiologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e do Instituto do Coração Edson Saad, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Medicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zapata-Sudo

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo (*in memoriam*)

Rio de Janeiro, RJ
Setembro de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Grazielle Fernandes da Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zapata-Sudo

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo (*in memoriam*)

Tese submetida ao Corpo Docente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Medicina.

Aprovada por:

Rio de Janeiro, RJ
Setembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser a força que conduziu todos meus passos e me trouxe até esse momento.

A minha orientadora Prof. Dr^a Gisele Zapata-Sudo e Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo (*in memoriam*), pela oportunidade, sem a qual eu não estaria aqui. Por terem confiado esse projeto a mim e por todas as orientações.

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular pela ajuda e ensinamentos, em especial, Allan, Tadeu, Jaqueline e Marina que estiveram comigo desde o início e estado presentes em momentos fundamentais.

Também agradeço a todo o corpo do Programa de Pós-Graduação em Cardiologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e do Instituto do Coração Edson Saad, pelo acompanhamento durante todos esses anos, em especial Henry, professora Glaucia e Professor Pedrosa, que durante os seminários de tese foram lapidando e me dando a segurança para hoje chegar a essa apresentação.

Agradeço aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, INCT-INOVAR, FAPERJ.

Ao Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio[®]) ICB -UFRJ, pela colaboração. Em especial professor Mansour e Rosana pelos ensinamentos e elucidações sobre a substância LASSBio-1824.

Agradeço os amigos; Luciano, Anderson e Wankler que foram incentivo e compreensão quando eu mais precisei.

A Fabio pelo amor e companheirismo, por acreditar tanto em mim e pelo incentivo diário.

E principalmente minha família; minha mãe Neusa, meu pai Antônio e minha irmã Cintia, que são tudo que sou, e que mesmo distantes foram a força principal que não me deixou desistir e chegar até aqui.

RESUMO

Silva Fernandes Grazielle. “Novo inibidor de MAPK p38 α reduz disfunção ventricular induzida pela hipertensão arterial pulmonar em ratos”. Rio de Janeiro, 2022. Tese (Doutorado em Medicina). Faculdade de Medicina e Instituto do Coração Edson Saad da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introdução: A hipertensão arterial pulmonar (HAP) se apresenta com aumento da resistência vascular pulmonar e falência do ventrículo direito. O presente trabalho visa determinar os efeitos de um novo inibidor da MAPK p38 α denominado LASSBio-1824 em modelo animal de HAP.

Método: Os experimentos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (sob o número 039/19). No modelo experimental de HAP induzida por monocrotalina (MCT), os animais receberam uma única injeção intraperitoneal de MCT (60 mg/kg). Após duas semanas de indução da doença, os animais foram tratados com veículo (DMSO) ou LASSBio-1824 durante 14 dias (n = 5 por grupo). No modelo de HAP induzida pela hipóxia + Su5416, os animais foram acondicionados numa câmara de hipóxia a 10% de oxigênio por 3 semanas com injeção intraperitoneal semanal de um inibidor do fator de crescimento endotelial vascular- Su5416 (20 mg/kg). Após as 3 semanas de hipóxia, foi iniciado o tratamento com LASSBio-1824 por 14 dias mantendo os animais em ambiente de normoxia (n = 5 por grupo). Os seguintes parâmetros foram avaliados: 1. função e estrutura cardíaca através da ecocardiografia transtorácica; 2. pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) através de cateterismo; 3. reatividade vascular de artérias pulmonares isoladas dos grupos experimentais; 4. expressão de proteínas de coração e pulmão.

Resultados: LASSBio-1824 normalizou o fluxo nas artérias pulmonares de ratos com HAP, além de reverter significativamente o aumento da pressão sistólica, a hipertrofia e a disfunção do ventrículo direito. LASSBio-1824 reduziu o remodelamento e a hipertrofia da parede dos vasos pulmonares distais, atenuou a disfunção endotelial vascular pulmonar, reduziu a fibrose cardíaca e alterou a expressão de proteínas envolvidas na patogênese da HAP no pulmão e ventrículo direito dos ratos doentes.

Conclusão: A inibição da isoforma MAPK p38 α por LASSBio-1824 representa uma abordagem importante para o tratamento da HAP, uma vez que melhorou processos subjacentes de remodelamento e inflamação no sistema cardiopulmonar.

Palavras-chave: inibidor da MAPK p38 α , hipertensão arterial pulmonar, Su5416 / Hipóxia, proliferação celular, inflamação, hipertrofia do ventrículo direito.

ABSTRACT

Silva Fernandes Grazielle. "A novel p-38 alpha MAPK inhibitor (LASSBio-1824) reverses Su5416/Hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats.". Rio de Janeiro, 2022. Thesis (Doctorate degree in Medicine). Faculty of Medicine and Edson Saad Heart Institute from Federal University of Rio de Janeiro.

Introduction: Pulmonary arterial hypertension (PAH) occurs with increased pulmonary vascular resistance and right ventricle failure. The present work aims to determine the effects of a new inhibitor of p-38 α MAPK (LASSBio-1824) on an animal model of PAH.

Methods: Protocols were approved by the Ethics and Animal Use Committee of Federal University of Rio de Janeiro (# 039/19). In the experimental model of monocrotaline (MCT)-induced PAH, the animals received a single intraperitoneal injection of MCT (60 mg/kg). After two weeks of disease induction, the animals were treated with a vehicle or LASSBio-1824 for 14 days (n = 5 per group). In the hypoxia+Su5416-induced PAH model, the animals were kept in a chamber at 10% oxygen for 3 weeks with weekly intraperitoneal injection of a vascular endothelial growth factor inhibitor- Su5416 (20 mg/kg i.p.). After 3 weeks of hypoxia, treatment with LASSBio-1824 was started for 14 days keeping the animals in a regular environment (n = 5 per group). The following parameters were evaluated: 1. cardiac function and structure using transthoracic echocardiography; 2. systolic pressure of the right ventricle (RVSP) measured through catheterism; 3. vascular reactivity of isolated pulmonary arteries derived from experimental groups; 4. Protein expression in heart and lung.

Results: LASSBio-1824 normalized the flow in the pulmonary arteries of rats with PAH and significantly reversed the increased systolic pressure, hypertrophy and right ventricle dysfunction. LASSBio-1824 reduced remodeling and hypertrophy of the wall of the distal pulmonary vessels, attenuated pulmonary vascular endothelial dysfunction, reduced cardiac fibrosis, and altered the expression of proteins involved in the pathogenesis of PAH in the lung and right ventricle.

Conclusion: The inhibition of p38- α MAPK isoform by LASSBio-1824 represents an important approach for the treatment of PAH, which improves the underlying remodeling and inflammation processes in the cardiopulmonary system.

Keywords: p-38 α MAPK inhibitor, pulmonary arterial hypertension, Su5416/Hypoxia, cell proliferation, inflammation, right ventricle hypertrophy.

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 21 de maio de 2019

Prezada Professora Gisele Zapata-Sudo

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Avaliação de novas estratégias farmacológicas para o tratamento da disfunção cardiopulmonar associada à hipertensão arterial pulmonar em ratos.”**, protocolo nº 039/19, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 30/04/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 31/12/2020
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	360 animais
Peso/idade	160-220g / 10 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Programa de Desenvolvimento de Fármacos do ICB - Interblocos FIG - UFRJ.

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	3
FOLHA DE APROVAÇÃO	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	14
1.0 INTRODUÇÃO	19
1.1.0 Hipertensão Pulmonar	19
1.1.1 Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Pulmonar	21
1.1.2 Alterações cardíacas na HAP	26
1.1.3 Terapêutica atual e suas limitações	29
1.1.4 MAPK p38 α e HAP	35
1.2.0 Modelos de animais de HAP	38
1.2.1 Modelo de HP induzida por monocrotalina (MCT)	38
1.2.2 Modelo de HP induzido por hipóxia crônica	39
1.2.3 <i>Sugen 5416</i> /hipóxia: um modelo de HAP	40
1.3.0 Planejamento e desenvolvimento de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos	42
1.4.0 Justificativa	46
2.0 OBJETIVOS	47
2.1.0 Objetivo Geral	47
2.1.1 Objetivos específicos	47
3.0 METODOLOGIA	48
3.1.0 Local da pesquisa	48
3.1.1 Comitê de ética	48
3.1.2 Substâncias Utilizadas	48
3.1.3 Indução de HAP com monocrotalina (MCT)	49

3.1.4 Animais e desenho experimental hipóxia SU5416	50
3.1.5 Ecocardiografia transtorácica	52
3.1.6 Medida invasiva de parâmetros hemodinâmicos vasculares e intraventriculares	53
3.1.7 Avaliação da reatividade vascular de anéis de artérias pulmonares	54
3.1.8 Retirada e acondicionamento de tecidos	55
3.1.9 Análise morfométrica e imuno-histoquímica de VD e pulmões	55
3.2.0 Expressão de proteínas - análise de Western Blot	57
3.2.1 Análise estatística	58
4.0 RESULTADOS	59
4.1.0 Hemodinâmica cardiovascular e parâmetros funcionais	59
4.1.1 Administração i.p. nos grupos <i>MCT</i> e <i>SuHx</i>	59
4.1.2 Administração oral no grupo <i>SuHx</i>	61
4.1.3 Redução das características funcionais e histopatológicas da HAP pelo LASSBio-1824	64
4.1.4 Redução da sobrecarga e da hipertrofia concêntrica do VD pelo LASSBio-1824	65
4.1.5 Expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular, inflamação e apoptose em amostras de pulmão e VD – técnica de western blot	67
4.1.6 Expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular, inflamação e apoptose em amostras de pulmão - técnica de imunohistoquímica	69
4.1.7 Reversão da fibrose do VD pelo LASSBio-1824	70
5.0 DISCUSSÃO	72
6.0 CONCLUSÃO	82
7.0 REFERÊNCIAS	83
8.0 ANEXO A – Certificados de participação em congressos	105
9.0 ANEXO B - Artigo publicado na revista <i>Pharmaceuticals</i> baseado no estudo desenvolvido durante o doutorado	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática evolutiva das alterações vasculares na HAP

Figura 2a: Representação esquemática da formação de lesões plexiformes

Figura 2b: Representação esquemática remodelamento vascular pulmonar na HAP. Adaptado de Christophe G. et al, 2014

Figura 3: Representação esquemática evolutiva das alterações cardíacas na HAP

Figura 4: Vias moleculares envolvidas no remodelamento do VD na HAP

Figura 5: Principais alvos moleculares para tratamento da HAP aprovados atualmente

Figura 6: Algoritmo de tratamento da HAP

Figura 7: Via de MAPK p38 α , adaptado de Cuadrado et al, 2010

Figura 8: Esquema representativo da estratégia de simplificação molecular

Figura 9: Fármacos inibidores de tirosina cinases

Figura 10: Representação esquemática do desenvolvimento de novos derivados *N*-acilidrazônicos.

Figura 11: Estrutura de (*E*)-*N*-(4-(piridin-2-il) benzilideno)-2-nafto-hidrazida (LASSBio-1824).

Figura 12: Esquema do desenho experimental para o protocolo de HAP induzido por MCT

Figura 13: Esquema do desenho experimental para o protocolo de HAP induzido por SuHx.

Figura 14: Efeitos da terapia com LASSBio-1824 nas alterações vasculares pulmonares e hemodinâmicas observadas em ratos SuHx e MCT

Figura 15: Efeitos do tratamento com veículo ou LASSBio-1824 na estrutura do coração de ratos SuHx e MCT

Figura 16: Curva de peso de ratos com HAP induzidos por SuHx e normoxia tratados com veículo ou LASSBio-1824

Figura 17: Regressão linear entre a relação TAP/TET e dias de protocolo

Figura 18: Efeitos da terapia com LASSBio-1824 nas alterações vasculares pulmonares observadas em ratos SuHx-HAP

Figura 19: Efeitos do tratamento com veículo ou LASSBio-1824 na estrutura e função do coração de ratos SuHx-HAP

Figura 20: Efeitos do modelo SuHx na expressão de proteínas no pulmão ao longo de 35 dias do protocolo e tratamento oral com veículo ou LASSBio-1824 por 14 dias - WB

Figura 21: Efeitos do modelo SuHx na expressão de proteína do coração ao longo de 35 dias de protocolo e tratamento oral com veículo ou LASSBio-1824 por 14 dias - WB

Figura 22: Efeitos do modelo SuHx na expressão de proteína do pulmão ao longo de 35 dias de protocolo e tratamento oral com veículo ou LASSBio-1824 por 14 dias - Imunohistoquímica

Figura 23: Efeitos da terapia com LASSBio-1824 na fração de colágeno, expressão de C-fos e infiltrado inflamatório no coração de animais normoxia e SuHx

Figura 24: Remodelamento vascular pulmonar no modelo SU5416 para HAP, adaptado de Sakao et al, 2011.

Figura 25: Representação esquemática da via de sinalização MAPK p38 α e ação de LASBio-1824.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação clínica de hipertensão pulmonar (HP) de acordo com etiologia. Simmoneau et al, 2018.

Tabela 2: Classificação Funcional (OMS) para Hipertensão Pulmonar. World Health Organization, 1998.

Tabela 3: Função cardíaca e medidas hemodinâmicas ventriculares – Grupo SuHx- 50mg/Kg via oral.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ARE-1	Antagonistas dos receptores da entotelina-1
AP	Artéria pulmonar
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância unidirecional
ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
Akt	Proteína cinase B
α SMA	Anti-alfa-actina do músculo liso
AP-1	Proteína ativadora 1
Bcl-2	Do inglês, B-cell lymphoma 2
BBC	Bloqueadores de canais de cálcio
CE	Célula endotelial
CMLVP	Células musculares lisas vasculares pulmonares
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta
c-NOS	Sintase do óxido nítrico constitutiva, do inglês constitutive nitric oxide synthase
DCVD	Débito cardíaco do ventrículo direito
DCVE	Débito cardíaco do ventrículo esquerdo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECG	Eletrocardiograma
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGF-R	Receptor de EGF

eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial, do inglês, endothelial nitric oxide synthase -
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Proteínas cinases reguladas por estímulos extracelulares, do inglês <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
EUA	Estados Unidos da América
ET-1	Endotelina-1
ET _A	Receptores de endotelina tipo A
ET _B	Receptores de endotelina tipo B
ETT	Ecocardiograma transtorácico
FRS	Fator de resposta sérica
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
H&E	Hematoxilina e eosina
HP	Hipertensão pulmonar
HRP	Peroxidase de rábano silvestre
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IP	Receptores de prostaciclina
IFN-γ	Interferon gama
IKK 2	kappa B cinase
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-β	Interleucina β

i-NOS	Sintase do óxido nítrico induzível, do inglês inducible nitric oxide synthase
i.p.	Intraperitoneal
JNK	do inglês, <i>c-Jun amino-terminal kinase</i>
LASSBio	Laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos, do inglês mitogen-activated protein kinase
MEF	Fator potenciador de miócitos
MCT	Monocrotalina
MKs	Proteínas cinases ativadas por MAPK
NAH	<i>N</i> -acilidrazona
NO	Óxido nítrico
n-NOS	Sintase do óxido nítrico neuronal, do inglês neuronal nitric oxide synthase
NF-κB	Fator nuclear kappa b
PAD	Pressão arterial diastólica
PAPm	Pressão arterial pulmonar média
PDE5	Fosfodiesterase-5
Phe	Fenilefrina
PSR	Picro-Sirius red
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinase, do inglês phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase G
PMO	Proteína morfogênica óssea
RAS	Do inglês, RAt Sarcoma vírus

RAC-1	Substrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada a Ras
ROS	Do inglês, reactive oxygen species
RNA	Ácido ribonucleico
RPMO-2	Receptor de proteína morfogenética óssea-2
RVP	Resistência vascular pulmonar
RTK	Receptores de tirosina cinase de superfície
SERCA2a	Do inglês, Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase
SuHx	SU5416/Hipóxia
Su5416	Inibidor do receptor de VEGF
STAT	do ingles “signal transducer and activators of the transcription”
TAP	Tempo de aceleração da artéria pulmonar
TET	Tempo de ejeção da artéria pulmonar
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF	Fator de necrose tumoral associado ao receptor
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-R	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VE + S	Ventrículo esquerdo + septo interventricular
VD/VE + S	Relação entre o peso do VD e o peso de VE+S
VO	Via oral
VD	Ventrículo direito
VSVE	Volume sistólico do ventrículo esquerdo
VSVD	Volume sistólico do ventrículo direito
WU	Do inglês, wood units

UV

Ultravioleta

1.0 INTRODUÇÃO

1.1.0 Hipertensão Pulmonar

A hipertensão pulmonar (HP) é definida hemodinamicamente por uma pressão arterial pulmonar média (PAPm) > 20 mmHg em repouso. É classificada clinicamente em cinco subgrupos (Tabela 1). A hipertensão arterial pulmonar (HAP), faz parte do subgrupo 1 considerado de maior gravidade. A HAP apresenta também pressão de oclusão da artéria pulmonar $\leq$ 15 mmHg, configurando uma HP do tipo pré-capilar e resistência vascular pulmonar $\geq$ 3 Wood units (WU) (Galiè et al 2018; Simonneau et al 2018).

Tabela 1: Classificação clínica de hipertensão pulmonar (HP) de acordo com etiologia. SIMMONEAU et al, 2018.

Classificação clínica hipertensão pulmonar (HP)
1 Hipertensão arterial pulmonar (HAP) 1.1 HAP idiopática 1.2 HAP hereditária 1.3 HAP induzida por fármacos e toxinas 1.4 HAP associada com: 1.4.1 Doença do tecido conjuntivo 1.4.2 Infecção por HIV 1.4.3 Hipertensão porta 1.4.4 Doença cardíaca congênita 1.4.5 Esquistossomose 1.5 HAP de longo prazo respondente a bloqueadores de canal de cálcio 1.6 HAP com características ostensivas de envolvimento venoso/capilar (doença venooclusiva pulmonar/hemangiomatose capilar pulmonar) 1.7 HP persistente do recém-nascido
2 HP devido a insuficiência ventricular esquerda 2.1 HP devido a insuficiência cardíaca com fração de ejeção de ventrículo esquerdo (FEVE) preservada 2.2 HP devido a insuficiência cardíaca com FEVE reduzida 2.3 Doença nas válvulas cardíacas 2.4 Condições cardiovasculares congênitas/adquiridas levando a HP pós-capilar
3 HP devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia 3.1 Doença pulmonar obstrutiva 3.2 Doença pulmonar restritiva 3.3 Outra doença pulmonar com perfil misto restritivo/obstrutivo (traduzir) 3.4 Hipóxia, sem doença pulmonar 3.5 Doenças pulmonares congênitas
4 HP devido a obstruções arteriais pulmonares 4.1 HP tromboembólica crônica 4.2 Outras obstruções arteriais pulmonares
5 HP com mecanismos incertos e/ou multifatoriais 5.1 Distúrbios hematológicos 5.2 Transtornos sistêmicos e metabólicos 5.3 Outros 5.4 Doença cardíaca congênita complexa

HAP afeta indivíduos independente de idade, gênero ou raça e devido a ampla classificação e múltiplas etiologias, a estimativa precisa da prevalência tem se mostrado um desafio. Entretanto, sabe-se que mulheres são mais

propensas a desenvolver HAP, estudos apontam uma predominância feminina de 65-80%, e curiosamente registros mais recentes sugerem uma idade média de diagnóstico por volta dos 50 anos (McGoon, M. D. et al 2013; MEMON & PARK, 2017; WIJERATNE *et al.*, 2018). A HAP tem afetado cerca de 10% da população idosa no mundo (Hoeper et al, 2016) e 3-10 novos casos por milhão são diagnosticados a cada ano, principalmente em mulheres jovens (Hoeper et al, 2017). Além disso, dados indicam uma prevalência de 15-50 pessoas por milhão/ano na Europa e EUA com HAP (Beshay et al, 2020).

Embora, a esquistossomose seja considerada a causa mais comum de HP em todo o mundo por alguns estudos (Fernandes et al, 2011), em regiões não endêmicas para esquistossomose, como EUA e Europa, mais da metade dos casos diagnosticados são do tipo idiopática e até 10% são do tipo hereditária (McGoon, M. D. et al 2013). Muitos casos estão relacionados a mutação no receptor de proteína morfogenética óssea-2 (RPMO-2), sugerindo que a HAP idiopática possa estar sendo subdiagnosticada em muitas dessas regiões (Newman, J. H. et al 2001; Humbert et al 2006; Badesch, D. B. et al 2010; Zhang, R. et al 2011). Dentre as outras etiologias associadas a HAP, as doenças do tecido conjuntivo e a cardiopatia congênita também são muito comuns, sendo essa última muito incidente principalmente na China (Zhang, R. et al 2011). No Brasil, HAP de causa idiopática, doença do tecido conjuntivo e associada a esquistossomose apresentaram uma prevalência de 28,7%, 25,8% e 19,7%, respectivamente, e aproximadamente 73,9% dos pacientes apresentam uma sobrevida de apenas 3 anos após diagnóstico (Alves et al., 2015).

O aumento da sobrevida na HAP também tem sido um grande desafio. O National Institutes of Health (NIH) realizou um registro de referência que coletou dados de HAP entre 1981 e 1985 (Rich et al, 1987). Esse estudo incluiu HAP de vários subtipos, e identificou a predominância em mulheres (63%) com média de idade de 36 anos. Terapias específicas para HAP não estavam disponíveis no momento, e os participantes do registro tiveram uma sobrevida média de 2,8 anos, e de 34% em 5 anos (Rich et al, 1987). Quase três décadas desde o registro do NIH, com o progresso significativo no campo da fisiopatologia e após uso de terapias direcionadas a HAP, outros estudos apontaram uma melhora da taxa de sobrevida, mas ainda de forma insatisfatória, com grandes variações a depender da localidade e subtipo prevalente. A rede francesa de estudos para

HAP entre (2002-2003) também identificou maior incidência em mulheres (62%), com idade média 52 anos e uma sobrevida 58,2% em 3 anos. Já o REVEAL-EUA (Registry to Evaluate Early and Long-Term Disease), o maior registro a relatar dados de sobrevivência da HAP (2006-2009), apontou uma sobrevida 68% em 5 anos e 49% em 7 anos, também com maior predominância em mulheres (79,5%) com idade média de 53 anos (Benza et al, 2012; Lau et al, 2017; Levine et al, 2021).

1.1.1 Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Pulmonar

A pressão arterial pulmonar média (PAPM) é determinada pela seguinte fórmula: $PAPM = \text{débito cardíaco do ventrículo direito (DCVD)} \times \text{resistência vascular pulmonar (RVP)} + \text{pressão de oclusão alveolar pulmonar}$. A principal causa da HAP é comumente o aumento da resistência vascular pulmonar (RVP). O aumento do DCVD isoladamente não causa HAP significativa, porque o leito vascular pulmonar mantém vasodilatação e recruta vasos em resposta ao aumento do fluxo. Assim como, o aumento da pressão venosa pulmonar (representada pela pressão de oclusão alveolar) isolado não causa HAP. Entretanto, um aumento crônico do fluxo e/ou pressão venosa pulmonar podem aumentar a RVP. A consequência do aumento da RVP, e assim da PAPM é a sobrecarga do ventrículo direito (VD). O coração responde com hipertrofia, que, com a evolução da doença provoca a falência do VD, insuficiência cardíaca, e a morte prematura dos pacientes acometidos (Humbert et al., 2018).

A patogênese da resistência aumentada nos pré-capilares pulmonares em pacientes com HAP é geralmente atribuída aos efeitos combinados entre o remodelamento das paredes das artérias pulmonares e vasoconstricção persistente (Humbert *et al.*, 2004; Rabinovitch, 2007; Chan e Loscalzo, 2008). As artérias pulmonares uma vez apresentando essas alterações, adquirem uma menor área de secção transversa e consequentemente um maior fluxo sanguíneo. A hipertrofia da parede dos vasos pulmonares na HAP é consequente ao remodelamento vascular, caracterizado por um aumento de todos os componentes celulares da parede arterial (células musculares lisas, endotélio, fibroblastos, miofibroblastos, pericitos e infiltração perivascular exacerbada de células pró-inflamatórias - Figura 1) que ocorre nas três camadas

da parede vascular (íntima, média, adventícia) das artérias pulmonares <50 microns, ou seja, localizadas nas pequenas arteríolas musculares pulmonares. (Humbert, et al, 2014; Humbert et al., 2018; Lechartier et al, 2021; Rajagopal et al, 2022).

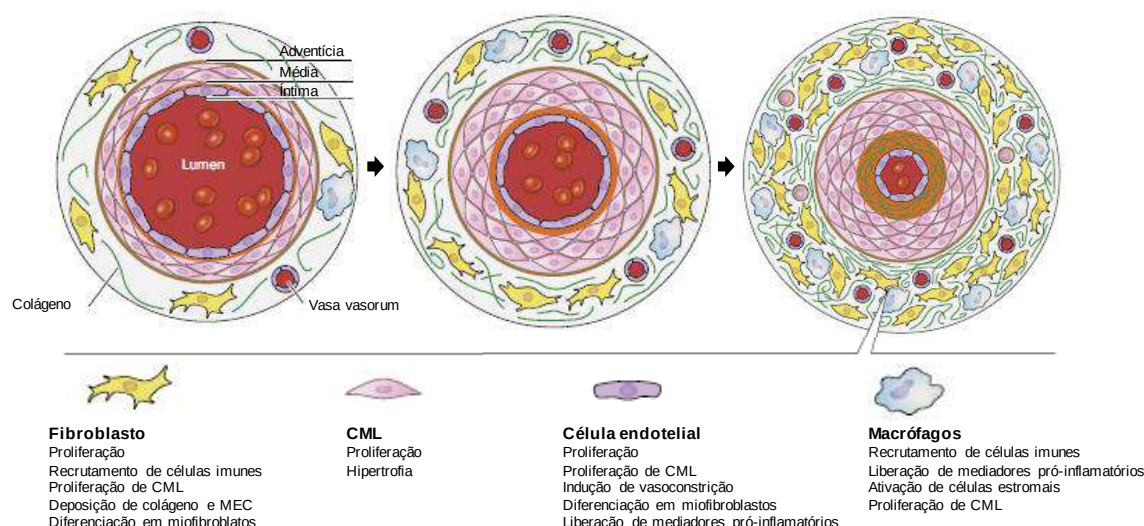


Figura 1: Representação esquemática evolutiva das alterações vasculares na HAP. CML, Células musculares lisas. Adaptado de Pugliese et al, 2015.

A distinção entre HAP de outras formas de HP é a gravidade da arteriopatia. Embora todas as formas de HP apresentem alterações que incluem aumento da espessura nas paredes de pequenas artérias pulmonares, é, indiscutível, a perda do volume intravascular, a principal característica que define o subgrupo HAP, a chamada arteriopatia plexogênica, uma alteração vascular que 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 íntima (Figura 2), 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).

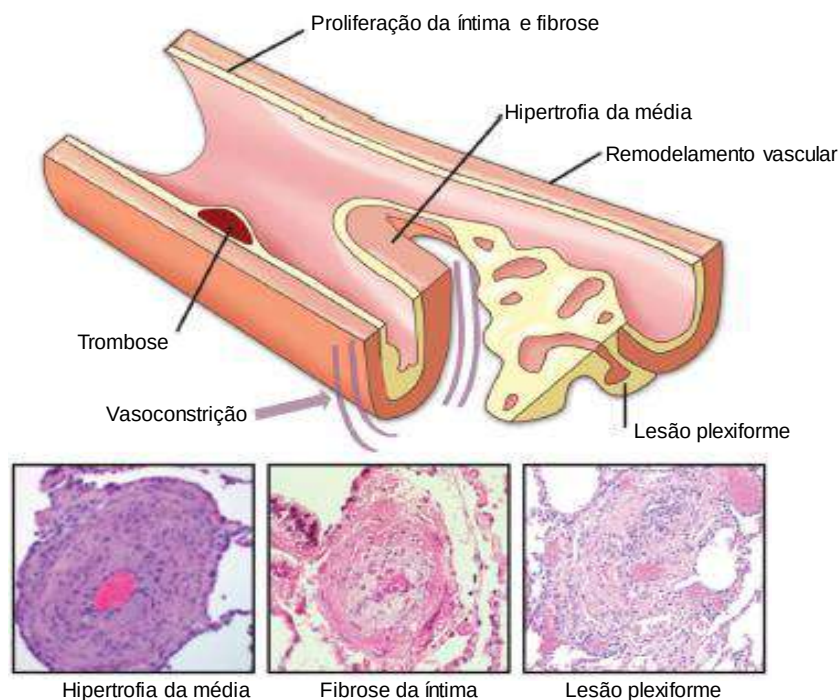


Figura 2a: Representação esquemática da formação de lesões plexiformes. Adaptado de Dasgupta, A. et al, 2014.

Abaixo a classificação baseada na patologia das anormalidades vasculares pulmonares que representa a gravidade crescente da HAP (Heath, D., 1958):

- Grau I e II: são caracterizadas pela muscularização das pequenas arteríolas pulmonares, seguida por hipertrofia medial e hiperplasia da íntima.
- Grau III: são caracterizadas pela substituição colágena das células da íntima, levando a uma aparência de "casca de cebola".
- Grau IV a V, incluem lesões plexiformes sem ou com necrose fibrinóide, respectivamente.

As lesões grau I, II e III são consideradas reversíveis, enquanto as lesões de grau IV e V são irreversíveis e associadas a um prognóstico ruim (Hoffman, J. I., 1981; Egito, E. S., 2003; Yamaki, S., 2004). No entanto, muitos pacientes com resposta positiva à terapia exibem uma queda na RVP sugerindo alguma reversibilidade nas lesões vasculares.

Inicialmente, ocorre alteração da célula endotelial (CE), que influencia diretamente o comportamento celular nas paredes das artérias. A comunicação entre as células é regulada através do contato e liberação de fatores bioativos, tais como fatores parácrinos produzidos pela CE, que influenciam a proliferação

de células como as musculares lisas vasculares pulmonares (CMLVP) e fibroblastos (Sakao et al., 2009). As células endoteliais alteradas liberam também fatores que atraem células inflamatórias para os vasos, tais como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, estimulando um comportamento celular alterado associado a processos de proliferação, apoptose, diferenciação e migração celular (Sakao et al., 2009; Schermuly et al., 2011). A formação e maturação dos vasos sanguíneos pulmonares também é dependente da CE, da mesma forma, a produção e liberação de fatores de crescimento recruta e estabiliza as células vasculares (Hanahan, 1997). Durante a evolução da HAP, ocorre uma desregulação deste processo, a comunicação entre CEs e as células vasculares se altera, ocorre liberação excessiva de fatores de crescimento pelas CEs, que em conjunto irão contribuir gradativamente para o desenvolvimento da HAP (Eddahibi et al., 2006; Guignabert e Dorfmüller, 2013; Guignabert et al., 2015; Corre et al., 2017; Lechartier et al., 2021).

A sobrevivência da CE é regulada, dentre outros fatores pela proteína morfogênica óssea (PMO). Contudo, existe uma mutação no receptor da proteína morfogenética óssea-2 (RPMO-2) das CEs nos pacientes com HAP. Essa mutação tem como consequência, o aumento do processo de apoptose, em resposta a estresse ambiental, lesões principalmente nas artérias pulmonares (APs) distais e consequentemente disfunção endotelial (Teichert-Kuliszewska et al., 2006). Com o início desse processo apoptótico, ocorre obliteração de vasos em consequência à degeneração da estrutura das CEs, podendo ser esse um mecanismo inicial da HAP (Zhao et al., 2005). Além disso, numa fase posterior ocorre a proliferação excessiva levando a formação de lesões plexiformes devido a resistência de CEs a apoptose (Cool et al., 1999; Voelkel et al., 2002; Dasgupta, A. et al., 2014; St Croix e Steinhorn, 2016). Não se conhece o indutor da alteração das CEs, mas alguns eventos como estresse de cisalhamento, inflamação local, predisposição genética, toxinas e espécies reativas de oxigênio, possam ser importantes fatores deflagradores da disfunção endotelial (Amabile et al., 2013).

Os fibroblastos também são muito importantes para a patogênese da HAP, uma vez que respondem a liberação de fatores quimioatrativos liberados pelas células endoteliais alteradas. Essas células migram da adventícia para o interior dos vasos e entram em intenso processo de proliferação e produção de

mitógenos, que também recrutam células adjacentes a proliferar (Sakao et al., 2009). Isso leva à formação da camada neointima e transformação dos fibroblastos em outros tipos celulares, incluindo miofibroblastos, um tipo de CMLVP anormal que contribui para a muscularização dos vasos distais (Sisbarro et al., 2005; Sakao et al., 2009; Church et al, 2015; Lechartier et al, 2021; Rajagopal et al, 2022).

O remodelamento vascular se inicia nas CMLVP localizadas na camada medial das AP distais, com proliferação em resposta à sinalização de fatores de crescimento, incluindo mitógenos e quimioatraentes, que se ligam e ativam receptores de tirosina quinase de superfície (RTKs) (Schermy et al., 2011; Guignabert e Dorfmueller, 2013). Além do estímulo gerado pelas CE alteradas, a serotonina atua sobre as CMLVP, e contribui para a hiperplasia dessas células na HAP (Eddahibi et al., 2006). Ocorre intensa hipertrofia e hiperplasia medial, secundária a comunicação anormal entre as células, que favorece a vasoconstrição das APs. Ocorre um desequilíbrio na produção de atores vasodilatadores derivados do endotélio (óxido nítrico (NO) e prostaciclina) e fatores vasoconstritores (endotelina-1, serotonina e angiotensina II), sendo mais um fator que contribui para a patogênese e gravidade da HAP. (Guignabert et al., 2015; Lechartier et al, 2021).

O processo inflamatório também é importante durante a evolução da HAP (Schermy et al., 2011), porque um infiltrado inflamatório composto por linfócitos T e B, mastócitos, células dendríticas e macrófagos, se dirigem para os vasos. Ocorre aumento nos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucinas e interferon-gama, assim como de outros marcadores de inflamação (Schermy et al., 2011). Logo, a reversão das lesões vasculares na HAP deve basear-se não somente no efeito antiproliferativo, vasodilatador mas também na atividade anti-inflamatória (Schermy et al., 2011).

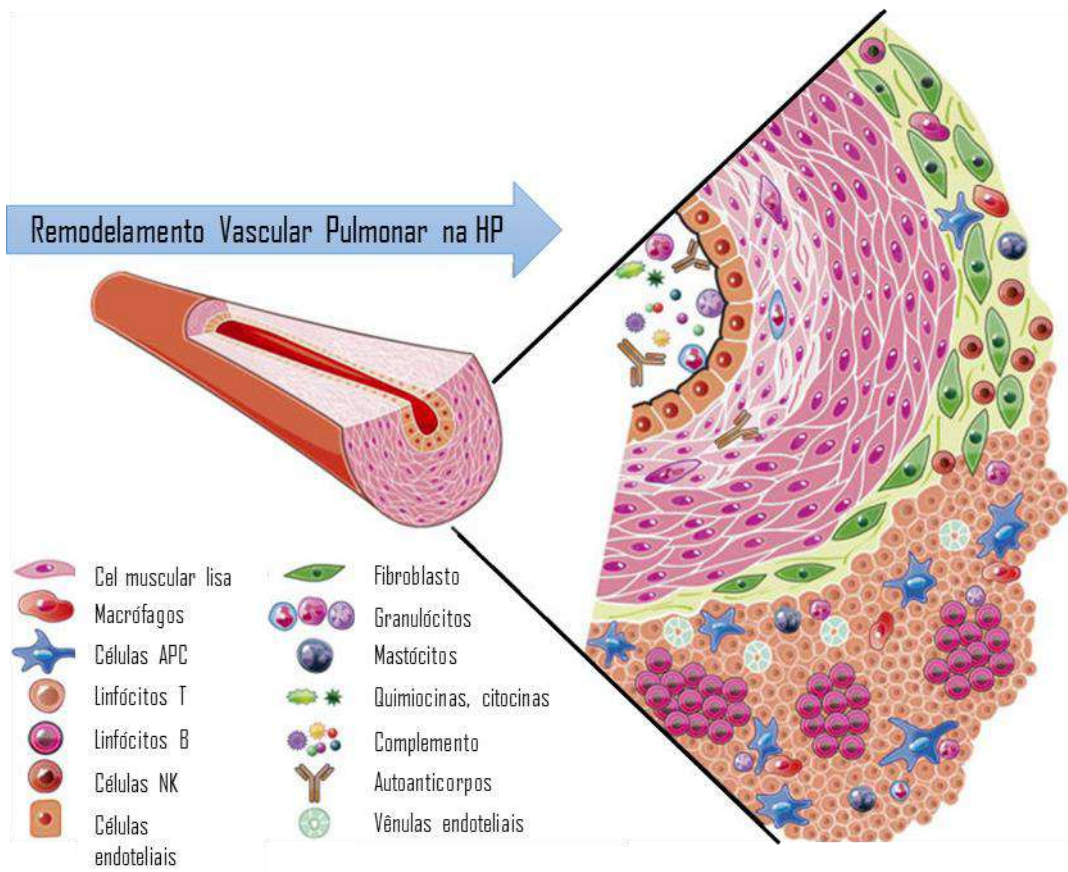


Figura 2b: Representação esquemática remodelamento vascular pulmonar na HAP. Adaptado de Christophe G. et al, 2014

Por fim, a ação dos fatores de crescimento, mitógenos e quimioatraentes ocorre a partir da ligação aos receptores de tirosina quinases (RTKs), resultando em multifosforilação de resíduos de tirosina (Lemmon e Schlessinger, 2010). Em sequência, pode surgir a ativação de algumas vias de sinalização como do fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), proteína quinase C (PKC), proteína quinase B (Akt), Janus quinase (JAK), sinal transdutor e ativador da transcrição (STAT) e em especial as proteínas cinases ativadas por mitógenos - Ras/Raf, MAPK p38, ERK - (Lemmon e Schlessinger, 2010). Quando ativadas, essas vias iniciarão a produção de proteínas que serão fundamentais na patogênese da HAP (Shafiq et al, 2021; Weiss et al, 2021).

1.1.2 Alterações cardíacas na HAP

A obliteração do lúmen vascular devido à vasoconstrição e proliferação celular leva ao aumento da RVP e assim da pós-carga do VD (Figura 3). O

aumento da pós-carga causa estresse sobre a parede do VD, que passa a ejetar o sangue para ser oxigenado contra uma resistência maior. Com isso, o músculo cardíaco inicia um complexo processo de adaptação e hipertrofia, que dependerá não somente da gravidade da doença pulmonar, mas também de interação neuro-humoral, da perfusão coronariana, determinantes genéticos e metabolismo cardíaco (Bogaard, H. J., 2009; Nagendran, J., 2009).

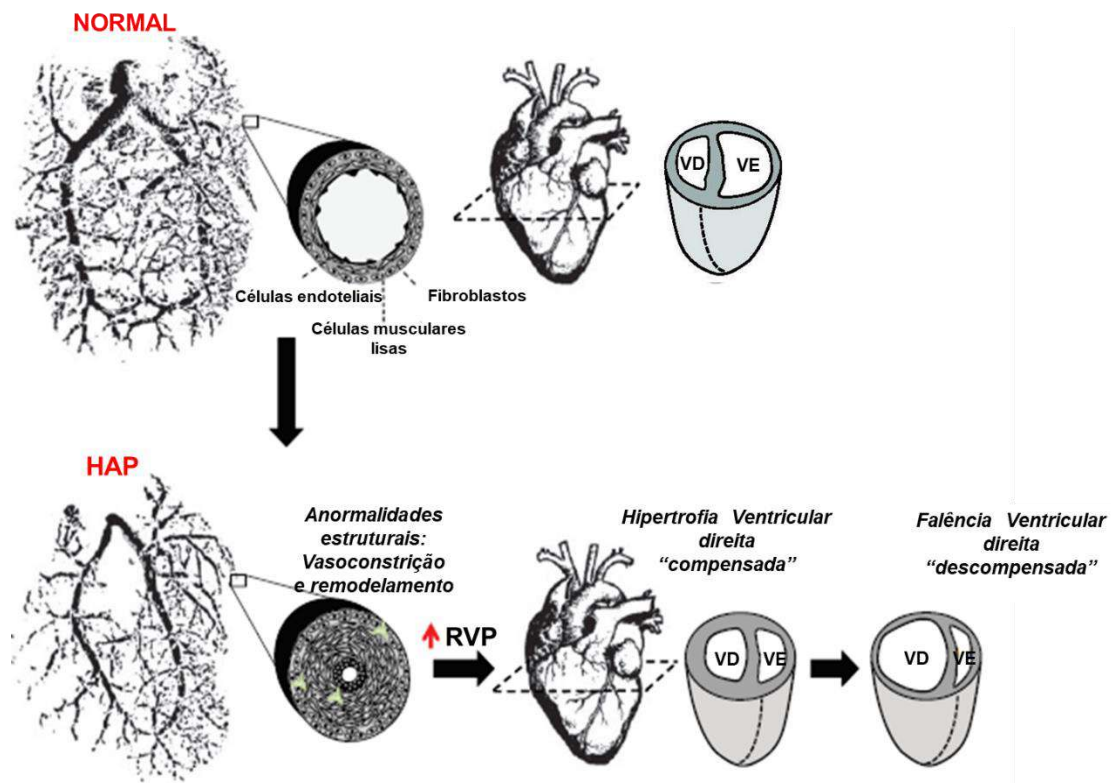


Figura 3: Representação esquemática evolutiva das alterações cardíacas na HAP. A obliteração do lúmen vascular devido a vasoconstrição e proliferação de células vasculares aumentam a RVP, resultando em adaptação do VD. A compensação inicial é seguida por uma dilatação progressiva e irreversível do VD, levando à insuficiência ventricular direita. Adaptado de Boucherat et al. 2017.

O remodelamento miocárdico envolve, não somente hipertrofia de fibras miocárdicas, mas também remodelamento da matriz e alterações de contratilidade. Após iniciado o estresse sobre a parede do VD, dois padrões de remodelamento ventricular podem ocorrer; o adaptativo caracterizado por hipertrofia mais concêntrica com função sistólica e diastólica preservadas e o mal adaptativo associado a hipertrofia excêntrica e pior função sistólica e diastólica (Chung, L., 2010; Campo, A., 2010). Também contribui para o remodelamento mal adaptativo, o aumento de espécies reativas de oxigênio,

ativação de vias apoptóticas, inflamação com recrutamento de fibroblastos, linfócitos, macrófagos e ativação neuro-humoral de vias adrenérgicas e angiotensina para o tecido cardíaco (Figura 4 - Wrigley et al, 2011).

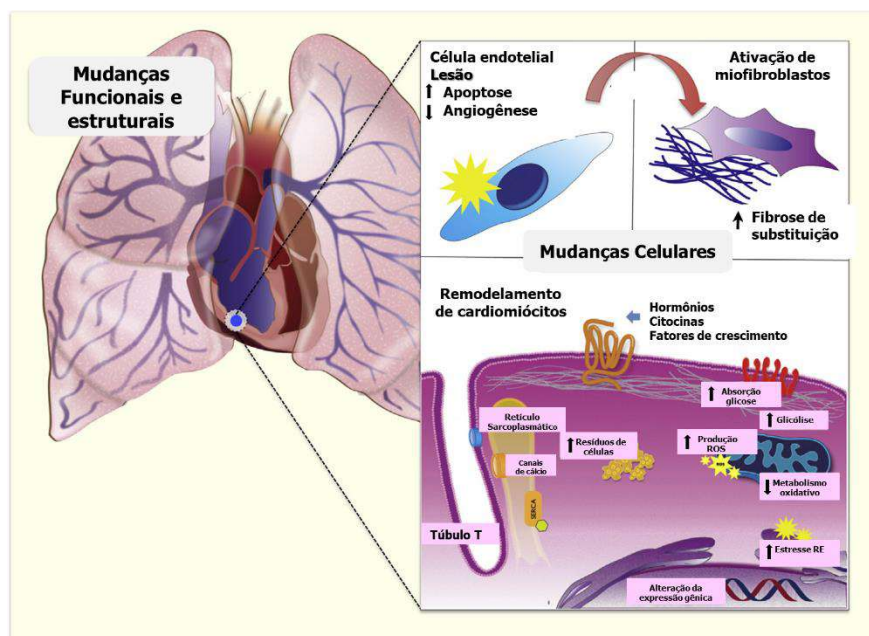


Figura 4: Vias moleculares envolvidas no remodelamento do VD na HAP. Ocorre aumento da produção de espécies pró-inflamatórias tais como; TNF-alfa, citocinas, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), diminuição do metabolismo oxidativo, além de maior estresse sobre o retículo endotelial, adaptado de Anton Vonk-Noordegraaf et al, 2013.

Na HAP, os miócitos sobre estresse aumentam seu tempo de contração, causando dissincronia ventricular direita-esquerda que aumenta com a falência progressiva do VD (Helderman, F. 2011). Além disso, a alteração ventricular ocorre muito mais precocemente no curso da HAP em comparação com a sobrecarga de pressão que ocorre, por exemplo, na hipertensão sistêmica ou estenose aórtica. Isso ocorre porque o estresse sobre a parede do VD é comparativamente maior para o aumento de pressão por causa da menor espessura de sua parede (McCann, G. P., 2007).

Embora todas as formas de HP possam contribuir para a alta morbidade e mortalidade entre os pacientes, a HAP é a forma da doença mais severa, progressiva e com maiores chances de levar à insuficiência ventricular direita (Chin et al, 2005; Hemnes et al, 2008; Humbert, 2009). Assim, quando um paciente é diagnosticado com HAP, a sua avaliação deve incluir uma série de

parâmetros clínicos definidos; tais como hipertensão pré-capilar pulmonar, arteriopatia pulmonar hipertensiva (usualmente com lesões endoteliais plexiformes), e evolução clínica lenta (Stenmark et al, 2009).

1.1.3 Terapêutica atual e suas limitações

A HAP é uma doença que não tem cura, mas a terapia vem evoluindo nos últimos anos. Atualmente, o esquema terapêutico inclui 4 classes de medicamentos com ação predominantemente vasodilatadora: estimuladores da produção de NO (ativadores da guanilato ciclase e inibidores da PDE5), antagonistas dos receptores da endotelina-1 (ARE-1), análogos das prostaciclina (APGI2s) ou agonista do receptor da prostaciclina e raramente, bloqueadores de canais de cálcio (BCC) (Anton Vonk-Noordegraaf et al, 2013; Simonneau et al, 2018). (Figura 5).

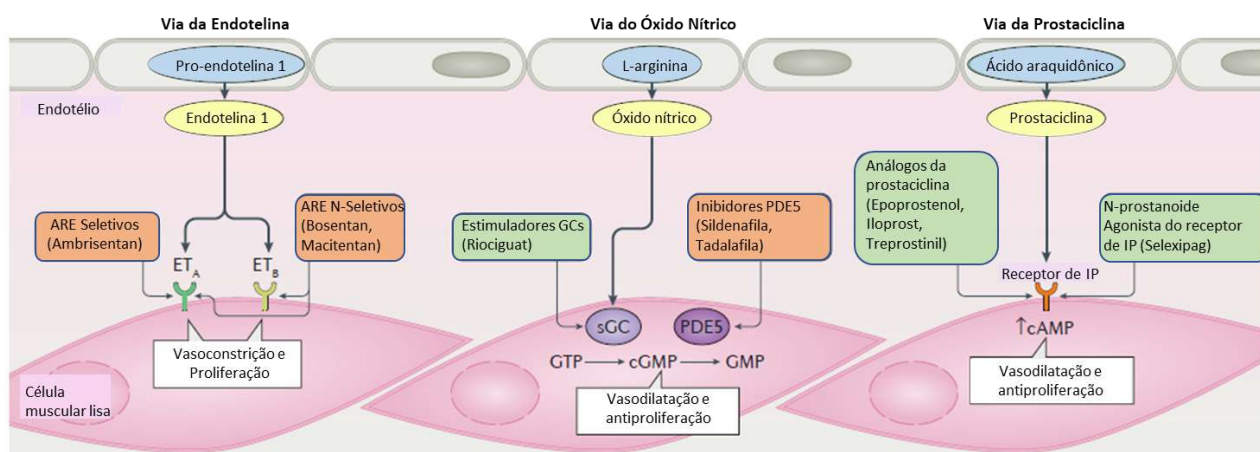


Figura 5: Principais alvos moleculares para tratamento da HAP aprovados atualmente. ARE (antagonista do receptor de endotelina); GCs (Guanilato ciclase); PDE5 (fosfodiesterase-5), ET_A (receptores de endotelina tipo A); ET_B (receptores de endotelina tipo B). IP (receptores de prostaciclina). Adaptação de Lau et al, 2017.

Antes de iniciar o tratamento, deve-se determinar a estratificação de risco e a definição da classificação funcional do paciente. A estratificação será importante também para acompanhar a progressão da doença e a resposta do paciente à terapia. A estratégia é escolher o agente medicamento de acordo com o teste de vasoreatividade e a classificação funcional da OMS. (Tabela 2) (Simonneau et al, 2018).

Classe	Classificação Funcional (OMS) para Hipertensão Pulmonar
I	Pacientes com HP, mas sem limitações nas atividades físicas. A atividade física leve não causa fadiga excessiva ou dispnéia, dor torácica ou síncope cardíaca.
II	Pacientes com HP resultando em limitação leve das atividades físicas. Esses pacientes permanecem confortáveis em repouso, mas atividades físicas habituais resultam em fadiga excessiva ou dispnéia, dor torácica ou síncope cardíaca.
III	Pacientes com HP resultando em acentuada limitação das atividades físicas. Esses pacientes permanecem confortáveis em repouso, mas esforços menores que atividades físicas habituais causam fadiga excessiva ou dispnéia, dor torácica ou síncope cardíaca.
IV	Pacientes com HP, resultando em incapacidade de realizar qualquer atividade física sem sintomas. Esses pacientes manifestam sinais de insuficiência cardíaca direita. Dispnéia e/ou fadiga podem estar presentes mesmo em repouso. O desconforto é aumentado pela atividade física.

Tabela 2 - Classificação Funcional (OMS) para Hipertensão Pulmonar. World Health Organization, 1998.

Os pacientes com HAP apresentam inicialmente sintomas inespecíficos como dispneia, fadiga a esforços, fraqueza, tonteira, porém ao longo do tempo desenvolvem sinais e sintomas decorrentes da insuficiência cardíaca progressiva, como dor torácica por esforço ou síncope, pressão venosa jugular elevada, sopros do lado direito, edema em membros inferiores, ascite e derrame pleural (Frost et al, 2018).

O diagnóstico é muitas vezes tardio, porque os sintomas são associados incorretamente a outras condições médicas coexistentes, e inicialmente não limitam as atividades de vida diária, levando o paciente a procurar ajuda tardiamente. Na suspeita de HAP, o exame de escolha inicial é o ecocardiograma transtorácico (ETT), e somente quando a suspeita clínica para HAP for elevada diante da normalidade do ETT, indica-se o cateterismo cardíaco direito (Bossone et al, 2002).

Uma vez feito o diagnóstico de HAP, o paciente deve receber terapia de suporte (oxigenoterapia, anticoagulação, diuréticos, fisioterapia, dentre outros) e deve ser encaminhado para teste de vasoreatividade (Figura 6). Deve-se identificar os responsivos a terapia com bloqueadores de canal de cálcio (BCC), que inclui pacientes com HAP idiopática, hereditária, induzidas por drogas ou toxinas (Simonneau et al, 2018). Pacientes com HAP associada a outras comorbidades raramente são vasoreativos, por isso o teste não é indicado de rotina. Além disso, esse teste é contraindicado em caso de pressão arterial sistêmica (PAS) < 90 mmHg, baixo índice cardíaco <2 L/min/m², histórico de

doença cardiovascular ou presença de sintomas graves (classe funcional IV). Os medicamentos comumente usados para o teste de vasoreatividade incluem NO inalado, epoprostenol, adenosina e iloprost inalado (Morales-Blanhir, J., 2004; Simonneau et al, 2018). E o teste é considerado positivo se houver uma redução de pelo menos 10 mmHg na PAPM (Mclaughlin et al., 2005).

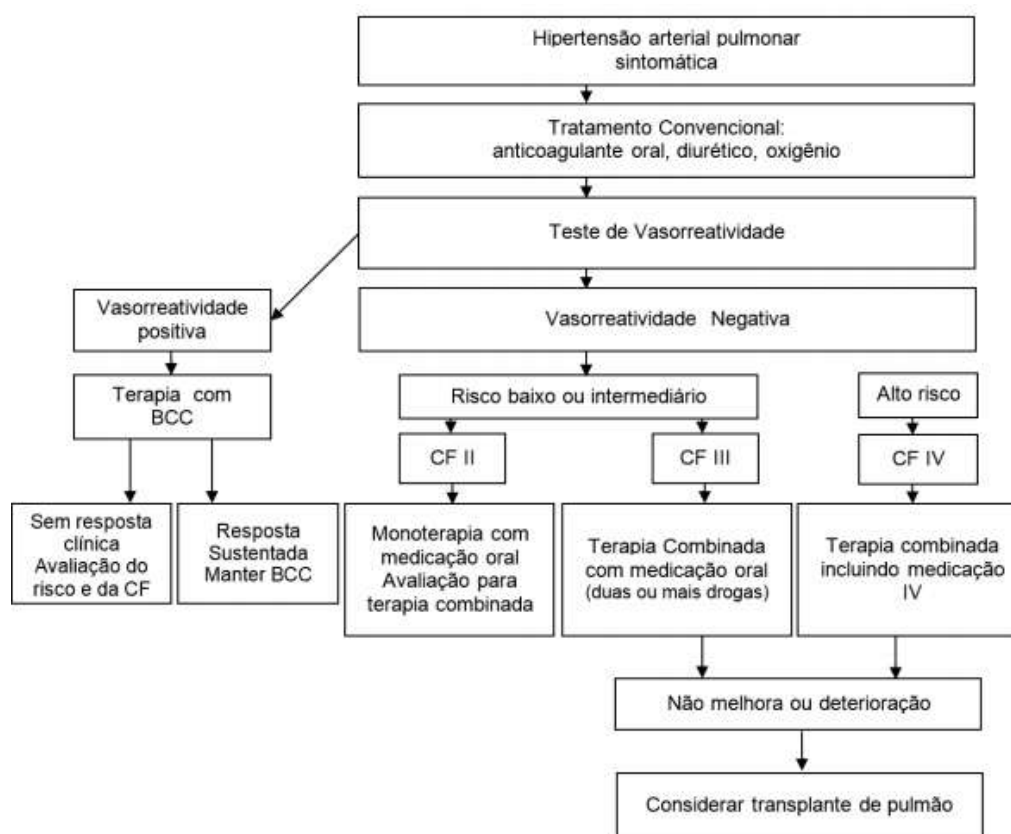


Figura 6: Algoritmo de tratamento da HAP. Adaptado de Rich S et al, 1998; Galiè et al, 2016

Somente pacientes com positividade nesse teste devem ser candidatos a terapia com BCC, uma vez que essa terapia pode levar a efeitos colaterais graves. O mecanismo de ação dos BCCs envolve a redução do influxo de cálcio, impedindo a ligação calcio-calmodulina, e assim a contração do músculo liso, causando uma vasodilatação arteriolar. Os BCCs mais comumente usados são o nifedipino, diltiazem e anlodipino. Contudo, a ausência de estudos randomizados comparando a terapia com BCC e placebo em pacientes vasoativos limita o conhecimento dessa classe em termos de sobrevida. Além disso, é comum efeitos adversos relacionados às propriedades vasodilatadoras sistêmicas dos BCCs, como hipotensão arterial sistêmica, edema periférico

(Palevsky, H. I., 1990), piora da função do VD devido ao seu efeito inotrópico negativo (Packer, M., 1984).

Nos pacientes não vasoreativos ou que falharam na terapia com BCC, geralmente é usada a classificação funcional da OMS, assim como fatores adicionais tais como custo, rotina do paciente, comorbidades e ou potencial interação com outros medicamentos. Os pacientes classe funcional I e II são geralmente tratados em monoterapia, já paciente classe funcional III e IV é indicado a terapia combinada (Galiè et al, 2016)

Para os pacientes não vasoreativos uma opção são os antagonistas dos receptores da endotelina-1 (ARE-1), que incluem; o ambrisentan, antagonista seletivo dos receptores de endotelina tipo A, ET_A, e os agentes não seletivos, bosentan e macitentan que agem tanto em receptores ET_A e ET_B.

A endotelina-1 (ET-1) é um potente vasoconstritor e mitógeno do músculo liso. Através de sua ação sobre receptores presentes nas células musculares lisas (ET_A e ET_B) a ET-1 leva a um rápido aumento do cálcio intracelular e consequente contração (Humbert et al., 2004). Além disso, os receptores A e B são substâncias vasoconstritoras e que induzem a proliferação celular. Existem fortes evidências de que a ET-1 é um importante mediador da vasoconstrição durante a HAP, pois os seus níveis encontram-se acentuadamente aumentados na doença. (Humbert et al., 2004). Assim sendo, ao antagonizar esses receptores haverá um efeito vasodilatador e antiproliferativo (Lau et al, 2017). O bosentan foi o primeiro antagonista do receptor da endotelina aprovado para tratamento da HAP (Rubin et al 2002). E seu uso em pacientes com HAP apontam uma melhora da classe funcional dos pacientes, da tolerância ao exercício, redução da PAPM e RVP (Channick et al., 2001; Rubin et al., 2002; Sitbon et al., 2003; McLaughlin et al, 2005). Contudo, esse fármaco está associado a importantes alterações na função hepática, como aumento dos níveis de aminotransferases e hepatite aguda, que podem ocorrer em até 10% dos pacientes, necessitando por isso, de monitoração contínua da função hepática (Humbert et al., 2004). O ambrisentan embora seletivo para o receptor ET_A, em ensaios com monoterapia não mostrou diferença na eficácia como resultado da seletividade em relação ao bosentan (Humbert et al, 2014). O último ARE-1 a ser aprovado para o tratamento da HAP foi o macitentan e como o bosentan tem como alvo os receptores ET_A e ET_B. Sua estrutura química é uma

modificação da estrutura do bosentan, o que permite alta lipofilicidade e afinidade prolongada ao receptor (Iglarz, M. et al., 2008). Um estudo em fase III mostrou que pacientes tratados com macitentan apresentaram função hepática semelhante aos que tinham placebo, porém, com maior incidência de anemia (Pulido, T. et al., 2013). Portanto, embora com importantes efeitos sobre aspectos fisiopatológicos da HAP, como vasodilatação e ação antiproliferativa, além da facilidade de administração oral, os ARE-1 em geral apresentam efeitos adversos importantes como hepatotoxicidade, anemia, nasofaringite e teratogenicidade (Lau et al., 2017).

Outra classe também utilizada no tratamento da HAP são os análogos da prostaciclina (PGI₂). A PGI₂ pode ser sintetizada no endotélio da vasculatura pulmonar a partir do ácido araquidônico via prostaciclina sintase e atua através da ativação de um receptor específico (IPGI₂) acoplado a uma proteína G estimulatória, G_s (Gomberg-Maitland, M., & Olschewski, H., 2008). Assim, haverá aumento nos níveis intracelulares de AMPc e consequente vasodilatação. (Coleman, R. A., 1994). As prostaciclinas também tem ação antiproliferativa, antiplaquetária, e efeitos imunomoduladores (Gomberg-Maitland, M., & Olschewski, H., 2008). Dentre os análogos da prostaciclina, o epoprostenol foi o primeiro aprovado para tratamento da HAP e é a única terapia da classe em que foi demonstrado melhora da sobrevida em 12 semanas em pacientes com HAP grave (Barst, R. J. et al., 1996). Porém, esse medicamento só pode ser administrado via acesso venoso central com infusão contínua devido à sua meia-vida curta (aproximadamente 2-3 minutos) e propriedades farmacocinéticas. Sua terapia é complexa e requer treinamento do paciente, suporte de enfermagem e médico (Sitbon et al., 2014). O treprostinil é outro análogo das PGI₂ que pode ser administrado por via intravenosa ou subcutânea, suas vantagens em relação ao epoprostenol seria a administração subcutânea e meia vida mais longa. Mas, assim como o epoprostenol apresenta efeitos adversos consideráveis como dor mandibular, diarreia, artralgias e outros graves efeitos relacionados ao modo de administração como trombose e infecção (Kitterman et al, 2012; Barnes et al, 2017). O iloprost inalado é outro análogo da prostaciclina, que apresenta vantagens teóricas por atingir especificamente a vasculatura pulmonar e não requer administração intravenosa, mas sua principal desvantagem é a

necessidade de administração frequente, seis a nove vezes por dia (Barnes et al, 2017).

O selexipag é um agonista do receptor de prostaciclina de uso oral, seletivo do receptor IP de prostaciclina não prostanóide que causa vasodilatação do leito vascular pulmonar e pode ajudar pacientes com HAP que possuem classe funcional II e III (Sitbon et al, 2015). Apresenta a vantagem do uso oral cuja tolerabilidade é melhor quando associado com alimentos. Além disso, o selexipag possui alta seletividade para o receptor IP em relação a outros receptores prostanóides, o que também o diferencia dos demais fármacos dessa classe (Kuwano et al, 2008). Porém, o tratamento pode levar a reações adversas importantes em mais de 10% dos pacientes, como cefaleia, rubor, alterações dermatológicas, dor mandibular, mialgia, diarreia, náusea e vômito (Sitbon et al, 2015). Seu uso deve ser interrompido na presença de edema pulmonar e alterações hepáticas, e por isso os pacientes devem ter a função hepática monitorada continuamente (Galie et al, 2013; Kaufmann et al, 2015).

Por fim, os estimuladores da guanilato ciclase (GC) são agentes que aprimoram a produção ou a função do óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador. A síntese do NO provém da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalizada pela enzima NO-sintase (NOS) (Humbert et al., 2004). As isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), NOS neuronal (n-NOS), NOS endotelial (e-NOS), que dependente de íons cálcio e de calmodulina, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. (Humbert et al., 2004). A GC é uma enzima liase que em resposta a níveis de cálcio converte o trifosfato de guanosina em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e difosfato, que faz parte da cascata de sinalização da proteína G ativada pelos níveis de cálcio. O GMPc controla canais de cálcio mantendo-os aberto, permitindo a entrada de cálcio na célula.

O riociguat é um estimulador oral da GC promovendo benefício em pacientes HAP tipo I (Wardle et al, 2016). Contudo, embora o riociguat tenha apresentado um perfil de segurança favorável e fora bem tolerado, apresentou síncope como efeito colateral e algumas vezes hemoptise por hemorragia pulmonar (Wardle et al, 2016).

A fosfodiesterase 5 (PDE5) atua na degradação do GMPc, logo, a inibição da PDE5 aumenta a disponibilidade de GMPc causando vasodilatação. O inibidor da PDE5, sildenafil avaliado nos estudos SUPER-1 e SUPER-2 demonstrou melhora na capacidade ao exercício e classe funcional da OMS em 46% e 29% dos pacientes, respectivamente, porém a taxa de sobrevivência estimada em três anos foi de 79% (Galie et al, 2005; Rubin et al, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados com o uso do tadalafil, como melhora ao exercício, mas seu efeito sobre a mortalidade não foi adequadamente avaliado (Galie et al, 2009). Além disso, os inibidores de PDE5 apresentam reações adversas constantes, como cefaleia, distúrbios gastrointestinais, dores musculares e articulares e infecções respiratórias em mais de 10% dos pacientes.

Por tanto, apesar de alguns desses fármacos prolongarem a sobrevivência de pacientes com HAP, a história natural da doença não é alterada, justificando a grande morbimortalidade (LAJOIE *et al.*, 2016), e a necessidade da busca por novas vias de tratamento frente as limitações importantes apresentadas pela atual terapia direcionada a HAP.

1.1.4 MAPK P38 α e HAP

As vias de sinalização dependem de modificação de proteínas; seja por meio da transcrição, tradução e fosforilação de moléculas. Um dos mecanismos de sinalização celular envolvidos na fisiopatologia da HAP é a via de MAPK p38 α , proteína cinase ativada por mitógeno (Church et al, 2015; Yan, S. et al, 2016; Zarubin et al, 2005).

Proteínas MAPK (do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) é uma família de serina/treonina cinases (Hanks, Quinn et al. 1988) que levam a fosforilação do grupo OH de aminoácidos serina ou treonina (cujas cadeias laterais são semelhantes). Estas enzimas transferem fosfatos aos átomos de oxigênio dessas cadeias e esse processo é chamado de fosforilação. Assim, os substratos das serina treonina cinases são sempre o ATP e uma proteína, e os produtos são ADP e uma fosfoproteína.

As MAPKs são enzimas mediadoras de sinais em resposta a estímulos externos que desencadeiam mecanismos fisiopatológicos em diversas doenças,

modulando ativação do sistema imune, inflamação, proteção contra o estresse oxidativo, transcrição gênica, diferenciação, sobrevivência, apoptose, proliferação celular, e metabolismo energético (Hanks, Quinn et al. 1988; Seger and Krebs 1995; Burton et al, 2021; Canovas et al, 2021). As vias de sinalização MAPK são evolutivamente conservadas entre eucariotos e, de acordo com a similaridade no nível da sequência primária de aminoácidos e o modo de ativação, membros da família MAPK são divididos em três subfamílias: ERK (do inglês, *extracellular-signal-regulated kinase*); JNK (do inglês, *c-Jun amino-terminal kinase*) e p38 (Hanks and Hunter 1995; Bogoyevitch e Court, 2004).

A subfamília MAPK p38 é composta por um grupo de 4 proteínas (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ), que guardam entre si 60% de identidade na sua sequência de aminoácidos, os quatro grupos são codificados por genes diferentes e tem diferentes expressões teciduais. (Hanks and Hunter 1995). A p38 α é ubiquamente expressa na maioria das células, enquanto as outras parecem ser expressas de uma maneira mais específica nos tecidos; p38 β no cérebro, p38 γ no músculo esquelético e p38 δ nas glândulas endócrinas (Cuenda et al, 2007).

Estímulos externos como fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, hipóxia, estresse ambiental e LPS, desencadeiam a fosforilação em cascata de moléculas envolvidas na ativação da sinalização MAPK p38 (Nebreda and Porras 2000). Evidências apontam que MAPK p38 quando ativada transloca-se do citoplasma para o núcleo e pode fosforilar cinase ativada por estresse e mitógenos (MSK 1/2) que ativa diretamente fatores de transcrição como CREB, ATF1, a isoforma NF- κ B, e STAT 1/3, mas também pode fosforilar as proteínas nucleossômicas histona H3 (Soloaga et al, 2003; Arthur et al, 2008). MAPK p38 α também fosforila MK2 e MK3 que participam do controle da expressão gênica principalmente no nível pós-transcricional, fosforilando fatores de transcrição como o fator de resposta sérica (FRS), que constitui fator de transcrição para AP-1 responsável pela expressão de c-fos, que desempenha um papel importante na expressão de genes envolvidos no reparo do DNA, proliferação celular, parada do ciclo celular, morte por apoptose e remodelamento da matriz extracelular (Shi et al, 2002; Roux et al, 2004; Tanos et al, 2005; Whitaker et al, 2021) (Figura 7).

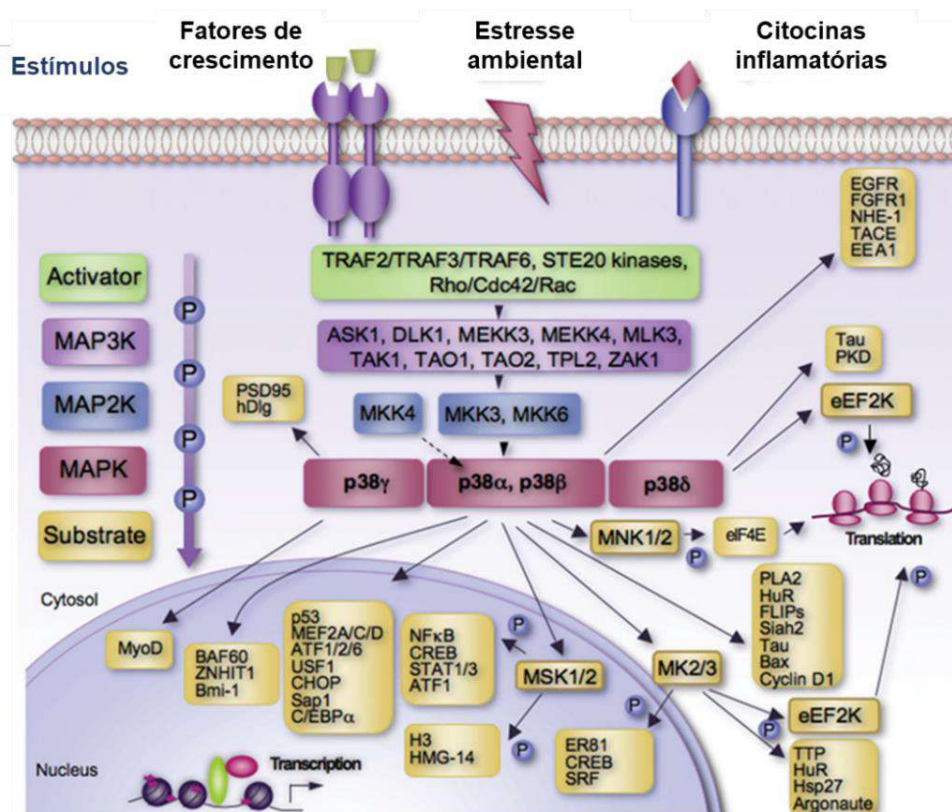


Figura 7: Via de MAPK p38, adaptado de Cuadrado et al, 2010.

Existe relação entre a via MAPK p38α e a inflamação. Diversas doenças como artrite reumatoide, doença de Alzheimer e doença inflamatória intestinal, tem seus mecanismos inflamatórios descritos em parte pela via MAPK p38α (Hollenbach et al, 2004). A ativação de MAPK p38α está implicada no aumento da produção de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral (TNF)-α, óxido nítrico sintase (iNOS), interleucina-1β (IL-1β) e interleucina-6 (IL-6) diretamente relacionados ao processo inflamatório e proliferativo na HAP (Jin et al, 2014; Patel et al 2017). Além disso, MAPK p38α também regula a apoptose celular mediada por caspases (Whitaker et al, 2021; Burton et al, 2021; Canovas et al, 2021) uma importante condição envolvida na remodelação vascular durante a HP.

A ativação da via MAPK p38α está implicada no processo de disfunção ventricular que ocorre na HAP, porque em cardiomiócitos hipertrofiados, p38α e p38β, tem seus níveis aumentados, levando há uma maior organização dos sarcômeros e aumento do peptídeo atrial natriurético (Yan, S. et al, 2016). A nível nuclear MAPK p38α fosforila fatores de transcrição relacionados diretamente ao processo hipertrófico como p53 envolvido em processos de apoptose e os

fatores de transcrição MEF2A, MEF2C e MEF2D relacionados com hipertrofia cardíaca na HAP (Cuadrado et al, 2010). Além disso, foi demonstrado que a inibição de MAPK p38 melhora hipertrofia e disfunção do VD em resposta a sobrecarga de pressão (Kojonazarov et al, 2017). Portanto, MAPK p38 α está envolvida em diversos aspectos da patogênese da HAP, como a inflamação, a hipertrofia, a proliferação celular, sendo um alvo promissor para a HAP.

1.2.0 Modelos de animais de HAP

1.2.1 Modelo de HP induzida por monocrotalina (MCT)

A MCT é um alcalóide presente na *Crotalaria spectabilis*, que produz lesão endotelial nas artérias pulmonares (Thomas et al, 1998). Essa lesão leva a um remodelamento da parede dos vasos, maior resistência vascular pulmonar, e consequente HP com hipertrofia ventricular direita. A administração de MCT resulta no desenvolvimento progressivo de HP em várias espécies de animais e foi descrito primeiramente após a administração oral em ratos (Kay et al., 1967). MCT provoca injúria vascular. 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. Infelizmente, as respostas à MCT variam significativamente entre espécies e linhagens devido ao seu metabolismo hepático pelo citocromo P450. O mecanismo pelo qual a MCT induz a HP ainda é duvidoso mas sugere-se que MCT cause injúria endotelial direta que desencadeia no surgimento e progressão de HP severa e eventualmente letal (Jasmin et al., 2001). Alguns estudos 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). Além disso, observou-se modificações em veias, aumentando os questionamentos sobre esse protocolo como modelo de HAP (Meyrick e Reid,

1982; Wilson, D. M. et al., 1989). Como fator negativo pode-se mencionar a injúria hepática e renal induzidas pelo MCT por produzir veno-oclusão hepática (Roth et al., 1981; Chan et al., 2008).

Apesar da pouca similaridade do modelo de HP induzida por MCT, no que diz respeito à fisiopatologia a nível de vasos pulmonares, com o que ocorre em humanos, a injeção da MCT induz significativa hipertrofia e disfunção do VD. Estas alterações são as principais determinantes de sobrevida de pacientes com todas as formas de HP, tornando esse modelo importante para avaliação de novas estratégias que possam promover a cardioproteção. Após a administração i.p. de altas doses de MCT em ratos, a pressão sistólica do VD pode aumentar significativamente estando associada a 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).

1.2.2 Modelo de HP induzido por hipóxia crônica

A hipóxia é frequentemente utilizada para induzir HP em uma grande variedade de espécies de animais. Embora, exista grande variabilidade nas respostas à hipóxia crônica entre as espécies. Em contraste ao modelo de MCT a HP induzida por hipóxia, em quase todas as espécies de mamíferos estudadas até o momento, apresenta modificações estruturais nos vasos bastante similares (embora em magnitudes diferentes) nas linhagens estudadas (Stenmark et al., 2009). A muscularização das pequenas arteríolas pulmonares, geralmente vasos não-muscularizados, na parede alveolar começa rapidamente. Muitas possibilidades podem influenciar essas mudanças, adicionalmente à diferenciação dos pericitos e/ou “migração” das células musculares lisas, incluindo o recrutamento e diferenciação de fibroblastos locais, recrutamento de células mononucleares e progenitoras, e a transdiferenciação de células endoteliais em células mesenquimais (Stenmark et al., 2006). Isso pode ser devido à proliferação das células musculares lisas mediais. A hipertrofia das células musculares lisas, entretanto, é observada em diversos vasos (Meyrick e Perkett, 1989).

Adicionalmente, a inflamação aparenta desencadear uma importante função no processo de remodelamento induzido por hipóxia, pelo menos em

algumas linhagens de ratos (Burke et al., 2009). Uma adesão de moléculas e citocinas inflamatórias dentro das paredes dos vasos foi observada com infiltrados inflamatórios persistentes ao longo do estudo (Burke et al., 2009). Além disso, ocorre significativo espessamento e fibrose das arteríolas pulmonares proximais, com enrijecimento das paredes (Drexler et al., 2008). Duas semanas após a hipóxia, os ratos desenvolvem HP moderada, com aumento nos valores de pressão arterial pulmonar que parecem estar relacionados com a progressão das mudanças estruturais. A hipertrofia do ventrículo direito ocorre, mas existe pouca evidência de insuficiência (Stenmark et al., 2009). A exposição de camundongos à hipóxia crônica, embora cause elevações nas pressões arteriais pulmonares, está associada com um pequeno remodelamento vascular, certamente menor do que ocorre em ratos (Frank et al., 2008; Nozik-Grayck et al., 2008; Dempsey et al., 2009; Steiner et al., 2009).

No modelo de hipóxia crônica não existem indícios de fibrose da camada íntima e de lesões plexiformes irreversíveis como o que ocorre em humanos. (Stenmark et al., 2009). A HP induzida por hipóxia crônica também é, pelo menos em parte, dependente do recrutamento de células progenitoras e inflamatórias (Frid et al., 2006). Existe controvérsia sobre a ideia de que a hipóxia crônica produz perda ou rarefação da microvasculatura pulmonar, como ocorre no caso de HAP em humanos (Rabinovitch et al., 1983). Assim, os modelos experimentais de hipóxia crônica em roedores podem ser vistos como modelos de HP menos severa, não de HAP, e poderiam ser também vistos como relevantes para estudos sobre a HP humana associada à hipóxia como ocorre nos casos de pacientes com doenças do parênquima pulmonar (DPOC) e pessoas que vivem em altas altitudes (Stenmark et al., 2009).

1.2.3 Sugen 5416/hipóxia: um modelo de HAP

O modelo animal de HAP severa foi desenvolvido com a intenção de reproduzir de forma aproximada ao que ocorre em humanos, os mecanismos etiológicos envolvidos na hiperproliferação das células endoteliais que caracterizam as lesões plexiformes (Taraseviciene-Stewart et al., 2001). Baseados no conceito de que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é importante para a manutenção e diferenciação das células endoteliais,

Taraseviciene-Stewart e colaboradores ao inibir a sinalização desse mediador vascular em ratos expostos a normóxia ou hipóxia crônica, utilizando um inibidor do receptor de VEGF (SU5416) também conhecido como semaxanibe, provocou leve HP e remodelamento vascular pulmonar em ratos submetidos à normoxia, mas uma severa e irreversível HAP associada à proliferação predominantemente pré-capilar das células endoteliais em ratos submetidos à hipóxia crônica. Os ratos tratados com o SU5416 também apresentaram proliferação de células musculares lisas, indicando que os receptores de VEGF das células endoteliais regularam o crescimento das células musculares lisas pulmonares. A administração de SU5416 e a inibição do receptor de VEGF pode causar apoptose de células endoteliais, e em condição de hipóxia desencadeia a proliferação de células endoteliais no lúmen dos pequenos vasos, devido ao fato de que a hipóxia crônica, por si, e/ou a vasoconstrição excessiva estimulam a proliferação de uma linhagem de células endoteliais resistentes a apoptose (Taraseviciene-Stewart et al., 2001). A utilização desse inibidor junto a hipoxia leva a uma resistência a função de apoptose, essa é a característica da associação, e é por isso que a proliferação fica extremamente aumentada. Ocorre um desequilíbrio; o VEGF é um fator de sobrevivência obrigatório para CE (Voelkel et al, 2006), e a hipoxia crônica induz a maior expressão de VEGF nas CE (Ferrara et al, 1999), e assim grande proliferação celular. Porém, a inibição contínua do receptor de VEGF com SU5416 leva a apoptose dessas células, mas a presença da hipoxia estimula células resistentes a apoptose a proliferar. Causando um desequilíbrio entre intensa proliferação e apoptose (Taraseviciene-Stewart et al., 2001).

Interessantemente, a hipóxia crônica, juntamente a inibição do receptor VEGF, causam severa e persistente HAP, mesmo após os animais terem sido removidos do ambiente de hipóxia, algo que não acontece no modelo de hipóxia crônica sozinha, no 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 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 SU5416 afeta apenas os receptores presentes nas células endoteliais

pulmonares e não em outros órgãos (Burke et al., 2009). Neste modelo não houve aparecimento de infiltrado perivascular de monócitos e macrófagos. Esse fato é importante de ser comparado com o que acontece no modelo de hipóxia crônica isolada, 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 gravidade do modelo SU5416, 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. Esse modelo está bem estabelecido e consiste em hipoxia + SU5416 seguida de normoxia. Depois de algumas semanas de normoxia, observa-se precocemente, alterações vasculares pulmonares, alterações hemodinâmicas, de intensidade a depender do tempo em normoxia (Stenmark et al., 2009).

Por tanto, 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 SU5416/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.

1.3.0 Planejamento e desenvolvimento de derivados *N*-acilidrazônicos

O Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LASSBio/UFRJ) apresenta como missão o planejamento, a síntese e a avaliação das propriedades farmacológicas de novas substâncias com atividade biológica, dentre essas as *N*-acilidrazonas (NAH) (Barreiro, 2002).

O foco do LASSBio pelo fragmento *N*-acilidrazona se iniciou em 2002, empregando-se a estratégia de simplificação molecular (Figura 8) sobre derivados diidro(2*H*)piridazinônicos representada pela simples ruptura da ligação carbono-carbono **a**, o que permitiu a síntese de inúmeros compostos *N*-acilidrazônicos com promissoras propriedades anti-inflamatória, antitrombótica e analgésica (Lima et al., 2000).

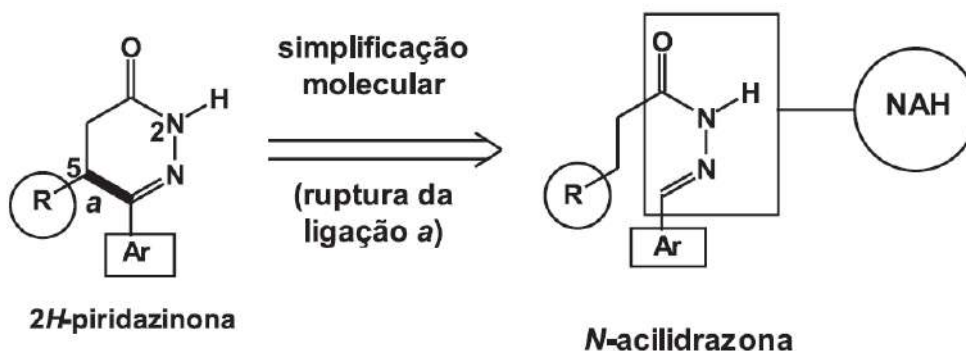


Figura 8: Esquema representativo da estratégia de simplificação molecular, utilizada para romper a ligação **a** dos derivados 2*H*-piridazinônicos obtendo-se como produto um derivado que apresentou a função NAH, antes mascarada. Adaptado de Barreiro (2002).

Inibidores de serina/treonina cinases, como a I κ B cinase β (IKK-2) e de MAPK tem sido foco de pesquisa ao longo dos anos devido ao potencial uso terapêutico desses inibidores no tratamento de doenças crônicas como câncer e artrite reumatoide (Hollenbach et al, 2004, Gupta et al, 2014). A exemplo do sucesso de alguns inibidores de tirosina quinase como vemurafenibe, palbociclibe, e trametinibe, (Figura 9) usados como opção terapêutica dessas doenças (Bollag et al; 2012; Turner et al, 2015; Finn et al, 2016; Rutkowski et al, 2015; Wu et al, 2016).

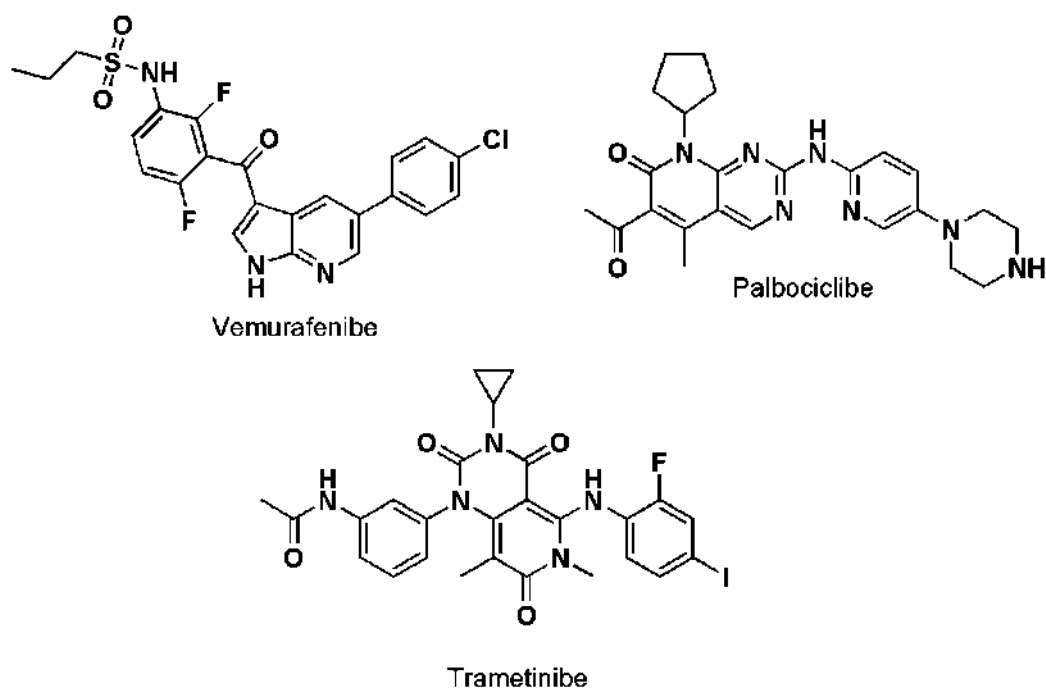


Figura 9: Fármacos inibidores de tirosina cinases.

A inibição de proteínas cinases constituem um alvo terapêutico atraente para o desenvolvimento de novos protótipos a fármacos (Noble et al, 2004; Wu et al, 2015). Na busca e desenvolvimento de novos protótipos inibidores de cinases realizada pelo LASSBio, cabe destacar a substância LASSBio-1524 (Figura 10) que foi planejada através de estudos de modelagem molecular e foi o primeiro inibidor de IKK2 ($CI_{50} = 20 \mu M$) contendo a subunidade *N*-acilidrazona (Duarte et al, 2007). A otimização estrutural de LASSBio-1524 direcionou a gênese e identificação de LASSBio-1829 (Figura 10) como um potente inibidor de IKK2 (Guedes et al, 2016). Além disso, essa substância também apresentou importante atividade anti-inflamatória em modelos animais (Guedes et al, 2016). A partir da estrutura de LASSBio-1829 foram empregadas estratégias da Química Medicinal como a simplificação molecular e bioisosterismo para o desenvolvimento de 4 novos derivados *N*-acilidrazônicos (Barreiro et al, 2002; Lima et al, 2005; Freitas et al, 2017) LASSBio-1827, LASSBio-1824, LASSBio-1823 e LASSBio-1832 (Figura 10). Apesar de terem sido planejadas como inibidoras de IKK2, as moléculas não apresentaram atividade inibitória nessa enzima. Contudo, o perfil inibitório foi testado em outra cinase como a MAPK p38 α , demonstrando potencial atividade inibitória, com concentração inibitória média (CI_{50}) entre 4.45 a 50.9 μM .

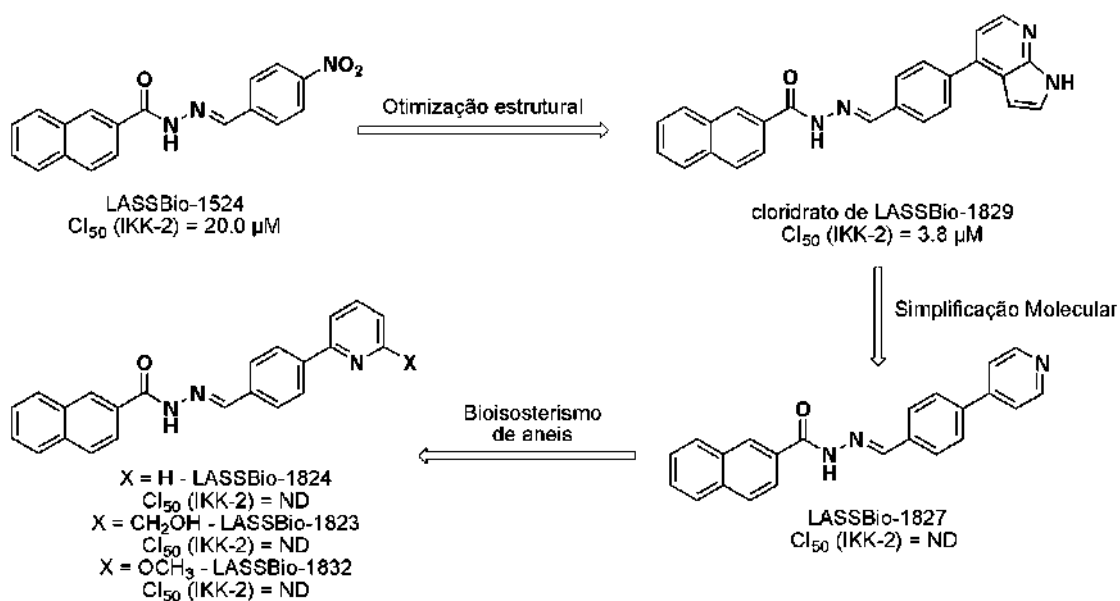


Figura 10: Representação esquemática do desenvolvimento de novos derivados N-acilidrazônicos.

Dentre a nova série de derivados, destacou-se LASSBio-1824 (Figura 11), um potente inibidor de MAPK p38 α com Cl_{50} de 4.45 μ M, ação inibitória verificada por meio de um ensaio de inibição de cinases (Goettert et al, 2010). A relevante ação inibitória de LASSBio-1824 na MAPK p38 α , uma cinase pró-inflamatória, foi também confirmada através da atividade anti-inflamatória *in vivo*. LASSBio-1824 apresentou uma promissora ação anti-inflamatória, além de diminuir significativamente a produção de TNF- α , corroborando seu potencial como protótipo anti-inflamatório. (Freitas et al, 2017).

A MAPK p38 α atua fosforilando seus alvos, ela usa o ATP para transferir fosfato para seus substratos, por meio de um sítio específico da molécula. O mecanismo de ação de LASSBio-1824, proposto através de docking molecular, ocorre por impedimento dessa ligação entre o ATP e a molécula de MAPK P38 α . LASSBio-1824 interage em uma cavidade distinta do sítio de ligação ao ATP da MAPK p38 α , ela interage com resíduos de aminoácidos His-171 e Asp-165 através de pontes de hidrogênio e dessa forma impede a fosforilação pela MAPK P38 α . (Freitas et al, 2017). Cabe adicionar que o docking é um modelo estimado em um software de computador, e somente com estudos de cristalografia de raios x, poderíamos afirmar exatamente em qual região da enzima a LASSBio-1824 interage.

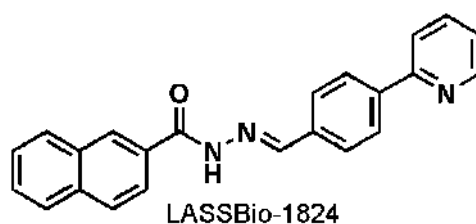


Figura 11: Estrutura de (*E*)-*N*-(4-(piridin-2-il) benzilideno)-2-nafto-hidrazida (LASSBio-1824).

1.4.0 Justificativa

A HAP é uma doença progressiva, e muitos pacientes se tornam refratários a terapia atualmente disponível. As intervenções para esses pacientes, vão desde o uso de medicações direcionada ao tratamento dos sintomas apresentados como a oxigenoterapia, anticoagulantes e diuréticos, assim como o transplante pulmonar.

Embora os fármacos descritos já venham sendo utilizados no tratamento da HAP, não há ainda uma terapia específica, que reduza consideravelmente a progressão e mortalidade da doença. Além disso, os medicamentos usados na atualidade apresentam em geral efeitos adversos importantes, e não abordam alterações fundamentais causadas pela HAP, como a hipertrofia de parede do VD e a inflamação.

Uma vez que a via de MAPK P38 α pode influenciar diversas etapas envolvidas na patogênese da HAP, a inibição de MAPK p38 α pela LASSBio-1824 parece ser um alvo promissor, já que pode interferir em processos inflamatórios e proliferativos da HAP. E afetar processos de hipertrofia cardíaca e consequentemente de insuficiência cardíaca, que são os modificadores da classe funcional do paciente e morte. Enquanto os fármacos utilizados atualmente, cujo efeito é basicamente vasodilatador.

Desta forma, é interessante elucidar os mecanismos celulares intimamente ligados na fisiopatologia HAP para se identificar alvos terapêuticos mais específicos. Novas abordagens para o tratamento da HAP devem ser consideradas, assegurando um perfil de baixa toxicidade, além de alta eficácia antiproliferativa, anti-inflamatória e antiapoptótica no tratamento da HAP.

2.0 OBJETIVO

2.1.0 Objetivo geral

Avaliação farmacológica de um novo inibidor de MAPK p38 α na HAP induzida por MCT ou hipóxia/SU5416 em ratos.

2.1.1 Objetivos específicos

- Efeito de LASSBio-1824 na função vascular pulmonar;
- Parâmetros hemodinâmicos em ratos com HAP tratados ou não com LASSBio-1824;
- Alterações histopatológicas cardíacas e em artérias pulmonares após o tratamento com veículo e LASSBio-1824;
- Investigar ação de LASSBio-1824 na via de sinalização MAPK-p38 α .

3.0 METODOLOGIA

3.1.0 Local da pesquisa

Este projeto foi realizado no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular com a colaboração do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) que compõem o Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.1.1 Comitê de ética

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e pesquisa com animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (sob o número 039/19).

3.1.2 Substâncias Utilizadas

LASSBio-1824 e SU5416 foram sintetizados e gentilmente fornecidos pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®; da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Dimetilsulfóxido (DMSO), ketamina e xilazina foram gentilmente fornecidos por Cristália produtos químicos e farmacêuticos (Itapira, São Paulo, Brasil). DMSO foi diluído em água purificada a uma concentração de 0,2% v/v. Fenilefrina (Phe) e acetilcolina (ACh) foram adquiridas na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e dissolvidas em água destilada. Anticorpos para o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), MAPK p-38, MAPK p-38 fosforilada (fosfo-p-38 MAPK) e proteína nuclear (c-Fos) foram adquiridos na AbCam (Cambridge, MA, EUA), enquanto anticorpos para quinase 5 regulada por sinal extracelular (ERK5), quinase 5 regulada por sinal extracelular fosforilada (fosfo-p-ERK5), óxido nítrico sintase indutível (iNOS), caspase 3 e o anticorpo anti-alfa-actina do músculo liso (α SMA) foram adquiridos na Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Anticorpo secundário de IgG anti-coelho peroxidase de rábano silvestre (HRP)

foi obtido da Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Anticorpo secundário usado na imunocitoquímica para α SMA foi adquirido de Nichirei (Tóquio, Japão).

3.1.3 Indução de HAP com monocrotalina (MCT)

Todos os experimentos foram realizados e analisados de forma cega. Inicialmente foi utilizado o modelo de HP induzida por MCT, no qual os ratos Wistar machos (180 - 250g) receberam uma única injeção intraperitoneal de MCT dissolvida em 1N HCl (pH 7,4) dose de 60mg/kg (n = 10). Após 14 dias e com a confirmação da HP através do ecocardiograma, foi iniciado o tratamento terapêutico com LASSBio-1824 dissolvido em DMSO (20mg/kg i.p) com duração de 14 dias (Zapata-sudo et al, 2012; Alencar *et al.*, 2014; Alencar *et al.*, 2017). Ecocardiograma foi realizado antes do início do protocolo e após 14 dias da injeção de MCT para confirmação da doença através da aquisição do doppler da artéria pulmonar que obtém a imagem do fluxo da AP, assim como medidas do tempo de aceleração da artéria pulmonar (TAP) e tempo de ejeção da artéria pulmonar (PET) - (Thibault et al., 2010; Gomez-Arroyo et al., 2012; Alencar et al., 2017; Alencar et al., 2018; Bordenave et al., 2020).

Após a confirmação os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos; grupo MCT + veículo-DMSO (n = 5) e grupo MCT+LASSBio-1824 (n=5). O grupo controle (sem administração de MCT n=5) recebeu injeções de veículo- (DMSO; 100 μ L por kg) no primeiro dia do protocolo, assim como na fase de tratamento. Os ratos foram pesados diariamente e as doses ajustadas apropriadamente, de acordo com as variações nos pesos corporais. E ao final do protocolo foram submetidos novamente ao exame de ecocardiografia transtorácica (Figura 12).

Protocolo experimental Monocrotalina (MCT)



Crotalaria spectabilis

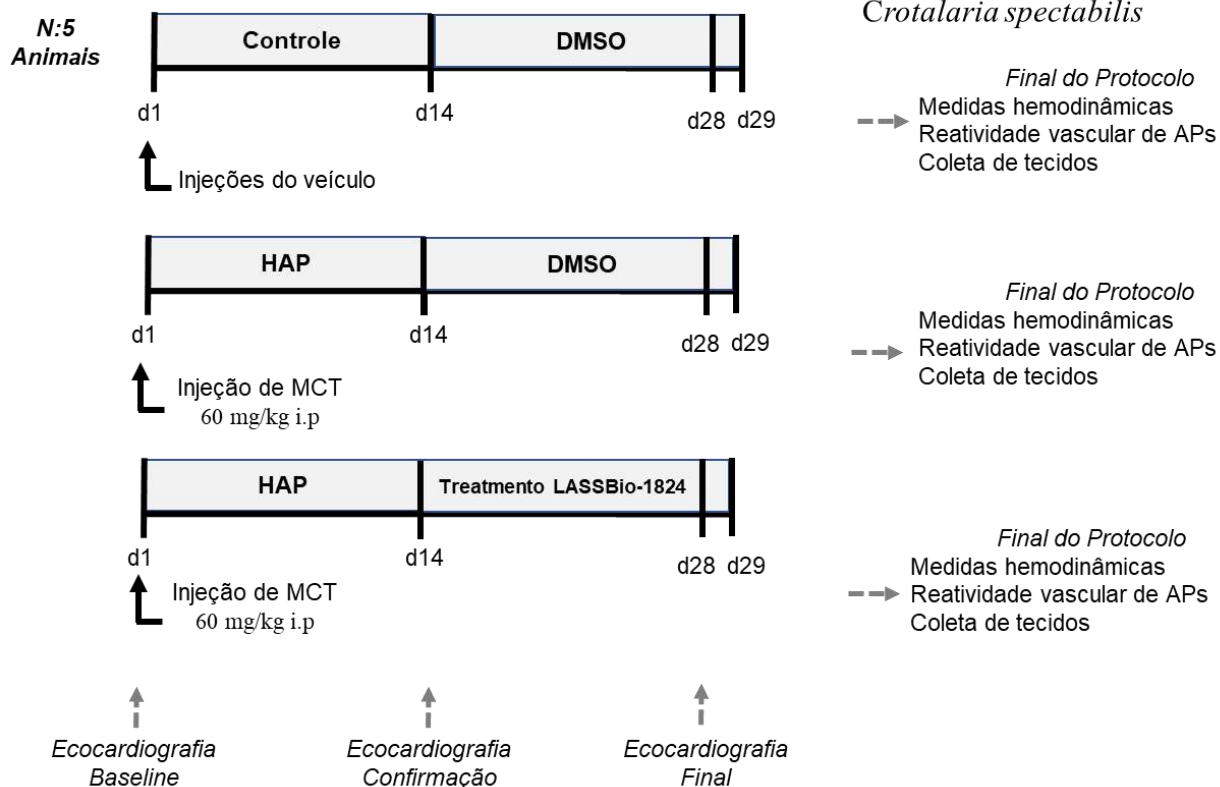


Figura 12: Esquema do desenho experimental para o protocolo de HAP induzido por MCT. Ecocardiograma foi realizado no início do estudo d1, no d14 para confirmação da HAP e ao final do protocolo. MCT, monocrotalina; HAP, hipertensão arterial pulmonar. Grupo controle n = 5, grupo MCT + veículo (DMSO), n = 5, grupo MCT + LASSBio-1824, n = 5.

3.1.4 Animais e desenho experimental hipóxia SU5416

Para induzir a HAP, ratos Wistar machos (180 - 250g), foram alojados em gaiolas contendo 3-4 animais, a temperatura de 21 °C, com acesso livre a água e ração, respeitando ciclo/claro escuro de 12h. Nessas condições os animais foram expostos durante 3 semanas à hipóxia normobárica (10% O₂; n = 10), através da manutenção em câmara de acrílico ventilada, na qual o nitrogênio foi injetado (90%) sob um controlador (ProOx 360, BioSpherix; Lacona, NY, EUA). Durante a hipóxia os animais receberam uma vez por semana, via intraperitoneal SU5416 20mg/kg (Vitali et al, 2014; Alencar et al., 2018; Silva et al, 2020). SU5416 foi suspenso em carboximetilcelulose 0.5%, Tween80 0,4% e álcool benzílico em salina isotônica 0,9%. A câmara de hipóxia foi aberta a cada 3 dias,

por menos de 20 min, para limpeza das gaiolas e para reabastecimento de ração e água. O grupo controle foi mantido em ambiente de normoxia (ar ambiente a 21% de O₂; n = 5) e recebeu injeções semanais de veículo (DMSO 100µL por kg). O ecocardiograma foi realizado antes do início do protocolo em todos os grupos experimentais, 3 semanas após a primeira injeção de SU5416 com hipóxia e ao final do tratamento com LASSBio-1824. Utilizou-se o doppler na artéria pulmonar para adquirir imagem do trato de saída do fluxo da AP, e o estabelecimento da HAP foi confirmado por uma alteração na forma da onda de fluxo juntamente com medidas do tempo de aceleração da artéria pulmonar (TAP) e tempo de ejeção da artéria pulmonar (TET). Essas medidas foram utilizadas como parâmetro de estabelecimento da HAP (Thibault et al., 2010; Gomez-Arroyo et al., 2012; Alencar et al., 2017; Alencar et al., 2018; Bordenave et al., 2020). A Figura 13 mostra a linha temporal usada para caracterizar a evolução da HAP e o protocolo experimental. Uma vez confirmado a HAP, os ratos SuHx foram expostos a condições de normoxia por 2 semanas adicionais e foram divididos em dois grupos: SuHx + veículo (DMSO; 100µL por kg; n = 5) e SuHx + LASSBio-1824 (n = 5).

Esse modelo experimental foi utilizado em dois tempos; num primeiro momento, de forma comparativa, desenvolvemos um grupo em que os ratos SuHx foram tratados com a dose de 20 mg/kg i.p. de LASSBio-1824 dissolvido em DMSO por 14 dias, a mesma dose e via de tratamento realizado no grupo MCT, os ratos normoxia, e SuHx + veículo foram tratados com DMSO (100µL por kg; i.p). Posteriormente num outro grupo experimental, o tratamento do grupo SuHx foi com LASSBio-1824 dissolvido em DMSO por via oral na dose de 50mg/kg por 14 dias. Esta dose foi escolhida seguindo os procedimentos já publicados pelo nosso grupo de pesquisa em que administramos compostos de N-acilhidrazona a 50mg/kg/dia v.o. em ratos com HP (Alencar et al., 2013; Alencar et al., 2014). Como a via de administração oral apresenta maior vantagem, a continuidade da avaliação farmacológica foi realizada apenas nos grupos tratados oralmente com LASSBio-1824.

Protocolo experimental Hipóxia-SU5416

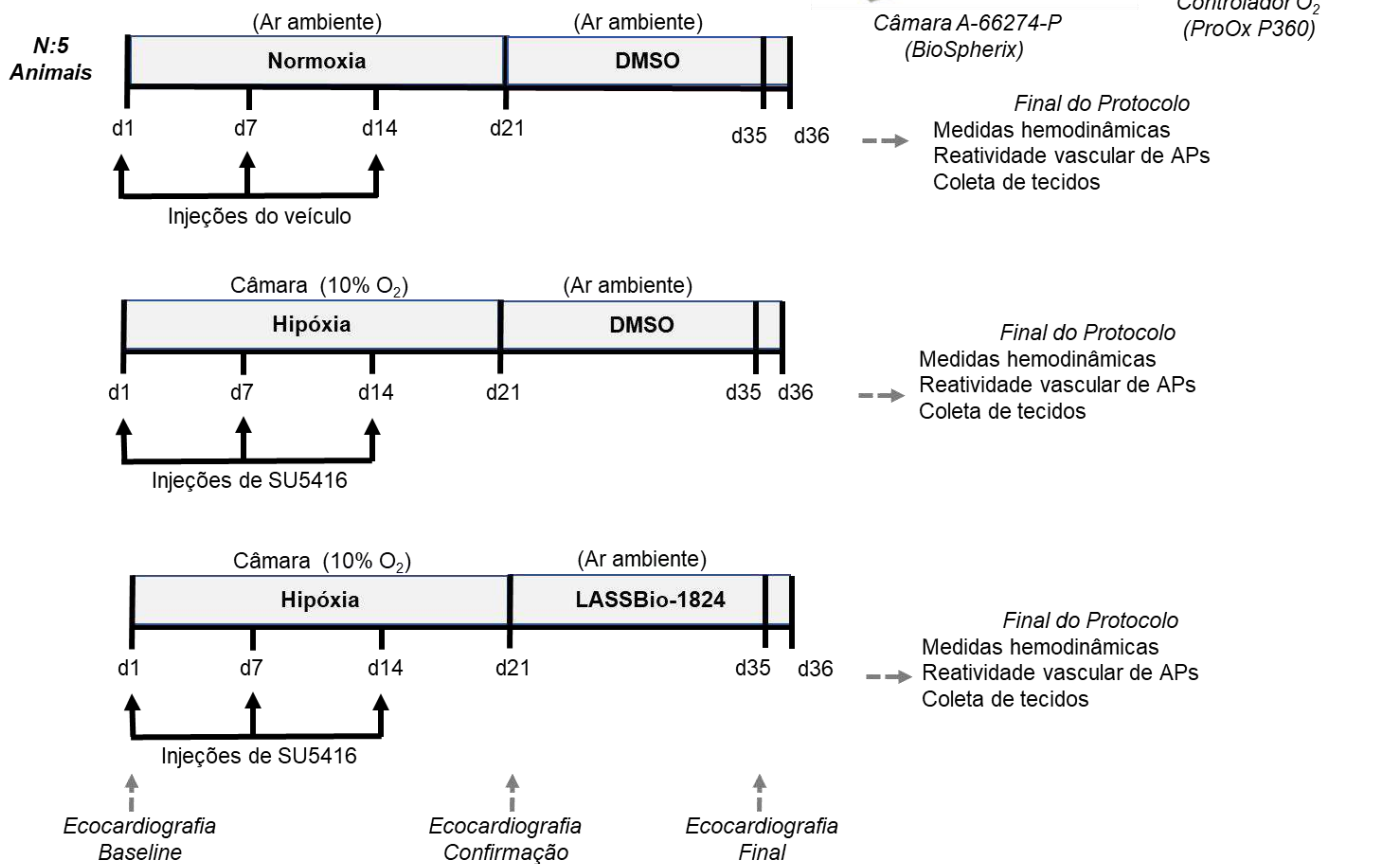


Figura 13: Esquema do desenho experimental para o protocolo de HAP induzido por SuHx. Ecocardiograma foi realizado no início do estudo d1, no d21 para confirmação da HAP e ao final do protocolo. SuHx, SU5416/hipóxia; HAP, hipertensão arterial pulmonar. Grupo normoxia n = 5, grupo SuHx + veículo (DMSO), n = 5, grupo SuHx + LASSBio-1824, n = 5.

3.1.5 Ecocardiografia transtorácica

Os animais foram anestesiados inicialmente com uma mistura de isoflurano/oxigênio a 3% em uma caixa de contenção, e após a indução foram mantidos com isoflurano/oxigênio a 1,5% através de um cone nasal durante ventilação espontânea e colocados em decúbito lateral esquerdo para realização da ecocardiografia. A temperatura da sala foi mantida a aproximadamente 25° C para evitar hipotermia. E cada exame, da anestesia à obtenção de imagens teve duração máxima de 10 minutos. A hemodinâmica do VD e a função e estrutura cardíaca foram avaliadas por um sistema de imagem de ultrassom de alta

resolução equipado com um transdutor RMV-710B com frequência de 25 MHz e distância focal fixa de 15 mm montada em um sistema integrado (Vevo 770, Visualsonics, Toronto, Canadá). Todas as medidas foram obtidas de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia, e realizadas por um examinador experiente.

A avaliação da resistência vascular pulmonar foi realizada de forma não invasiva por meio de medida do TAP obtida pelo ecocardiograma com doppler de onda pulsada na via de saída do VD (Toba et al, 2002; Jones et al, 2002; Augustine et al, 2018; Silva et al, 2020). Os valores obtidos para TAP foram normalizados pelo TET a fim de atenuar a influência de possíveis flutuações da frequência cardíaca não relacionadas à HP (Urboniene et al., 2010; Abe et al, 2010).

O diâmetro da AP (APd) e a integral da velocidade tempo (IVT) da AP foram medidos no plano paraesternal de eixo curto no meio da sístole, pela ecocardiografia Doppler bidimensional e onda de pulso, respectivamente. O débito cardíaco do ventrículo direito (DCVD) foi calculado como $DCVD = 0,785 \times (APd)^2 \times IVT \times \text{frequência cardíaca}$. A espessura da parede do VD foi obtida em modo M para determinar um índice indireto de hipertrofia (Urboniene et al., 2010, Silva et al, 2020). As áreas do VD e VE foram obtidas em modo B e o volume sistólico do ventrículo esquerdo (VSVE) foi calculado de acordo com o método de Simpson. O débito cardíaco do VE (DCVE) foi calculado como $DCVE = VSVE \times \text{frequência cardíaca}$ (Toba et al, 2002; Jones et al, 2002).

3.1.6 Medida invasiva de parâmetros hemodinâmicos vasculares e intraventriculares

Os animais foram submetidos a anestesia com ketamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (15 mg/kg, i.p.) e mantidos em ventilação espontânea durante os procedimentos. Um cateter PTFE30 foi inserido na artéria carótida para medir a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e arterial média (PAM). Posteriormente, o mesmo cateter foi introduzido no VE para registrar a pressão sistólica do VE (PSVE). A veia jugular direita foi usada para acessar o VD usando um segundo cateter PTFE30 para registrar a pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD), pressão diastólica final e taxas de contração e relaxamento

(+dP/dt-). O cateter foi conectado a um transdutor de pressão (MLT884, ADInstruments, Inc., Colorado Springs, CO, EUA). Todos os parâmetros foram registrados em computador para análise usando o software Lab Chart (Versão 7.0, ADInstruments, Inc.; Sydney, Austrália). Imediatamente após as medidas os animais foram eutanasiados por exsanguinação através de punção cardíaca para retirada de tecidos e consequente avaliação histopatológica e molecular.

3.1.7 Avaliação da reatividade vascular de anéis de artérias pulmonares

Após a eutanásia, 3 mm da artéria pulmonar mais próxima do coração foi removida e preparada para registro da tensão isométrica. Os anéis foram posicionados em cubas experimentais por meio de hastes metálicas, com uma extremidade do tecido conectada a um transdutor de força para o registro de tensão. No interior das cubas experimentais, os anéis da artéria pulmonar foram imersos em uma solução nutritiva de Tyrode modificada ($\text{NaCl } 120 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $5,9 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KCl}$, $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, $18 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ e $11 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ glicose; pH 7,4) e oxigenado com gás carbônico (95% O_2 / 5% CO_2) a $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Após o equilíbrio por 2 horas a 1,5 g de tensão em repouso, as preparações foram expostas a concentrações crescentes de fenilefrina (Phe: 1 nM - 10 μM), com a concentração seguinte sendo adicionada ao se atingir o platô de contração induzida pela concentração prévia, o que demora em torno de 5-10 min. Após um platô de contração com 10 μM de Phe, os anéis de AP foram expostos a concentrações crescentes de acetilcolina (ACh: 1 nM - 10 μM) para determinar a capacidade de vasodilatação e a integridade endotelial, da mesma forma com a concentração seguinte sendo adicionada ao se atingir o platô de relaxamento da concentração anterior. As medidas isométricas de tensão dos anéis da artéria pulmonar em resposta à fenilefrina e acetilcolina foram registradas conforme descrito por Alencar et al, 2013. Os resultados foram armazenados em computador para posterior análise usando programa Lab Chart (Versão 7.0, ADInstruments, Inc.).

3.1.8 Retirada e acondicionamento de tecidos

Antes da fixação os corações foram pesados e a parede do VD foi separada do VE e septo (S) e seus pesos úmidos foram registrados para cálculo do índice de hipertrofia de Fulton, como razão entre o peso do VD e o VE mais o septo ($VD/VE + S$) - (Silva et al, 2020). O VD foi seccionado longitudinalmente e uma porção foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido para análise molecular, e a outra imersa em formalina tamponada neutra. Os pulmões foram lavados brevemente em solução salina, os lobos esquerdos foram inflados com formalina tamponada neutra para obter uma superfície lisa e imersos nesse fluido para fixação e posterior incorporação em parafina. Os lobos direitos foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido para análise de expressão de proteínas (Alencar et al., 2017).

Os tecidos separados para estudo histológico, permaneceram fixados em formalina por uma semana e depois foram parafinizados: inicialmente foram imersos em álcool 70% por 24h, passam por uma série de 3 banhos de álcool etílico absoluto, em seguida 3 banhos de xilol. Os pulmões ficaram 40 minutos em cada banho e os VD 20 minutos. Por fim, os tecidos foram submetidos a dois banhos de parafina (60°C, 60 min cada), e em sequência inseridos em blocos de parafina para posterior corte em micrótomo. Secções de parafina (4 µm) do VD e pulmões foram delicadamente acomodados em lâminas de vidro para secagem em estufa. O material histológico foi numerado aleatoriamente para serem corados e analisados por um observador independente (Silva et al, 2020).

3.1.9 Análise morfométrica e imuno-histoquímica de VD e pulmões

Cortes de VD e pulmões foram corados por picro-Sirius red (PSR) para avaliação do conteúdo de colágeno cardíaco e perivascular. Os cortes foram reidratados com lavagem com xileno e etanol e, em seguida, corados com PSR por 90 minutos e montados com Entellan (Merck, Alemanha) conforme descrito anteriormente (Alencar et al., 2017; Silva et al 2020). O conteúdo de colágeno perivascular foi determinado como a razão entre a área perivascular e a área da secção transversal do vaso (área de colágeno em torno de uma arteríola, normalizada pelo diâmetro da arteríola), e o colágeno intersticial do VD foi

expresso pela área média de colágeno no tecido miocárdico por campo. Foram fotografadas de 15-20 arteríolas com diâmetro externo inferior a 150 μm dos pulmões (sob aumento de 1000 $\times$) e 10 campos de VD (sob aumento de 400 $\times$) usando uma câmera digital (Canon A620, Canon, EUA) acoplada a um microscópio óptico (Axiostar, Zeiss, Alemanha). Para avaliação do infiltrado celular cardíaco, cortes de VD foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), seguido da captura de imagens, 10 campos de VD (sob aumento de 400 $\times$) para realizar a contagem do número de células intersticiais e consequente detecção de infiltrado celular. Utilizou-se o programa de processamento de imagem ImageJ (domínio público) para análise das imagens (Silva et al 2020).

Para a avaliação da hipertrofia medial nas arteríolas pulmonares as secções de pulmão foram imunocoradas para α -SMA. A atividade da peroxidase endógena foi extinta usando peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) após desparafinação e reidratação das seções seguida de bloqueio da ligação não específica usando incubação de BSA a 5% por 60 minutos. Depois disso, as seções foram incubadas por 2 h com anticorpo primário (1:500 anti- α -SMA em PBS-BSA 1%). Após a lavagem em PBS, as lâminas foram expostas ao anticorpo secundário de (polímero anti-rato-HRP diluído 1:3 em PBS) por 2h. Após mais um banho em PBS, as lâminas foram coradas e incubadas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por 5-10 min, contra coradas com hematoxilina alumínica por 1 min, lavadas em bicarbonato de sódio a 0,01% por 1 min e montadas com Entellan (Merck, Alemanha). Foram fotografadas de 15-20 arteríolas com diâmetro < 150 μm usando câmera digital (Canon A620, Canon, Estados Unidos) acoplada a um microscópio óptico Axiostar (Zeiss, Alemanha) sob aumento de 1000x. A espessura média da parede dos vasos foi calculada pela porção da parede marcada positivamente para α -SMA, corada em marrom, correspondente à camada muscular, e expressa como a porcentagem da área da seção transversal do vaso. Esses valores foram calculados usando-se a ferramenta de polígono no programa ImageJ (Silva et al, 2020).

Cortes de pulmão foram imunocorados para TNF- α , iNOS e MAPK p38, após desparafinação, extinção da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% e recuperação de antígeno em citrato (TNF α e MAPK p38) ou tampão Tris/EDTA (iNOS) por 30 min a 98°C. O bloqueio de ligação não específica foi realizado por incubação com 5% de BSA em solução salina

tamponada com fosfato (PBS) por 60 min antes de incubar durante a noite em anticorpos primários na diluição de 1:50 em 1% BSA-PBS. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas por 2 h em anticorpo secundário conjugado com polímero HRP (diluído 1:3 em PBS) seguido de coloração com solução 3,3'-diaminobenzidina. Hematoxilina foi usada como contra coloração e o teor de proteína foi expresso pela porcentagem de área corada, da área total do campo, positivamente marcada com a proteína, sob ampliação de 1000x, quantificada usando a ferramenta de *color threshold* do Fiji-ImageJ (ferramenta de limiar de cor), a qual determinou positividade da área marcada a partir de intensidades definidas de marcação (Schindelin et al, 2012).

As secções de VD foram imunocoradas para c-fos conforme descrito acima, exceto por uma etapa de permeabilização em PBS contendo 0,05% de Tween20 por 30 min antes do bloqueio não específico em 1% de soro de cabra normal em PBS por mais 30 min. Foram fotografados 10 campos, conforme já descrito, com aumento de 1000x. A translocação nuclear da proteína c-fos no VD foi expressa pela porcentagem de núcleos de cardiomiócitos corados em marrom sob aumento de 1000x. Foram contados os cardiomiócitos com núcleos marcados em campo, e esse valor foi normalizado pelo número total de cardiomiócitos no campo (Silva et al, 2020).

3.2.0 Expressão de proteínas - análise de Western Blot

Tecidos do pulmão e do VD foram obtidos, armazenados em tampão de lise com inibidores de protease e congelados em nitrogênio líquido até a homogeneização. Os tecidos pulmonares e cardíacos foram homogeneizados em um homogeneizador de vidro potter usando tampão de lise (12,5% de sacarose, 20 mM de Tris-HCl pH 7,4, 1 mM de EDTA) na presença de 1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonil, 1 mM de benzamidina, 1 mM de ditioneitol e 1 µg/mL de inibidores de proteases (pepstatina, quimostatina, aprotinina, leupeptina e antipain). A mistura foi centrifugada por 5 min a 1000 × g e o sobrenadante (cerca de 1ml) foi coletado e congelado a -80°C. A concentração de proteína total em cada amostra foi determinada usando reagente *Coomassie Blue*. As proteínas (50 µg) foram separadas em gel SDS-PAGE a 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando um sistema semi-seco

(Bio-Rad; Hercules, CA, EUA). As membranas foram bloqueadas usando 5% de leite desnatado dissolvido em PBS, que continha 0,1% de Tween 20 e incubadas com anticorpos primários contra; TNF α (1:1000), caspase-3 ativa (1:1000), fosfo-p-38 MAPK (1:1000), iNOS (1:1000), fosfo-p-ERK5 (1:100), c-fos (1:200) e GAPDH (1:1000), todos diluídos em PBS. A solução de anticorpo foi usada duas vezes. Após a marcação das membranas com anticorpos secundários (diluídos 1:10000 em PBS), a detecção de bandas específicas foi realizada por quimioluminescência usando ImageQuant (LAS4000, GE Healthcare Life Sciences; Chicago, IL, EUA). As imagens adquiridas foram analisadas no software Fiji-ImageJ (Schindelin et al, 2012), e a banda de proteína individual densidades de 5 réplicas biológicas foram normalizadas para GAPDH.

3.2.1 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) e foram analisados usando o software GraphPrism (versão 6.0; GraphPad, San Diego, CA, EUA). Normalidade dos dados e homogeneidade dentro dos grupos foram confirmadas usando Kolmogorov–Smirnov e Brown–Testes de Forsythe, respectivamente. Os grupos experimentais foram comparados usando análise de variância (ANOVA) com nível de significância de $p < 0,05$, seguido de um post-hoc teste de Tukey. A correlação de Pearson foi usada para análise de correlação entre a espessura da parede do vaso, função endotelial e alterações na relação PAT/PET.

4.0 RESULTADOS

4.1.0 Hemodinâmica cardiovascular e parâmetros funcionais

4.1.1 Administração i.p. nos grupos *MCT* e *SuHx*

Para investigar os efeitos da LASSBio-1824 na HAP inicialmente foram desenvolvidos dois estudos iniciais comparativos; um grupo MCT no qual os animais doentes (HAP) receberam o tratamento com a LASSBio-1824 via intraperitoneal na dose de 20 mg/Kg, e em seguida um novo grupo SuHx, em que os animais doentes também receberam a LASSBio-1824 via intraperitoneal dose de 20 mg/Kg, ambos com (n=5).

Os animais HAP tratados com veículo de ambos os modelos animais apresentaram uma redução do TAP, em comparação como os grupos que receberam a LASSBio-1824 e o normoxia (Figura 14; $p<0,05$). O tempo de aceleração pulmonar é uma medida indireta da resistência vascular pulmonar, e esse resultado ecocardiográfico, juntamente com medidas hemodinâmicas invasivas comprovaram que os animais desenvolveram a HAP e obtiveram melhora como tratamento. A PSVD aumentou consideravelmente nos animais doentes (HAP tratados com veículo), e o após o tratamento com LASSBio-1824, os valores reduziram de forma semelhante ao que existia nos animais controle em ambos os modelos. (Figura 14; $p<0,05$).

A espessura de parede livre do VD aumentou de forma considerável nos animais HAP que receberam apenas DMSO, e o tratamento de 14 dias com LASSBio-1824 foi capaz de reverter em ambos os grupos, MCT e SuHx, essa alteração (Figura 15; $p<0,05$). Corroborando com esse achado ecocardiográfico, o índice de Fulton (relação VD/VE + septo) aumentou nos animais doentes tratados com veículo, em relação aos grupos controles, e o tratamento com o inibidor de MAPK P38 α reverteu essa alteração (Figura 15; $p<0,05$).

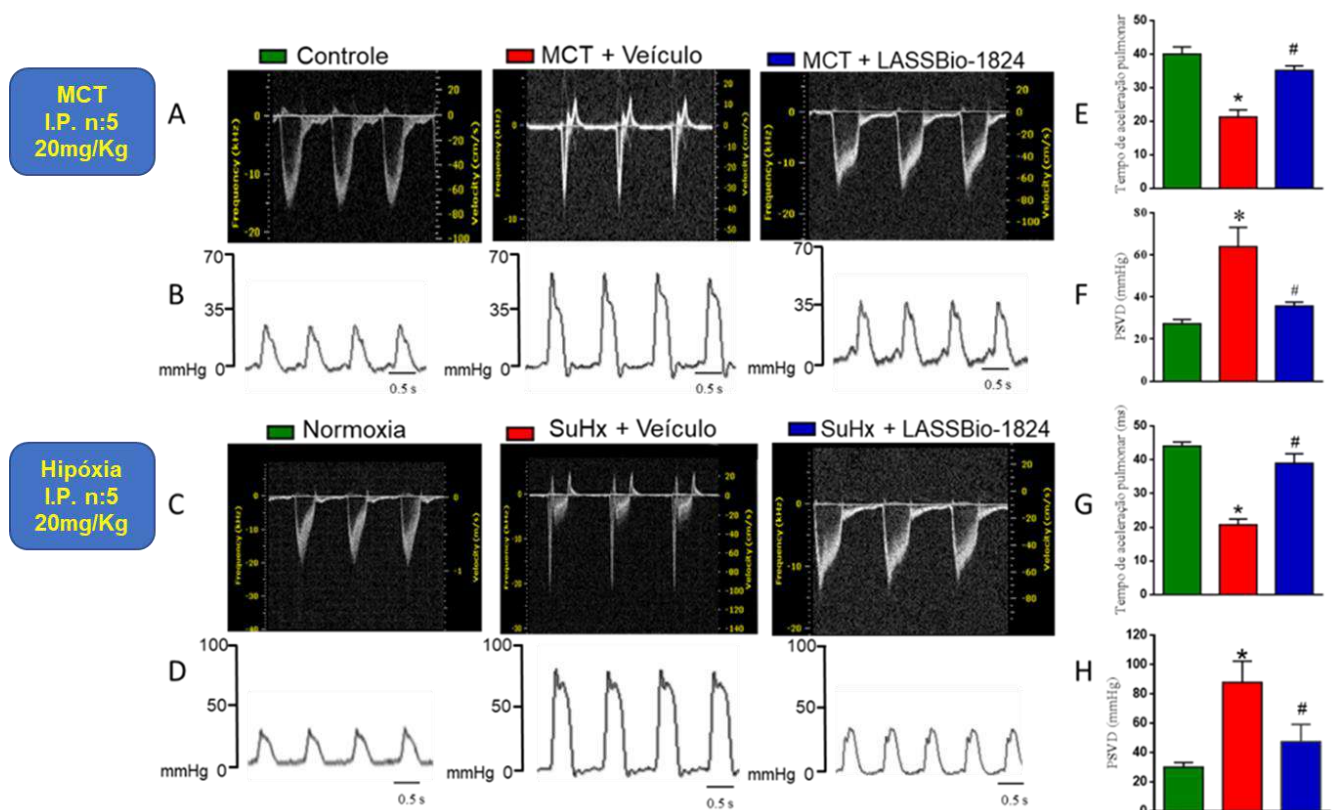


Figura 14: Efeitos da terapia com LASSBio-1824 nas alterações vasculares pulmonares e hemodinâmicas observadas em ratos SuHx e MCT. (A/C) imagens representativas do trato de saída do fluxo da AP de todos os grupos. (B/D) traçados representativos da PSVD. (E/G) tempo de aceleração pulmonar. (F/H) PSVD. Dados representam a média $\pm$ S.E.M. ($n = 5$ ratos por grupo). * $P < 0,05$ em comparação com o grupo normoxia; # $P < 0,05$ em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo. One-way ANOVA com múltiplas comparações. Teste *post hoc* de Tukey. SuHx, SU5416/hipóxia; MCT, monocrotalina; HAP, hipertensão arterial pulmonar; PSVD, pressão sistólica do ventrículo direito.

O aumento da espessura de parede é uma consequência ao aumento da RVP, ou seja, da pós-carga do VD, assim como o aumento da área do VD, que se elevou nos animais com HAP tratados apenas com veículo em comparação os grupos normoxia e LASSBio-1824, adquirindo valores semelhantes aos dos controles após o tratamento com LASSBio-1824 (Figura 15; $p < 0,05$). Contudo, não houve diferenças na área do VE entre os grupos de ambos os modelos animais (Figura 15; $p < 0,05$).

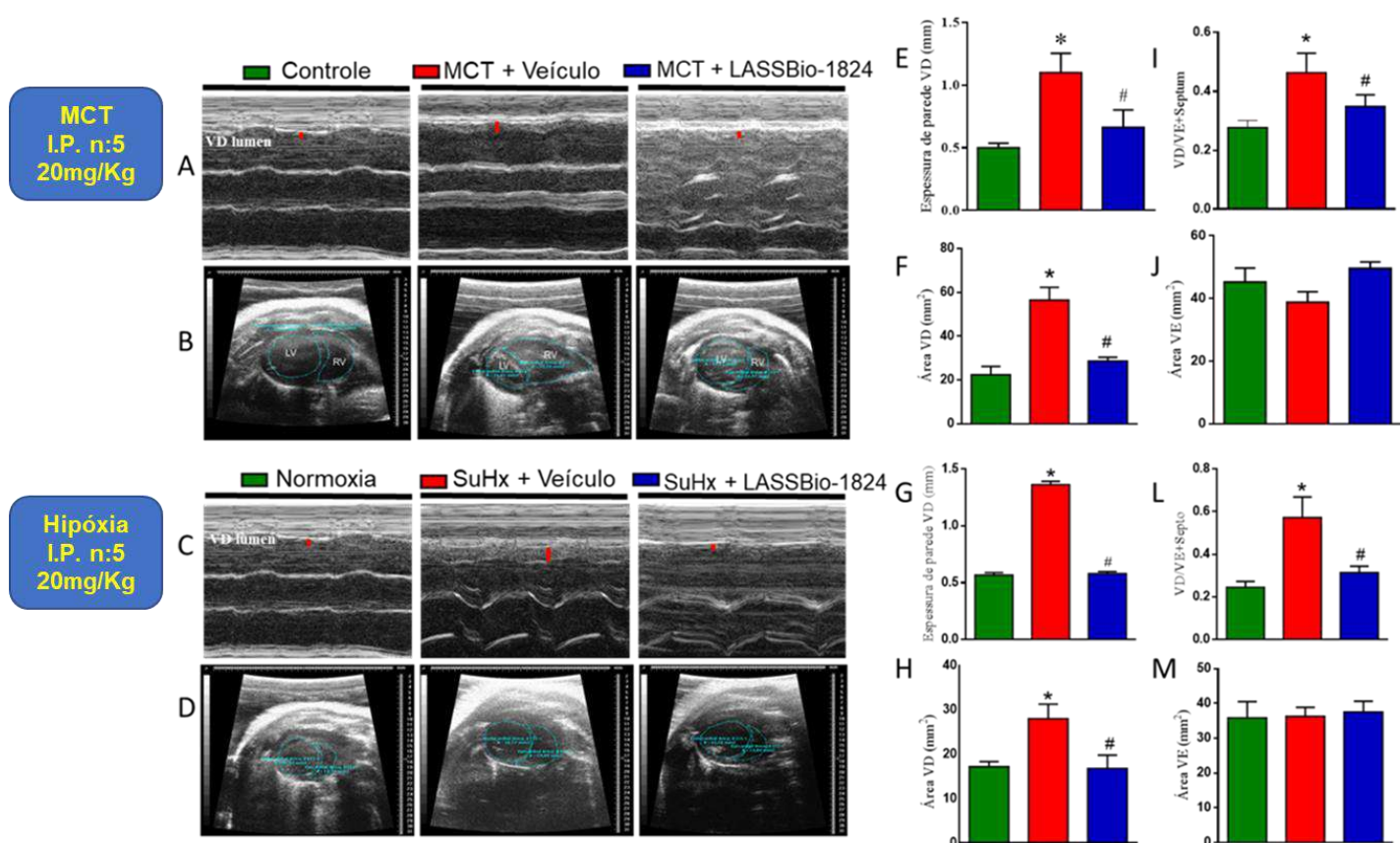


Figura 15: Efeitos do tratamento com veículo ou LASSBio-1824 na estrutura do coração de ratos SuHx e MCT. (A/C) imagens representativas da parede livre do VD obtidas pela ecocardiografia modo-M. (B/D) imagens representativas de incidências paraesternais no eixo curto obtidas por ecocardiografia modo B (em diástole final). (E/G) espessura da parede livre do VD. (I/L) relação VD/VE + septo. (F/H) Área de VD. (J/M) Área do VE. Dados representam a média $\pm$ S.E.M. (n = 5 ratos por grupo). * P < 0,05 em comparação com o grupo normóxia; #P < 0,05 em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo. One-way ANOVA com múltiplas comparações. Teste *post hoc* de Tukey. SuHx, SU5416/hipóxia; MCT, monocrotalina; HAP, hipertensão arterial pulmonar; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo.

4.1.2 Administração oral no grupo SuHx

O protocolo experimental e os tratamentos com veículo ou LASSBio-1824 tiveram efeitos neutros no peso corporal final, uma vez que o mesmo não se alterou entre os grupos experimentais (Figura 16). Durante o tratamento oral, nem o veículo nem o LASSBio-1824 promoveram efeitos significativos sobre as pressões sistêmicas dos grupos experimentais (Tabela 3), uma vez que a PAS, PAD e PAM de forma invasiva não foram alteradas, indicando a ausência de hipotensão sistêmica indesejada. No final do protocolo, a PSVE permaneceu inalterada pela HAP ou pelos tratamentos (Tabela 3). Não foram observadas diferenças significativas no VSVE, DCVE e frequência cardíaca entre os ratos controle ou com HAP. Contudo, o DCVD dos animais SuHx tratados com veículo

reduziram consideravelmente quando comparado aos grupos normoxia e tratados com LASSBio-1824 (Tabela 3).

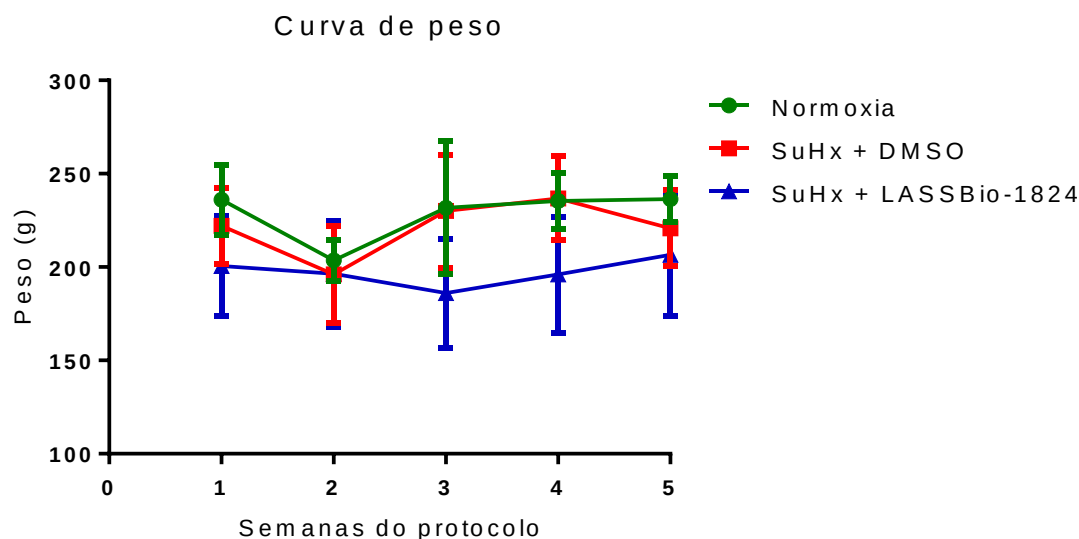


Figura 16: Curva de peso de ratos com HAP induzidos por SuHx e normoxia tratados com veículo ou LASSBio-1824.

Grupos	Normoxia	SuHx + veículo	SuHx + LASSBio-1824
FC (bpm)	283.0 ± 10.2	302.5 ± 25.56	285.1 ± 13.67
PAS (mmHg)	106.9 ± 6.8	104.7 ± 3.8	97.2 ± 8.6
PAD (mmHg)	79.5 ± 7.1	81.6 ± 4.5	71.3 ± 5.4
PAM (mmHg)	93.3 ± 6.9	93.4 ± 4.1	84.2 ± 2.8
DCVE (mL/min)	86.18 ± 7.55	73.23 ± 3.91	81.36 ± 4.35
PSVE (mmHg)	98.1 ± 4.1	83.3 ± 5.2	89.6 ± 2.4
Área VE (mm ²)	35.3 ± 3.0	34.2 ± 3.6	32.4 ± 4.3
DCVD (mL/min)	90.25 ± 3.9	67.45 ± 5.4*	91.21 ± 6.15#
PDfVD (mmHg)	6.77 ± 1.23	7.01 ± 3.62	4.81 ± 1.66
VD + dP / dt (mmHg.s ⁻¹)	1162 ± 193	1608 ± 317	1114 ± 209
VD - dP / dt (mmHg.s ⁻¹)	-1117 ± 171	-1753 ± 426	-1074 ± 165

Tabela 3: Função cardíaca e medidas hemodinâmicas ventriculares – Grupo SuHx- 50mg/Kg via oral. Dados representam a média ± SEM (n = 5 ratos por grupo). * p <0,05 em comparação com o grupo controle normoxia. #p <0,05 em comparação com o grupo SuHx + veículo. PAS, pressão arterial sistólica sistêmica; PAD, pressão arterial diastólica sistêmica; PAM, pressão arterial média sistêmica; PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; DCVE, débito cardíaco do ventrículo esquerdo; DCVD, débito cardíaco do ventrículo direito; PDfVD, pressão diastólica final do ventrículo direito; FC, frequência cardíaca.

A razão entre TAP e TET, parâmetros medidos pela ecocardiografia Doppler, foi usada para confirmar o desenvolvimento da HAP. Da mesma forma que o TAP isolado, essa relação é uma medida indireta da resistência vascular pulmonar, apenas normalizada para reduzir a influência de variáveis como a FC. O aumento da resistência vascular foi observado após a indução de HAP devido a uma redução da razão TAP/TET significativamente no dia 21 do protocolo nos ratos SuHx em comparação ao grupo normoxia ($p < 0,05$; Figura 17). A inibição da MAPK p38 α pela administração oral de LASSBio-1824 por 14 dias, reduziu significativamente a resistência vascular no leito vascular pulmonar, conforme indicado pelo aumento significativo na proporção TAP/TET ao final do protocolo quando comparada com ratos HAP tratados com veículo ($p < 0,05$; Figura 17).

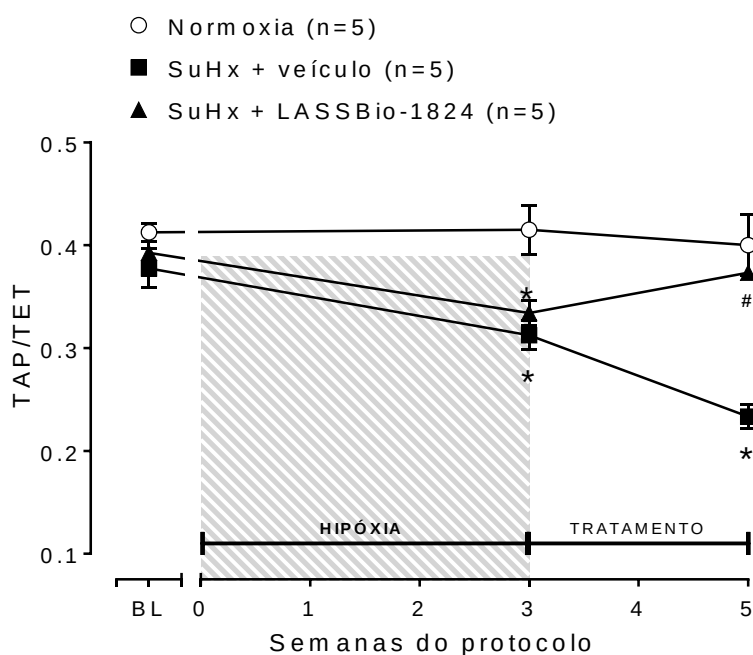


Figure 17: Regressão linear entre a relação TAP/TET e dias de protocolo. SuHx, SU5416/hipóxia; HAP, hipertensão arterial pulmonar; TAP, tempo de aceleração da artéria pulmonar; TET, tempo de ejeção da artéria pulmonar. Grupo normoxia n = 5, grupo SuHx + veículo, n = 5, grupo SuHx + LASSBio-1824, n = 5.

4.1.3 Redução das características funcionais e histopatológicas da HAP pelo LASSBio-1824

A Figura 18A mostra imagens representativas do trato de saída do fluxo sanguíneo da AP mensurados pela ecocardiografia com Doppler. Observou-se

a formação de um *mid-systolic notch*, ou incisura no meio da sístole após exposição crônica dos animais ao protocolo SuHx. É importante ressaltar que a terapia com LASSBio-1824 em ratos com HAP normalizou a forma do fluxo de saída (Figura 18A). As Figuras 18B-C mostram imagens representativas de cortes pulmonares para imunohistoquímica de α SMA e conteúdo de colágeno perivascular, respectivamente. Cinco semanas após o início do protocolo, os ratos HAP tratados com veículo exibiram uma diferença significativa na espessura da parede das arteríolas distais em comparação com o grupo normoxia (Figuras 18D-E; $p < 0,05$). A administração de LASSBio-1824 em animais SuHx restringiu totalmente a hipertrofia da parede medial dos vasos em comparação com ratos HAP tratados com veículo (Figuras 18D-E; $p < 0,05$). A deposição perivascular de colágeno foi significativamente maior em ratos SuHx do que em animais normoxia (Figura 18F; $p < 0,05$). Quatorze dias de administração oral de LASSBio-1824 em ratos com HAP reduziu significativamente a fibrose perivascular, quando comparado ao grupo SuHx tratado com veículo (Figura 18F; $p < 0,05$). A Figura 18G mostra que o relaxamento da AP induzido por ACh foi reduzido em animais com HAP em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$), indicando que o modelo SuHx induziu lesão endotelial nas APs, prejudicando a vasodilatação das artérias pulmonares mediada pelo endotélio. O tratamento com LASSBio-1824 aumentou a resposta a ACh em APs de ratos com HAP em comparação com ratos SuHx tratados com veículo (Figura 18G,I; $p < 0,05$). Não foram observadas alterações na resposta das artérias pulmonares a contração máxima induzida pela fenilefrina (Figura H). Finalmente, as Figuras 18J-L mostram a espessura da parede do vaso e o relaxamento induzido por ACh em APs, respectivamente, esses resultados estão correlacionados com a razão TAP/TET ($p < 0,05$). Logo, a hipertrofia da parede das APs distais e a disfunção endotelial subsequente podem ser responsáveis pela menor proporção entre TAP/TET nos ratos com HAP.

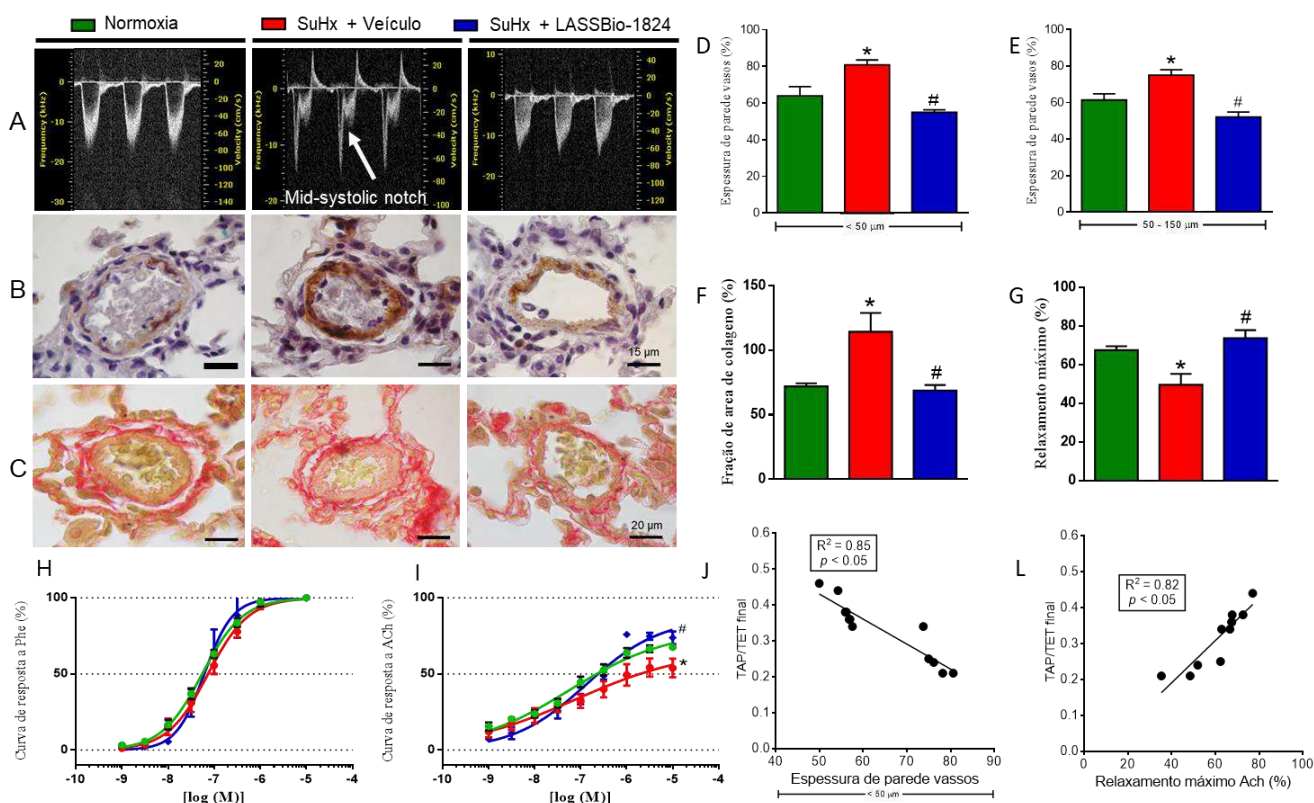


Figura 18: Efeitos da terapia com LASSBio-1824 nas alterações vasculares pulmonares observadas em ratos SuHx-HAP. (A) Imagens representativas do trato de saída do fluxo da AP de todos os grupos 35 dias após o início do protocolo. (B) Imunohistoquímica para α -SMA de APs distais de ratos expostos a normoxia ou protocolo SuHx por 5 semanas. (C) Coloração picrosirius red em APs ditais evidenciando fibras de colágeno em vermelho. (D) Espessura da parede expressa pela porcentagem da área total do vaso (50 μ m). (E) Espessura da parede dos vasos entre 50-150 μ m de diâmetro externo. (F) Área de colágeno perivascular. (G) Relaxamento de anéis de artéria pulmonar induzido por ACh. (H) Curva de resposta a Phe. (I) Curva de resposta a ACh. (J) Regressão linear entre a relação TAP/TET e a espessura da parede do vaso. (L) Regressão linear entre a razão TAP/TET e relaxamento induzido por ACh. Dados representam a média $\pm$ S.E.M. (n = 5 ratos por grupo). * P < 0,05 em comparação com o grupo normoxia; #P < 0,05 em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo. One-way ANOVA com múltiplas comparações. Teste *post hoc* de Tukey. SuHx, SU5416/hipóxia; HAP, hipertensão arterial pulmonar; AP, artéria pulmonar; α -SMA, alfa actina de músculo liso; TAP, tempo de aceleração da artéria pulmonar; TET, tempo de ejeção da artéria pulmonar; Phe, fenilefrina; ACh, acetilcolina.

4.1.4 Redução da sobrecarga e da hipertrofia concêntrica do VD pelo LASSBio-1824

O aumento da resistência vascular pulmonar no grupo SuHx + veículo resultou em pressões sistólicas do VD elevadas e débito cardíaco do VD gravemente reduzido (Figura 19C e tabela 3). A Figura 19A mostra imagens ecocardiográficas representativas do VD de todos os grupos experimentais obtidos pelo modo M. Cinco semanas de sobrecarga de VD induzida por SuHx

nos ratos com HAP resultaram em hipertrofia concêntrica do VD, como demonstrado pelo aumento significativo na espessura da parede livre do VD nos animais SuHx em comparação ao grupo normoxia (Figura 19D; $p < 0,05$). A hipertrofia do VD foi confirmada ainda mais devido a um aumento na proporção entre os pesos do VD e VE + S (índice de Fulton) em comparação com os homólogos da normoxia (Figura 19E; $p < 0,05$). A administração oral de LASSBio-1824 por 2 semanas reduziu a hipertrofia em ratos, conforme representado pela menor espessura da parede livre do VD e razão VD/VE+S, em comparação com os animais com HAP tratados com veículo (Figuras 19D-E; $p < 0,05$). Além disso, também foi detectada dilatação no VD na análise ecocardiográfica em ratos SuHx (Figura 19B). A área do VD do grupo HAP foi significativamente maior do que a encontrada no grupo normoxia (Figura 19F; $p < 0,05$). No entanto, ao final do protocolo, não houve diferença na área do VE entre os grupos experimentais (Figura 19G). Como esperado, o grupo SuHx teve um aumento significativo no PSVD em comparação com ratos normoxia (Figura 19H; $p < 0,05$). LASSBio-1824 reduziu de forma benéfica a área do VD e a PSVD quando administrada por via oral em ratos com HAP por 2 semanas (Figura 19F,H; $p < 0,05$).

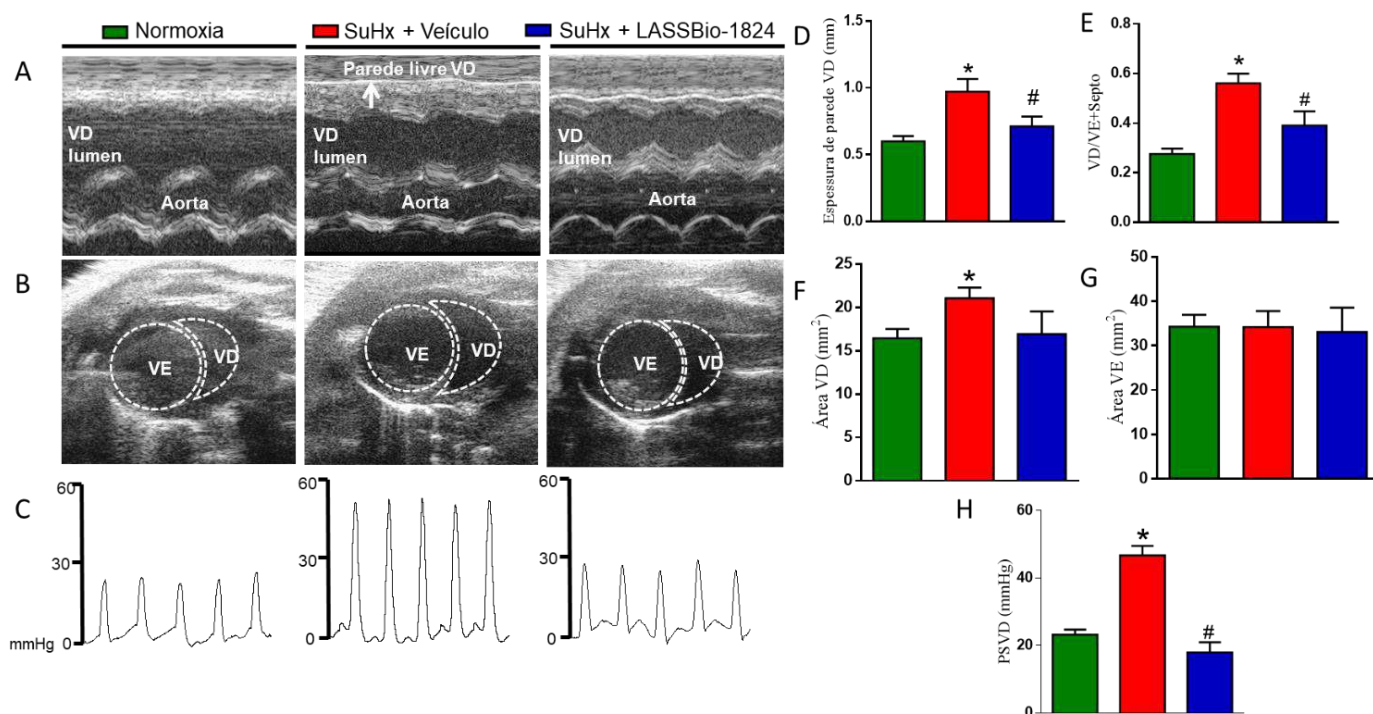


Figura 19: Efeitos do tratamento com veículo ou LASSBio-1824 na estrutura e função do coração de ratos SuHx-HAP. (A) imagens representativas da parede livre do VD obtidas pela ecocardiografia modo-M. (B) imagens representativas de incidências paraesternais no eixo curto obtidas por ecocardiografia modo B (em diástole final). (C) traçados representativos da PSVD. (D) espessura da parede livre do VD. (E) relação VD/VE + septo. (F) Área de VD. (G) Área do

VE. (H) PSVD. Dados representam a média $\pm$ S.E.M. (n = 5 ratos por grupo). * P <0,05 em comparação com o grupo normóxia; #P <0,05 em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo. *One-way* ANOVA com múltiplas comparações. Teste *post hoc* de Tukey. SuHx, SU5416/hipóxia; HAP, hipertensão arterial pulmonar; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo; PSVD, pressão sistólica do ventrículo direito.

4.1.5 Expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular, inflamação e apoptose em amostras de pulmão e VD – técnica de western blot

Imagens representativas de Western Blot de tecidos pulmonares de todos os grupos experimentais são mostradas na Figura 20A. Os níveis de TNF- α e iNOS aumentaram significativamente nos ratos SuHx tratados com veículo, em comparação com os seus pares de normoxia (Figuras 20B-C; p <0,05). A relação MAPK fosfo-p-38/MAPK p-38 aumentou no grupo SuHx em comparação aos ratos controle normoxia (Figuras 20D; p <0,05), e os níveis de caspase-3 ativa também foram maiores que os níveis do grupo normoxia (Figura 20E; p <0,05). Da mesma forma a relação fosfo-p-ERK-5/ERK-5 e a expressão de c-fos aumentaram significativamente no grupo SuHx (Figuras 20F-G; p <0,05). Quatorze dias de tratamento com LASSBio-1824 em ratos com HAP normalizaram completamente a expressão desses marcadores da HAP, em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo (Figura 20B-G; p <0,05). Imagens de Western blot do VD de todos os grupos experimentais são mostradas na Figura 21A. As Figuras 21B-G mostram que os níveis de proteínas TNF- α , iNOS, MAPK fosfo-p-38/ MAPK p-38, caspase-3 ativa, fosfo-p-ERK-5/ERK-5 e c-fos aumentaram no VD dos animais com HAP, em comparação com o grupo normoxia, respectivamente (p <0,05). O tratamento dos ratos SuHx com LASSBio-1824 normalizou a expressão de todas essas moléculas envolvidas na remodelação do VD, na progressão para uma câmara direita hipertrofiada com consequente desenvolvimento de disfunção, em comparação com animais com HAP tratados com veículo (Figuras 21B-G; p <0,05).

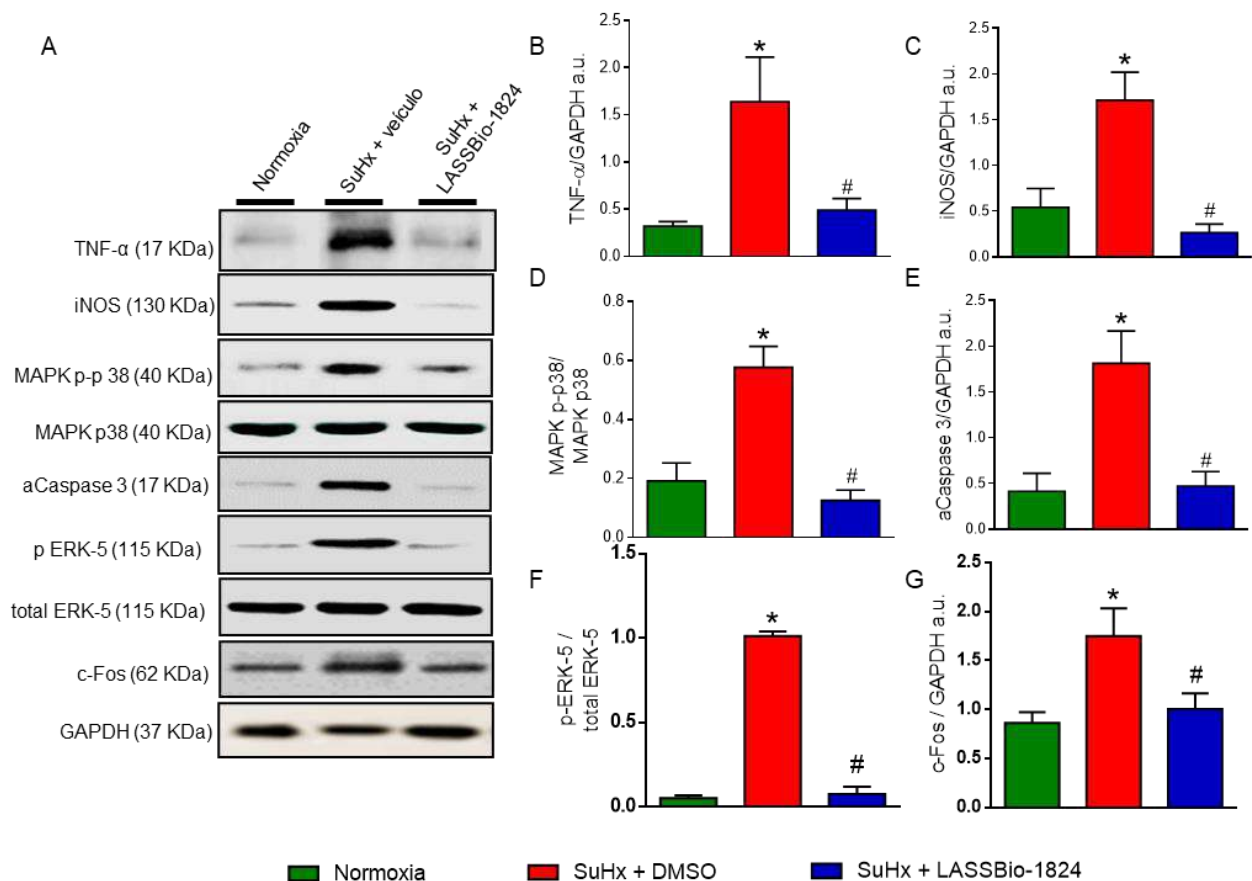


Figura 20: Efeitos do modelo SuHx na expressão de proteínas no pulmão ao longo de 35 dias do protocolo e tratamento oral com veículo ou LASSBio-1824 por 14 dias. A Figura (A) mostra imagens das diferentes membranas do western blot para TNF- α , iNOS, MAPK p-p38, MAPK p-38, caspase 3 ativa, p ERK-5, ERK-5 e c-fos, respectivamente. GAPDH foi usado para normalização. (B) Quantificação de TNF- α . (C) Quantificação da expressão de iNOS. (D) Razão entre a expressão relativa de MAPK p-p38 / MAPK p-38. (E) Quantificação da expressão da caspase 3 ativa. (F) quantificação da expressão relativa p-ERK-5/ERK-5. (G) quantificação da expressão de c-Fos. Dados representam a média $\pm$ S.E.M. (n = 5 ratos por grupo). * P < 0,05 em comparação com o grupo normoxia; #P < 0,05 em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo. One-way ANOVA com múltiplas comparações. Teste *post hoc* de Tukey. SuHx, SU5416/hipóxia; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; iNOS, NO sintase endotelial; MAPK p-p-38, MAPK p-38 fosforilada; MAPK p-38, proteína cinase ativada por mitôgeno p-38; p-ERK-5, proteína cinase regulada por estímulos extracelulares fosforilada; ERK-5, proteína cinase regulada por estímulos extracelulares.

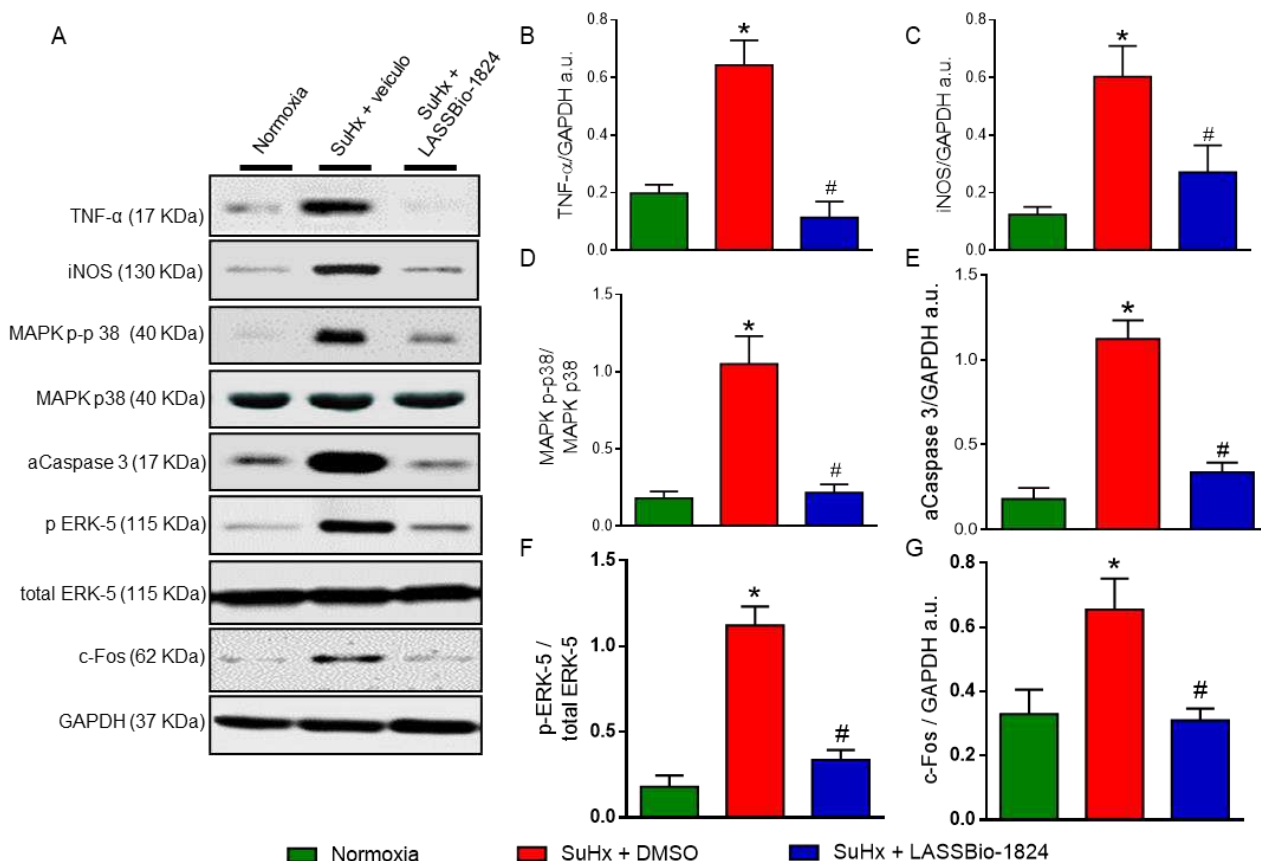


Figure 21: Efeitos do modelo SuHx na expressão de proteína do coração ao longo de 35 dias de protocolo e tratamento oral com veículo ou LASSBio-1824 por 14 dias. A Figura (A) mostra imagens das diferentes membranas do western blot de TNF- α , iNOS, MAPK p-p38, MAPK p-38, caspase 3 ativa, p-ERK-5, ERK-5 e c-fos no coração de todos os grupos. GAPDH foi usado para normalização. (B) Quantificação de TNF- α . (C) Quantificação da expressão de iNOS. (D) Razão entre a expressão relativa de MAPK p-p38 / MAPK p-38. (E) Quantificação da expressão da caspase 3 ativa. (F) quantificação da expressão relativa p-ERK-5/ERK-5. (G) quantificação da expressão de c-Fos. Dados representam a média $\pm$ S.E.M. (n = 5 ratos por grupo). * P < 0,05 em comparação com o grupo normoxia; #P < 0,05 em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo. One-way ANOVA com múltiplas comparações. Teste *post hoc* de Tukey. SuHx, SU5416/hipóxia; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; iNOS, NO sintase endotelial; MAPK p-p-38, MAPK p-38 fosforilada; MAPK p-38, proteína cinase ativada por mitôgeno p-38; p-ERK-5, proteína cinase regulada por estímulos extracelulares fosforilada; ERK-5, proteína cinase regulada por estímulos extracelulares.

4.1.6 Expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular, inflamação e apoptose em amostras de pulmão - técnica de imunohistoquímica.

Imagens representativas da marcação por imunohistoquímica de TNF- α , iNOS e MAPK p38 respectivamente, em tecidos pulmonares de todos os grupos experimentais (Figura 22A). Os níveis de TNF- α , iNOS e MAPK p38 aumentaram significativamente nos ratos SuHx tratados com veículo, em comparação com os

seus pares de normoxia (Figura 22B-D; $p < 0,05$). Após quatorze dias de tratamento oral com LASSBio-1824 ratos com HAP, atenuaram grandemente a inflamação dos vasos, normalizaram completamente a expressão desses marcadores, em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo (Figura 22B-D; $p < 0,05$).

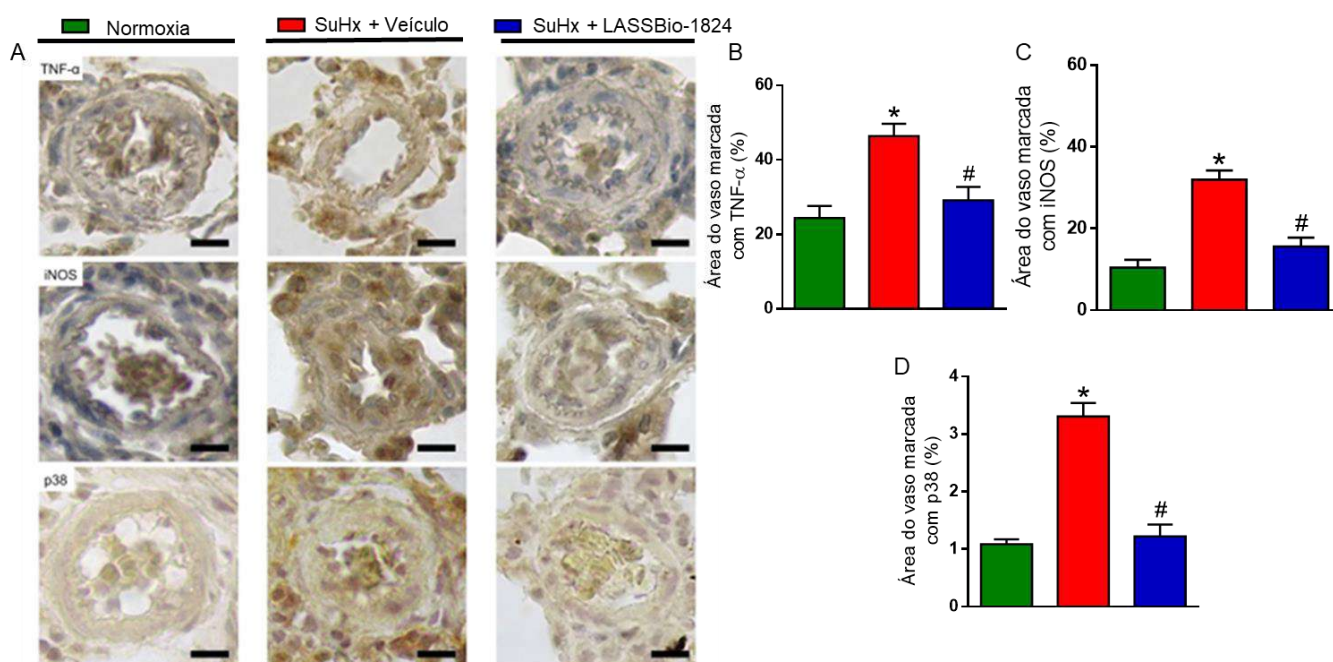


Figura 22: Efeitos do modelo SuHx na expressão de mediadores inflamatórios no pulmão ao longo de 35 dias do protocolo e tratamento oral com veículo ou LASSBio-1824 por 14 dias. A Figura (A) mostra imagens representativa da marcação por imunohistoquímica de TNF- α , iNOS e MAPK p38 respectivamente. (B) Quantificação de TNF- α . (C) Quantificação da expressão de iNOS. (D) Quantificação da expressão de MAPK p38. As barras representam 20 μ m. Dados representam a média $\pm$ S.E.M. ($n = 5$ ratos por grupo). * $P < 0,05$ em comparação com o grupo normoxia; # $P < 0,05$ em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo. One-way ANOVA com múltiplas comparações. Teste *post hoc* de Tukey. SuHx, SU5416/hipóxia; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; iNOS, NO sintase endotelial; MAPK p-p-38, MAPK p-38 fosforilada; MAPK p-38, proteína cinase ativada por mitôgeno p-38.

4.1.7 Reversão da fibrose do VD pelo LASSBio-1824

A Figura 23A mostra imagens representativas da deposição de colágeno no miocárdio do VD. O conteúdo de colágeno do VD foi significativamente aumentado no grupo SuHx, comparado aos ratos normoxia (Figura 23D; $p < 0,05$). E a administração de LASSBio-1824 em ratos com HAP reduziu a deposição de colágeno no miocárdio em comparação com ratos com HAP tratados com veículo (Figuras 23D; $p < 0,05$). O tratamento com LASSBio-1824

também reduziu a expressão de c-fos, uma proteína celular envolvida com proliferação celular. A Figura 23B representa imagens de imunohistoquímica para a marcação de c-fos em VD. Os animais SuHx apresentaram uma maior expressão de c-fos quando comparados aos controles de normoxia e SuHx tratados com LASSBio-1824 (Figuras 23E; $p < 0,05$). A redução da atividade desse fator de transcrição nos miócitos do VD indica possível inibição do programa gênico precoce e consequente disfunção celular e apoptose. Para avaliar o infiltrado inflamatório no VD a figura 23C apresenta imagens representativas da coloração de H&E, marcando núcleos do infiltrado celular inflamatório entre as fibras cardíacas, predominantemente fibroblastos modificados. Houve um aumento significativo no grupo SuHx, comparado aos ratos controle (Figura 23F; $p < 0,05$). A administração de LASSBio-1824 nos ratos com HAP foi efetiva na redução desse infiltrado inflamatório (Figura 23F; $p < 0,05$).

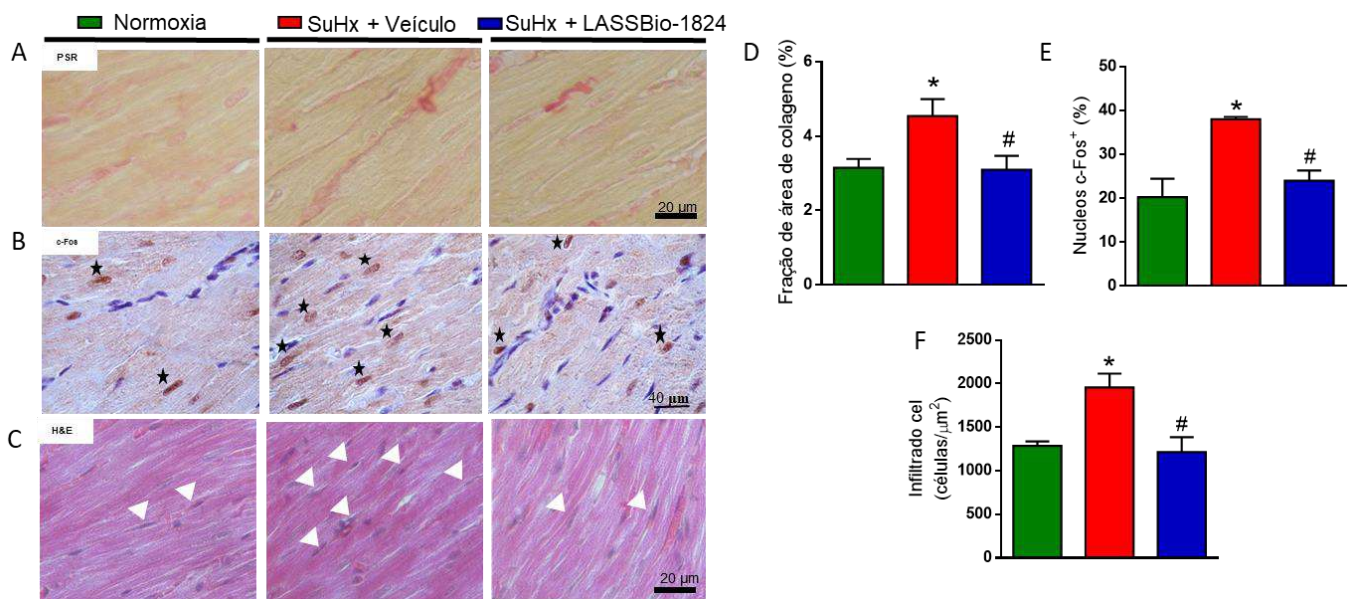


Figure 23: Efeitos da terapia com LASSBio-1824 na fração de colágeno e proliferação celular (expressão de c-Fos e infiltrado celular) no coração de animais normoxia e SuHx. (A) Coloração com picrossirius red mostrando fibras de colágeno em vermelho. (B) Imagens representativas da imunohistoquímica de c-Fos no VD de todos os grupos experimentais cardiomiócitos em marrom marcados com asteriscos. (C) Imagens histológicas representativas de coloração H&E em VD setas brancas evidenciam infiltrado celular. (D) Fração de área de colágeno (%). (E) Núcleos marcados para c-Fos+ (%). (F) Número de células intersticiais por μm^2 na área do VD. Dados representam a média $\pm$ S.E.M. ($n = 5$ ratos por grupo). * $P < 0,05$ em comparação com o grupo normoxia; # $P < 0,05$ em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo. One-way ANOVA com múltiplas comparações. Teste *post hoc* de Tukey. SuHx, SU5416/hipóxia. PSR, picro-Sirius red; H&E, hematoxilina-eosina.

5.0 DISCUSSÃO

Embora ainda não existam modelos animais de HAP com similaridade em todos os aspectos fisiopatológicos e de severidade da doença em humanos (Stenmark *et al.*, 2009), os diferentes modelos MCT e SuHx dão suporte à ideia de que a HAP 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). O desenvolvimento de HAP 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 comuns. Essas mudanças vasculares em pacientes com HAP são de fato mais leves e menos robustas do que acontece em modelos animais da doença (Hoshikawa *et al.*, 2003).

A investigação dos efeitos terapêuticos de LASSBio-1824 sobre a HAP, iniciou-se utilizando os modelos induzidos por MCT e SuHx, em dose de 20mg/kg por via de administração intraperitoneal. Nesses grupos experimentais foram analisadas características definidoras da HAP. A redução do TAP, uma medida indireta da RVP e por consequência o aumento da PSVD foi observado nos animais com HAP tratados com veículo em ambos os grupos experimentais (MCT e SuHx), e o tratamento com LASSBio-1824 reverteu essas características. O aumento da RVP está diretamente relacionado as alterações vasculares de hipertrofia e aumento da espessura de parede dos vasos, assim como ao infiltrado celular inflamatório que se dirige para as camadas dos vasos (Schermuly *et al.*, 2011; Humbert *et al.*, 2018). Com a redução do lumem vascular e consequente aumento da RVP, eleva-se a pós carga do VD, que passa a trabalhar sobre pressão maior para garantir a homeostase sanguínea, por isso o VD desenvolve maior espessura da parede livre e área (Anton Vonk-Noordegraaf *et al.*, 2013). A reversão desta espessura nos modelos apresentados, reforça a efetividade da inibição da MAPK p38 α na fisiopatologia da HAP.

Como o modelo SuHx é reconhecido por causar lesões pulmonares e insuficiência cardíaca que melhor reproduzem o cenário clínico em humanos, a proliferação celular é predominantemente pré-capilar em células endoteliais

podendo levar a formação de lesões plexiformes (Stenmark *et al.*, 2009), a continuidade da investigação sobre a inibição da MAPK p38 α com o uso de LASSBio-1824 foi realizada no modelo SuHx através do tratamento com 50mg/kg, por via oral. Além disso, a injeção de SU-5416 afeta apenas os receptores presentes nas células endoteliais pulmonares e não em outros órgãos (Burke *et al.*, 2009). Devido à gravidade do modelo SuHx-5416, com a formação de lesões na camada íntima e a natureza progressiva da doença em roedores, esse modelo experimental tem sido atualmente o mais usado para o estudo de novas terapias para o tratamento da HAP (Stenmark *et al.*, 2009). No processo de desenvolvimento de fármacos a via de administração oral é preferida às várias outras vias de administração de medicamentos e em função das vantagens como maior segurança, conforto do paciente e facilidade de ingestão foi interessante a continuidade utilizando a administração por via oral (Zhang *et al.*, 2017).

SU-5416 é um potente inibidor do receptor tirosina cinase de VEGF (Sukbuntherng *et al.*, 2001). Nos últimos anos foi aplicado em terapias oncológicas, uma vez estabelecido o papel essencial da angiogênese no crescimento expansivo de tumores (Folkman *et al.*, 1999). Benefícios clínicos foram observados como a regressão de tumores e estabilização da doença em pacientes com câncer terminal (Stopeck *et al.*, 2002). No entanto, um estudo randomizado de fase III não mostrou benefício clínico significativo, embora alguns pacientes tenham apresentado respostas surpreendentes (Shawver *et al.*, 2002). Contudo, o bloqueio do receptor de VEGF induzido pelo SU5416 combinado com hipóxia crônica resulta em HAP angio proliferativa grave com alterações na neointima em vasos de ratos adultos. O VEGF é um fator de sobrevivência obrigatório para CE, uma vez que a retirada de VEGF induz apoptose, sendo crítico para o desenvolvimento pulmonar e para adequada permeabilidade vascular (Voelkel *et al.*, 2006). A sua atividade biológica depende da reação com receptores específicos que pertencem à família de receptores tirosina cinase (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1 (KDR), e VEGFR-3 (Flt-4)) – (Mura *et al.*, 2004). A hipóxia desempenha um papel fundamental na expressão do gene VEGF tanto *in vivo* como *in vitro*, há maior expressão de mRNA de VEGF após exposição a baixa tensão de oxigênio (Ferrara *et al.*, 1999), exercendo efeito sinérgico com fatores de crescimento locais. A hipótese para o mecanismo de ação de SU5416 sobre VEGF-R, relaciona-se ao fato de

SU5416 concentrar-se preferencialmente na CE, e que essas células mantêm uma concentração inibitória de SU5416 por um período prolongado (Mendel et al, 2000). A capacidade das células endoteliais de concentrar SU5416 pode ser devido à natureza hidrofóbica do composto, podendo ser sequestrado na membrana lipídica da célula. Coerente com esta hipótese experimentos de fracionamento celular usando células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) sugeriu que o SU5416 está concentrado em fração de membrana das células, de modo a manter concentrações inibitórias no ambiente local do receptor quinase Flk-1/KDR associado à membrana (Mendel et al, 2000), o que explica a ação sobre o receptor de VEGF. A inibição do receptor de VEGF junto a hipoxia leva a uma resistência a apoptose e por isso a proliferação nesse modelo fica extremamente aumentada (Figura 24).

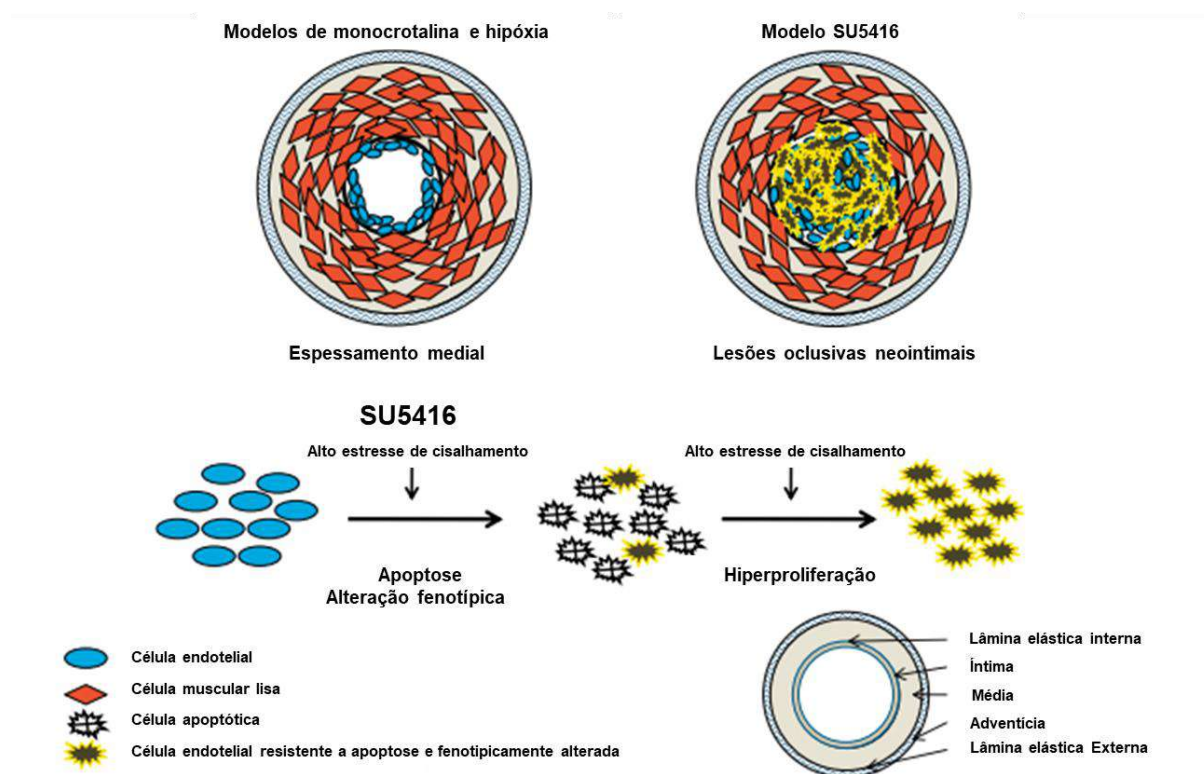


Figura 24: Remodelamento vascular pulmonar no modelo SU5416 para HAP. Adaptado de Sakao et al, 2011.

A isoforma MAPK p38 α apresenta papel importante no remodelamento cardíaco e vascular da HP (Church et al., 2015) devido ao fato de sua inibição em dois modelos distintos de HP ter impedido ou revertido as características da doença, principalmente nos pulmões. Também foi previamente descrito maior

expressão e atividade de MAPK fosfo-p-38 α nos vasos pulmonares de pacientes com HAP idiopática (Church et al., 2015). A inibição da MAPK p38 α melhorou a função do VD em dois protocolos experimentais de hipertrofia do VD induzida por sobrecarga de pressão (hipóxia crônica e bandagem da artéria pulmonar em camundongos) e foi reforçada a hipótese de que existe maior expressão de MAPK fosfo-p-38 α porque foi detectada aumentada expressão em células de VD de humanos com HAP idiopático (Kojonazarov et al., 2017; Weiss et al, 2021).

Este trabalho apresenta de forma inédita, os efeitos de um novo inibidor da MAPK p38 α quando administrados por via oral em ratos com HAP induzida pela combinação de hipóxia crônica e injeções de um inibidor do receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (SU5416). Este modelo simula várias características fisiopatológicas da HAP em humanos, tanto histológicas como hemodinâmicas (Taraseviciene-Stewart et al., 2001; Abe et al., 2010; Toba et al., 2014; Vitali et al., 2014). A administração oral por 14 dias com LASSBio-1824 reduziu várias características da HAP tais como o fluxo nas APs, remodelamento e hipertrofia da parede dos vasos, disfunção vascular, sobrecarga e disfunção do VD, remodelamento e hipertrofia do miocárdio. Assim, nossos dados trazem para o campo de pesquisa sobre HAP importantes complementos a fim de se reafirmar a hipótese de considerar a inibição da MAPK p38 α como uma alternativa no tratamento desta doença cardiopulmonar e incentiva investigações clínicas adicionais.

Atualmente, é considerado que a disfunção endotelial na HAP ocorra inicialmente devido a alterações no fenótipo de células endoteliais que liberam excessivamente fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e vasoconstritores (Humbert et al., 2018). Fatores de crescimento e citocinas ativam seus receptores na superfície da membrana celular nos vasos, mediando assim a fosforilação intracelular e subsequente ativação de MAPK p38 α . Quando ativada p38 transloca do citoplasma para o núcleo e fosforila fatores de transcrição envolvidos na inflamação, proliferação celular e apoptose (Burton et al, 2021; Canovas et al, 2021). Assim, desencadeia-se um processo patológico caracterizado por proliferação celular exacerbada, resistência à apoptose e inflamação nas células vasculares pulmonares de indivíduos com HAP (Moreno-Vinasco et al., 2008; Rajkumar et al., 2010; Goncharov et al., 2014; Church et al., 2015). Essas alterações esclarecem o remodelamento vascular na pequena

circulação (Huertas et al, 2018), a hipertrofia da parede de APs e o desenvolvimento de disfunção do VD com falência subsequente na HAP. A relevância da ativação do MAPK p38 na patogênese da HP é evidenciada pelo seu envolvimento em diferentes processos celulares, conferindo um caráter multifatorial de ação (Cuadrado et al, 2010; Burton et al, 2021; Canovas et al, 2021).

O remodelamento da parede dos vasos pulmonares, o espessamento e a vasoconstrição desregulada podem ser inicialmente desencadeados pelas células endoteliais pulmonares lesadas na HAP (Humbert et al., 2018). Neste estudo, embora não tenhamos encontrado a formação de lesões plexiformes obliterativas nos vasos pulmonares, provavelmente porque o tratamento foi iniciado após as 3 semanas no ambiente de hipoxia, ao contrário de trabalhos em que os animais se mantiveram em ambiente de normoxia por cerca de 10 semanas após a hipoxia (Abe et al, 2010, Vkitali et al 2014), a espessura da parede do vaso e o conteúdo de colágeno perivascular foram maiores nos APs distais dos animais SuHx do que nas arteríolas do grupo controle normoxia. Assim, assumimos que no modelo de HAP utilizado ocorreu remodelamento vascular pulmonar com subsequente hipertrofia da parede de AP e que essas alterações causaram um aumento na resistência vascular pulmonar e redução do fluxo sanguíneo através da circulação pulmonar, uma vez que as medidas finais das relações TAP/TET se correlacionaram significativamente com a espessura da parede de APs distais. A inibição da MAPK p38, isoforma p38 α , induzida pela administração de LASSBio-1824 por 2 semanas reduziu de maneira benéfica a deposição de colágeno perivascular pulmonar, remodelamento da parede dos vasos e hipertrofia medial em APs distais.

A reduzida vasodilatação induzida por ACh em APs pode ser resultado de um comprometimento da produção dependente de endotélio de moléculas vasodilatadoras, como o óxido nítrico (Tuder et al., 2001), e um enrijecimento na parede dos vasos, o que favorece uma vasoconstrição anormal nos pulmões no modelo de HAP induzido pelo SuHx. Este aspecto também contribui para aumentar a resistência vascular pulmonar e obstruir o fluxo sanguíneo pulmonar, detectado pela correlação significativa entre as relações TAP/TET e o relaxamento máximo induzido por ACh. A administração de LASSBio-1824

melhorou a disfunção vascular indicando que o componente endotelial que regula tônus vascular pulmonar foi recuperado pelo inibidor de MAPK p38 α .

A presente pesquisa investigou a expressão de alguns marcadores da HAP nos pulmões de todos os grupos experimentais. A aumentada expressão de TNF- α nas amostras pulmonares dos animais com HAP é condizente com a descrição de que os níveis circulantes de TNF- α estão aumentados em pacientes com HAP (Itoh et al., 2006). O TNF- α é expresso localmente na parede dos vasos pulmonares de pacientes com HAP e sua sinalização promove, aumento da permeabilidade do endotélio, infiltração de leucócitos, e agravamento da inflamação e remodelamento vascular pulmonar (Hurst et al., 2017) que estimula a sinalização da MAPK p38 (Ferrero et al., 2001) e, que na condição de HAP, está anormal e contribui para proliferação aberrante de células dos vasos pulmonares, remodelamento vascular, inflamação local e desenvolvimento de hipertrofia da parede de APs (Church et al., 2015). A proliferação de células do músculo liso das APs também participa do processo de iniciar ou manter a hipertrofia dos vasos pulmonares em pacientes com HAP (Zhang et al., 2003). A ativação da MAPK p38 promove a regulação positiva da iNOS nessas células na HAP, que induz a resistência a apoptose, potencializando o espessamento medial vascular pulmonar e a hipertrofia da parede do vaso (Jin et al., 2014). Este fato foi demonstrado neste trabalho com a detecção de aumento da expressão de iNOS nos tecidos pulmonares de ratos com HAP, que poderia contribuir para o remodelamento e hipertrofia vascular pulmonar. Nossos dados demonstram não apenas um aumento na expressão de iNOS e TNF- α , mas também maior conteúdo de p38 em vasos pulmonares de ratos SuHx, o que indica sinalização anormal de MAPK p38 nessas arteríolas remodeladas. A avaliação da expressão de caspase-3 ativa em pulmão foi importante pois esta proteína pode desencadear a apoptose de células endoteliais sendo mecanismo inicial na obliteração das APs na HAP devido a uma degeneração da estrutura do endotélio pulmonar (Zhao et al., 2005; White; et al., 2014). Após observar os níveis mais altos de caspase-3 ativa no pulmão de ratos com HAP houve a confirmação do desequilíbrio induzido pela hipoxia e o uso de SU5416. Uma vez que a presença de células resistentes a apoptose mantinha uma proliferação desregulada dos componentes dos vasos pulmonares, concomitante ao processo de apoptose. Esse desequilíbrio ocorre devido a inibição de VEGF por

SU5416 junto ao estímulo proliferativo da hipoxia, levando a uma resistência a função de apoptose. E LASSBio-1824 agiu sobre esse desequilíbrio reduzindo proliferação celular e o estímulo a apoptose, assim como, normalizou o teor de p38, presumivelmente limitando a sinalização através desta MAPK e reduzindo a concentração de TNF- α e iNOS nas arteríolas.

A proteína nuclear c-Fos relaciona-se aos processos proliferativos e sua ativação está diretamente relacionada a fosforilação por MAPK p38 α . Fatores estressantes presentes na HAP como citocinas inflamatórias ativam MAPK p38 α que transloca-se para o núcleo celular onde fosforila o fator de transcrição SRF para c-Fos, que constitui fator de transcrição para AP-1, proteína ligada a regulação subsequente da expressão de genes envolvidos no reparo do DNA, proliferação celular, parada do ciclo celular, morte por apoptose e proteases de remodelação da matriz extracelular (Tanos et al, 2005). Nos pulmões de animais com HAP, o processo proliferativo foi observado tanto nos achados histológicos com o aumento da marcação de α SMA, assim como pelo aumento da expressão de marcadores moleculares como c-Fos. Da mesma forma a via de ERK5, uma outra cinase, que em muitos dos processos patológicos da HAP (Sabzali Javadov et al, 2014), atua de forma sinérgica a MAPK p38 α também teve sua expressão aumentada nos animais HAP tratados apenas com veículo.

A administração oral de LASSBio-1824 atenuou os efeitos prejudiciais acima mencionados da HAP, em parte, limitando as vias de sinalização de TNF- α , MAPK p38, iNOS, caspase-3 ativa, c-Fos e ERK5 nos pulmões de animais com HAP.

A sobrecarga persistente sobre o VD induzida pela HAP promove uma adaptação na estrutura dessa câmara (Kojonazarov et al, 2017). O aumento da pressão sistólica do VD foi encontrado em Ratos SuHx, o que afetou a estrutura e função do VD, visto pelos índices de hipertrofia e dilatação. Por meio da ecocardiografia foi observado maior espessura da parede livre do VD e área do VD na diástole final induzidas pela HAP, assim como também aumento da relação VD/VE + S em comparação com o grupo controle. A disfunção do VD foi evidenciada pela redução do DCVD sem disfunção cardíaca global, evidenciado por hipertrofia concêntrica de VD não suficiente para causar movimento septal interventricular e disfunção do VE. Não houve alteração da área do VE, PSVE, VSVE, frequência cardíaca e DCVE, comprovando que o VE manteve a função

preservada. No entanto, o VD dos animais com HAP se apresentaram em transição para um estado compensatório na função cardíaca global que poderia evoluir para uma dilatação progressiva e irreversível. Provavelmente, uma expansão do tempo de protocolo poderia levar a disfunção cardíaca global. É de grande importância mencionar que o período de 14 dias de tratamento com LASSBio-1824 parece atuar seletivamente nas alterações do sistema cardiopulmonar. Após o tratamento com LASSBio-1824 esses parâmetros alterados foram semelhantes aos controles, provavelmente devido à atenuação do remodelamento e consequente pós-carga, uma vez que a sinalização da MAPK p38 também está diretamente implicada no remodelamento ventricular (Kojonazarov et al, 2017).

O processo hipertrófico do VD pode estar relacionado ao maior conteúdo de colágeno no miocárdio, comprovado pela maior marcação de fibras colágenas na coloração de picrosirius red nos animais com HAP, contribuindo para a adaptação (fibrose/remodelação) e disfunção do VD. TNF- α tem um papel no desenvolvimento da hipertrofia do VD (Kubota et al., 1997; Smith et al., 2001; Jobe et al., 2009) e seu envolvimento na transição da hipertrofia do VD de compensada para descompensada tem sido descrito (Tang et al., 2015). A regulação positiva da iNOS no VD de ratos com HAP está envolvida no desenvolvimento de falha do VD (Imoto et al., 2018). Esses achados corroboram com os resultados encontrados, pois foi observada uma maior expressão de TNF- α e iNOS em VD de ratos com HAP. A razão MAPK fosfo-p-38/MAPK-p-38 também foi maior nas amostras de VD de ratos HAP assim como a relação de fosfo-p-ERK-5/ERK-5 que são cinases envolvidas em estresse oxidativo, proliferação celular, inflamação e hipertrofia cardíaca (Sabzali Javadov et al, 2014). A maior expressão de caspase-3 ativa no VD indica adicionalmente que o processo de apoptose se iniciou e que possivelmente o VD estava em transição para um fenótipo de insuficiência. Além disso, a elevada expressão molecular de c-Fos corrobora a presença de processo apoptótico, que indica presença de processo proliferativo no coração. Assim, o tratamento com LASSBio-1824 atenuou a hipertrofia, disfunção e remodelamento do VD, devido à evidente normalização do conteúdo de colágeno do VD, níveis de expressão de TNF- α , iNOS, fosfo-p-38 MAPK, caspase-3 ativa, c-Fos e fosfo-ERK5 ao final do protocolo (Figura 25).

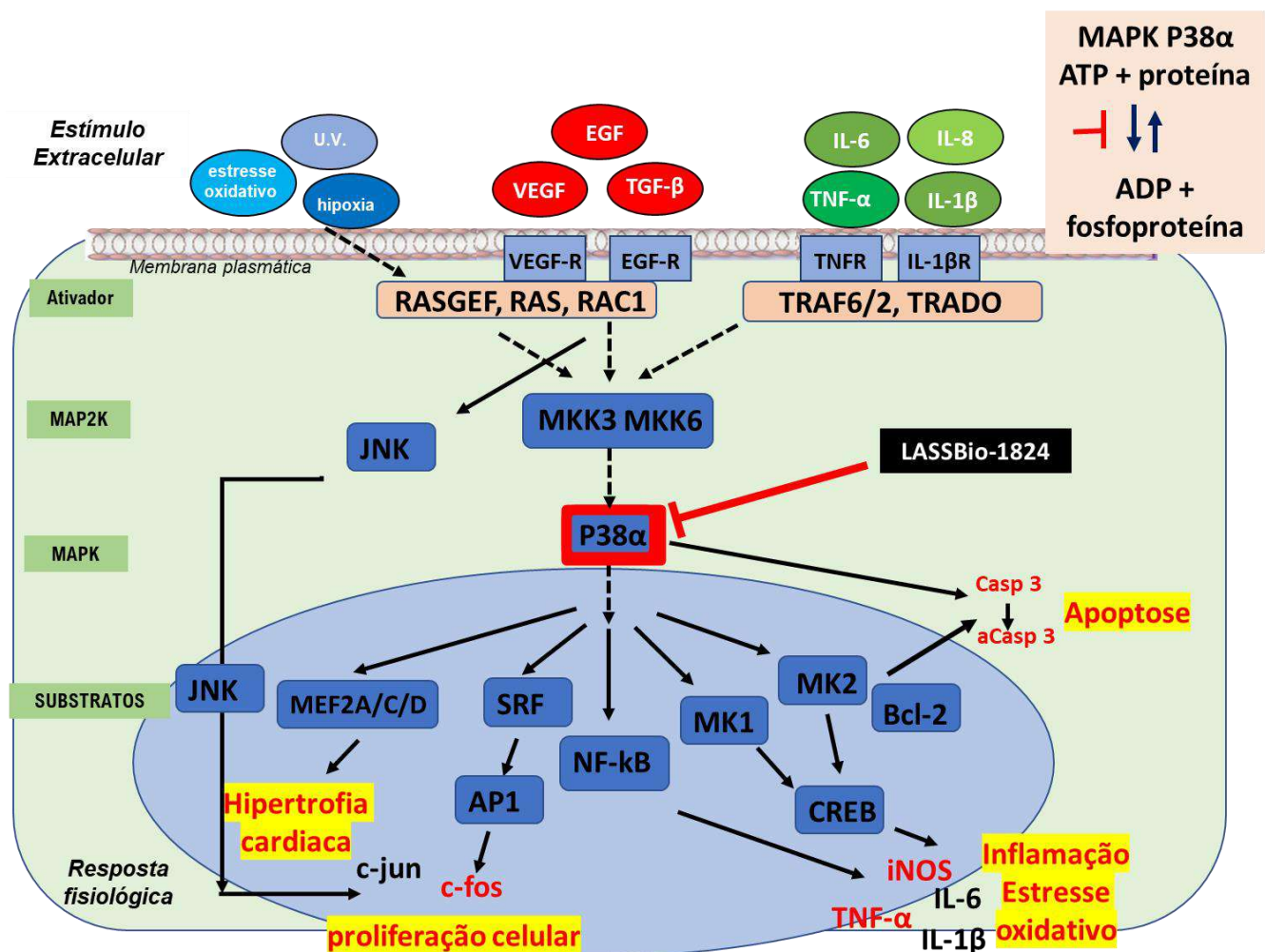


Figura 25: Representação esquemática dos sítios moleculares envolvidos na via da MAPK p38α e mecanismo de ação do LASSBio-1824 proposto por docking computacional. As setas pontilhadas indicam a cascata de ativação da MAPK p38α desencadeada por estresse ambiental, fatores de crescimento e citocinas inflamatórias. As setas cheias indicam os efeitos promovidos no pulmão e VD de ratos SuHx com HP pela ativação da via, enquanto as setas vermelhas indicam a ação do LASSBio-1824 na MAPK p38α. MAPK p38α, proteína cinase ativada por mitógeno alfa; SuHx, SU5416/hipóxia; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; TNF-R, receptor de TNF-α; casp 3, caspase-3; aCasp 3, caspase-3 ativa; iNOS, sintase de óxido nítrico induzível; IL-1β, Interleucina-1beta; IL-1β-R, receptor de IL-1β; IL-6, Interleucina-6; IL-8, Interleucina-8; ATP, trifosfato de adenosina; ADP, difosfato de adenosina; UV, ultra-violeta; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; VEGF-R, receptor de VEGF; EGF, fator de crescimento epidérmico; EGF-R, receptor de EGF; TGF-β, fator de transformação de crescimento beta; AP-1, proteína ativadora 1; FRS, fator de resposta sérica; JNK, c-juno amino cinase terminal; NF-kB, fator nuclear kappa; MKs; proteínas cinases ativadas por MAPK; MEF, fator potenciador de miócitos; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta a c-AMP; Bcl-2; B-cell lymphoma 2; RAS; derivado do inglês: RAt Sarcoma vírus, ou vírus do sarcoma de rato (proteína transdutora de sinal extracelular); RASGEF, RAS associada a fatores de troca de nucleotídeos de guanina (proteína transdutora de sinal extracelular); RAC1, substrato 1 de toxina botulínica C3

relacionada a Ras (proteína transdutora de sinal extracelular); TRAF, fator de necrose tumoral associado ao receptor (proteína transdutora de sinal extracelular).

De fato, não podemos afirmar que LASSBio-1824 seja seletivo para a isoforma alfa de MAPK p38, pois não há dados referentes a ação em outras isoenzimas dessa família de cinases, como as isoformas β , γ e δ . No entanto, LASSBio-1824 apresentou melhor perfil anti-inflamatório e antiproliferativo do que o inibidor seletivo de MAPK p38 α (SB203580). LASSBio-1824 produziu uma redução acentuada na produção de TNF- α , e o mesmo comportamento não foi observado com SB203580 (Freitas et al., 2018).

6.0 CONCLUSÃO

Apesar de ambos os modelos de HAP utilizados não apresentar lesões plexiformes e insuficiência cardíaca descompensada, LASSBio-1824, através da inibição da MAPK p38 α , contribuiu para a reparação das alterações no pulmão e VD, reforçando a importância de considerar a MAPK p38 α como alvo terapêutico para a HAP.

7.0 REFERÊNCIAS

1. Galiè, N., McLaughlin, V. V., Rubin, L. J., & Simonneau, G. (2018). *An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. European Respiratory Journal*, 1802148. doi:10.1183/13993003.02148-2018
2. Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., ... Souza, R. (2018). *Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. European Respiratory Journal*, 1801913. doi:10.1183/13993003.01913-2018
3. McGoon, M. D., Benza, R. L., Escribano-Subias, P., Jiang, X., Miller, D. P., Peacock, A. J., et al. (2013). Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62(25 Suppl), D51–D59. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.023
4. MEMON, H.A. & PARK, M.H. Pulmonary arterial hypertension in women. *Methodist Debaque Cardiovasc J.* v. 13, n. 4, p. 224-237, 2017. DOI: 10.14797/mdcj-13-4-224. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29744015>.
5. WIJERATNE, D.T. et al. Increasing incidence and prevalence of World Health Organization groups 1 to 4 pulmonary hypertension - A population-based cohort study in Ontario, Canada. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* v. 11, n. 2, 2018. DOI: 10.1161/CIRCOUTCOMES.117.003973. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29444925>.
6. Hoeper, M. M., Humbert, M., Souza, R., Idrees, M., Kawut, S. M., Sliwa-Hahnle, K., ... Gibbs, J. S. R. (2016). A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet Respiratory Medicine*, 4(4), 306–322. doi:10.1016/s2213-2600(15)00543-3
7. Hoeper, M.M.; Ghofrani, H.-A.; Grünig, E.; Klose, H.; Olschewski, H.; Rosenkranz, S. Pulmonary Hypertension. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2017, 114, 73–84, doi: 10.3238/arztebl.2017.007
8. Beshay S, Sahay S, Humbert M. Evaluation and management of pulmonary arterial hypertension. *Respir Med.* 2020;171:106099. doi: 10.1016/j.rmed.2020.106099
9. Fernandes, Caio Julio Cesar Dos Santos; Jardim, Carlos Viana Poyares; Hovnanian, André; Hoette, Susana; Morinaga, Luciana Kato; Souza, Rogerio (2011). Schistosomiasis and pulmonary hypertension. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 5(5), 675–681. doi:10.1586/ers.11.58
10. Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V., ... Simonneau, G. (2006). *Pulmonary Arterial Hypertension in France. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(9), 1023–1030. doi:10.1164/rccm.200510-1668oc Ling Y. et al. 2012

11. Newman, J. H., Wheeler, L., Lane, K. B., Loyd, E., Gaddipati, R., Phillips, J. A., & Loyd, J. E. (2001). *Mutation in the Gene for Bone Morphogenetic Protein Receptor II as a Cause of Primary Pulmonary Hypertension in a Large Kindred. New England Journal of Medicine*, 345(5), 319–324. doi:10.1056/nejm200108023450502 Badesch, D. B. et al 2010
12. Badesch, D. B., Raskob, G. E., Elliott, C. G., Krichman, A. M., Farber, H. W., Frost, A. E., ... McGoon, M. D. (2010). *Pulmonary Arterial Hypertension. Chest*, 137(2), 376–387. doi:10.1378/chest.09-1140
13. Zhang, R., Dai, L.-Z., Xie, W.-P., Yu, Z.-X., Wu, B.-X., Pan, L., ... Jing, Z.-C. (2011). *Survival of Chinese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension in the Modern Treatment Era. Chest*, 140(2), 301–309. doi:10.1378/chest.10-2327
14. ALVES, J. L. et al. Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere - results from a registry of incident Brazilian cases. **Chest**. v. 147, n. 2, p. 495-501, 2015. DOI: 10.1378/chest.14-1036. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25317567>
15. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med*. 1987;107(2):216-223. doi: 10.7326/0003-4819-107-2-216
16. Lau, E. M. T., Giannoulatou, E., Celermajer, D. S., & Humbert, M. (2017). *Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. Nature Reviews Cardiology*, 14(10), 603–614. doi:10.1038/nrcardio.2017.84
17. Benza RL, Miller DP, Barst RJ, Badesch DB, Frost AE, McGoon MD. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest*. 2012;142(2):448-456. doi: 10.1378/chest.11-1460
18. Levine, D.J. Pulmonary Arterial Hypertension: Updates in Epidemiology and Evaluation of Patients. *Am J Manag Care*. 2021;27:S35-S41. doi.org/10.37765/ajmc.2021.88609
19. Humbert, M., Guignabert, C., Bonnet, S., Dorfmueller, P., Klinger, J. R., Nicolls, M. R., ... Rabinovitch, M. (2018). *Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. European Respiratory Journal*, 1801887. doi:10.1183/13993003.01887-2018
20. Humbert, M., Morrell, N. W., Archer, S. L., Stenmark, K. R., MacLean, M. R., Lang, I. M., ... Rabinovitch, M. (2004). *Cellular and molecular*

- pathobiology of pulmonary arterial hypertension. Journal of the American College of Cardiology*, 43(12), S13–S24. doi:10.1016/j.jacc.2004.02.029
21. Rabinovitch, M. (2007). *Pathobiology of Pulmonary Hypertension. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2(1), 369–399. doi:10.1146/annurev.pathol.2.010506.09
 22. Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (2008). *Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(1), 14–30. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.09.006
 23. Humbert, M., Lau, E. M. T., Montani, D., Jais, X., Sitbon, O., & Simonneau, G. (2014). *Advances in Therapeutic Interventions for Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. Circulation*, 130(24), 2189–2208. doi:10.1161/circulationaha.114.006974
 24. Lechartier, B., Berrebeh, N., Huertas, A., Humbert, M., Guignabert, C., & Tu, L. (2021). Phenotypic Diversity of Vascular Smooth Muscle Cells in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest*. doi:10.1016/j.chest.2021.08.040
 25. Rajagopal, S.; Yu, Y.-R.A. The Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiol. Clin.* 2022, 40, 1–12. DOI: 10.1016/j.ccl.2021.08.001
 26. Pugliese, S. C., Poth, J. M., Fini, M. A., Olschewski, A., El Kasmi, K. C., & Stenmark, K. R. (2015). The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308(3), L229–L252. doi:10.1152/ajplung.00238.2014
 27. Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J., & McMurtry, I. F. (2009). *Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(6), L1013–L1032. doi:10.1152/ajplung.00217.2009
 28. 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.
 29. MEYRICK, B. The pathology of pulmonary artery hypertension. **Clin Chest Med**, v. 22, n. 3, p. 393-404, vii, Sep 2001.
 30. Tuder, R. M., Marecki, J. C., Richter, A., Fijalkowska, I., & Flores, S. (2007). *Pathology of Pulmonary Hypertension. Clinics in Chest Medicine*, 28(1), 23–42. doi:10.1016/j.ccm.2006.11.010

31. HEATH, D., & EDWARDS, J. E. (1958). *The Pathology of Hypertensive Pulmonary Vascular Disease: A Description of Six Grades of Structural Changes in the Pulmonary Arteries with Special Reference to Congenital Cardiac Septal Defects.* *Circulation*, 18(4), 533–547. doi:10.1161/01.cir.18.4.533
32. Dasgupta, A., Bowman, L., D'Arsigny, C., & Archer, S. (2014). *Soluble Guanylate Cyclase: A New Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.* *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 97(1), 88–102. doi:10.1002/cpt.10
33. Hoffman, J. I., Rudolph, A. M., & Heymann, M. A. (1981). *Pulmonary vascular disease with congenital heart lesions: pathologic features and causes.* *Circulation*, 64(5), 873–877. doi:10.1161/01.cir.64.5.873
34. Egito, E. S. E. T., Aiello, V. D., Bosisio, I. B. J., Lichtenfels, A. J., Horta, A. L. M., Saldiva, P. H. N., & Capelozzi, V. L. (2003). *Vascular Remodeling Process in Reversibility of Pulmonary Arterial Hypertension Secondary to Congenital Heart Disease.* *Pathology - Research and Practice*, 199(8), 521–532. doi:10.1078/0344-0338-00457
35. Yamaki, S., Kumate, M., Yonesaka, S., Maeda, K., Endo, M., & Tabayashi, K. (2004). *Lung Biopsy Diagnosis of Operative Indication in Secundum Atrial Septal Defect With Severe Pulmonary Vascular Disease.* *Chest*, 126(4), 1042–1047. doi:10.1378/chest.126.4.1042
36. Sakao, S., Tatsumi, K., & Voelkel, N. F. (2009). *Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation.* *Respiratory Research*, 10(1). doi:10.1186/1465-9921-10-95
37. Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., & Grimminger, F. (2011). *Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension.* *Nature Reviews Cardiology*, 8(8), 443–455. doi:10.1038/nrcardio.2011.87
38. Hanahan, D. (1997). *Signaling Vascular Morphogenesis and Maintenance.* *Science*, 277(5322), 48–50. doi:10.1126/science.277.5322.48
39. Eddahibi, S., Guignabert, C., Barlier-Mur, A. M., Dewachter, L., Fadel, E., Darteville, P., ... Adnot, S. (2006). *Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension: Critical Role for Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia.* *Circulation*, 113(15), 1857–1864. doi:10.1161/circulationaha.105.591321

40. Guignabert, C., & Dorfmüller, P. (2013). *Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34(05), 551–559. doi:10.1055/s-0033-1356496
41. Guignabert, C., Tu, L., Girerd, B., Ricard, N., Huertas, A., Montani, D., & Humbert, M. (2015). *New Molecular Targets of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. Chest*, 147(2), 529–537. doi:10.1378/chest.14-0862
42. Corre, I., Paris, F., & Huot, J. (2017). The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget*, 8(33). doi:10.18632/oncotarget.1826
43. Teichert-Kuliszewska, K. (2006). Bone Morphogenetic Protein Receptor-2 Signaling Promotes Pulmonary Arterial Endothelial Cell Survival: Implications for Loss-of-Function Mutations in the Pathogenesis of Pulmonary Hypertension. *Circulation Research*, 98(2), 209–217. doi:10.1161/01.res.0000200180.01710.e6
44. Zhao, Y. D. (2005). *Rescue of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension Using Bone Marrow-Derived Endothelial-Like Progenitor Cells: Efficacy of Combined Cell and eNOS Gene Therapy in Established Disease. Circulation Research*, 96(4), 442–450. doi:10.1161/01.res.0000157672.70560.7b
45. Cool, C. D., Stewart, J. S., Weraahera, P., Miller, G. J., Williams, R. L., Voelkel, N. F., & Tuder, R. M. (1999). *Three-Dimensional Reconstruction of Pulmonary Arteries in Plexiform Pulmonary Hypertension Using Cell-Specific Markers. The American Journal of Pathology*, 155(2), 411–419. doi:10.1016/s0002-9440(10)65137-1
46. Voelkel, N. F., Cool, C., Taraceviene-Stewart, L., Geraci, M. W., Yeager, M., Bull, T., ... Tuder, R. M. (2002). *Janus face of vascular endothelial growth factor: The obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. Critical Care Medicine*, 30(Supplement), S251–S256. doi:10.1097/00003246-200205001-00013
47. St. Croix, C. M., & Steinhorn, R. H. (2016). *New Thoughts about the Origin of Plexiform Lesions. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193(5), 484–485. doi:10.1164/rccm.201510-1959ed
48. Amabile, N., Guignabert, C., Montani, D., Yeghiazarians, Y., Boulanger, C. M., & Humbert, M. (2012). *Cellular microparticles in the pathogenesis of pulmonary hypertension. European Respiratory Journal*, 42(1), 272–279. doi:10.1183/09031936.00087212

49. Sisbarro, L., Ihida-Stansbury, K., Stevens, T., Bauer, N., McMurtry, I., & Jones, P. L. (2005). *The Extracellular Matrix Microenvironment Specifies Pulmonary Endothelial Cell Identity*. *Chest*, 128(6), 564S. doi:10.1378/chest.128.6_suppl.564s
50. Church, A. C., Martin, D. H., Wadsworth, R., Bryson, G., Fisher, A. J., Welsh, D. J., & Peacock, A. J. (2015). *The reversal of pulmonary vascular remodeling through inhibition of p38 MAPK-alpha: a potential novel anti-inflammatory strategy in pulmonary hypertension*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(4), L333–L347. doi:10.1152/ajplung.00038.2015
51. Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). *Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases*. *Cell*, 141(7), 1117–1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
52. Shafiq, M.; Lone, Z.R.; Bharati, P.; Singh, H.; Jagavelu, K.; Verma, N.K.; Ghosh, J.K.; Gaestel, M.; Hanif, K. Involvement of mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase 2 (MK2) in endothelial dysfunction associated with pulmonary hypertension. *Life Sci*. 2021, 286, 120075. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120075
53. Weiss, A., Boehm, M., Egemnazarov, B., Grimminger, F., Pullamsetti, S. S., Kwapiszewska, G., & Schermuly, R. T. (2021). Kinases as potential targets for treatment of pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction. *British Journal of Pharmacology*. doi:10.1111/bph.14919
54. Bogaard, H. J., Natarajan, R., Henderson, S. C., Long, C. S., Kraskauskas, D., Smithson, L., ... Voelkel, N. F. (2009). *Chronic Pulmonary Artery Pressure Elevation Is Insufficient to Explain Right Heart Failure*. *Circulation*, 120(20), 1951–1960. doi:10.1161/circulationaha.109.883843
55. Nagendran, J., & Michelakis, E. D. (2009). *Mitochondrial NOS is upregulated in the hypoxic heart: implications for the function of the hypertrophied right ventricle*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 296(6), H1723–H1726. doi:10.1152/ajpheart.00380.2009
56. Boucherat, O., Vitry, G., Trinh, I., Paulin, R., Provencher, S., & Bonnet, S. (2017). *The cancer theory of pulmonary arterial hypertension*. *Pulmonary Circulation*, 7(2), 285–299. doi:10.1177/2045893217701438
57. Chung, L., Liu, J., Parsons, L., Hassoun, P. M., McGoon, M., Badesch, D. B., ... Zamanian, R. T. (2010). *Characterization of Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial Hypertension From REVEAL*. *Chest*, 138(6), 1383–1394. doi:10.1378/chest.10-0260

58. Campo, A., Mathai, S. C., Le Pavec, J., Zaiman, A. L., Hummers, L. K., Boyce, D., ... Hassoun, P. M. (2010). *Hemodynamic Predictors of Survival in Scleroderma-related Pulmonary Arterial Hypertension*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(2), 252–260. doi:10.1164/rccm.200912-1820oc
59. Wrigley, B. J., Lip, G. Y. H., & Shantsila, E. (2011). *The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure*. *European Journal of Heart Failure*, 13(11), 1161–1171. doi:10.1093/eurjhf/hfr122
60. Helderma, F., Mauritz, G.-J., Andringa, K. E., Vonk-Noordegraaf, A., & Marcus, J. T. (2011). *Early onset of retrograde flow in the main pulmonary artery is a characteristic of pulmonary arterial hypertension*. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 33(6), 1362–1368. doi:10.1002/jmri.22581
61. McCann, G. P., Gan, C. T., Beek, A. M., Niessen, H. W. M., Noordegraaf, A. V., & van Rossum, A. C. (2007). *Extent of MRI Delayed Enhancement of Myocardial Mass Is Related to Right Ventricular Dysfunction in Pulmonary Artery Hypertension*. *American Journal of Roentgenology*, 188(2), 349–355. doi:10.2214/ajr.05.1259
62. Chin, K. M., Kim, N. H. S., & Rubin, L. J. (2005). *The right ventricle in pulmonary hypertension*. *Coronary Artery Disease*, 16(1), 13–18. doi:10.1097/00019501-200502000-00003
63. Hemnes, A. R., & Champion, H. C. (2008). *Right heart function and haemodynamics in pulmonary hypertension*. *International Journal of Clinical Practice*, 62, 11–19. doi:10.1111/j.1742-1241.2008.01812.x
64. Humbert, M. (2009). *Update in Pulmonary Hypertension 2008*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(8), 650–656. doi:10.1164/rccm.200901-0136up
65. Vonk-Noordegraaf, A., Haddad, F., Chin, K. M., Forfia, P. R., Kawut, S. M., Lumens, J., ... Hassoun, P. M. (2013). *Right Heart Adaptation to Pulmonary Arterial Hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25), D22–D33. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.027
66. Frost, A., Badesch, D., Gibbs, J. S. R., Gopalan, D., Khanna, D., Manes, A., ... Torbicki, A. (2018). *Diagnosis of pulmonary hypertension*. *European Respiratory Journal*, 1801904. doi:10.1183/13993003.01904-2018
67. Bossone, E., Paciocco, G., Iarussi, D., Agretto, A., Iacono, A., Gillespie, B. W., & Rubenfire, M. (2002). *The Prognostic Role of the ECG in Primary Pulmonary Hypertension*. *Chest*, 121(2), 513–518. doi:10.1378/chest.121.2.513*-

68. Morales-Blanhir, J., Santos, S., de Jover, L., Sala, E., Paré, C., Roca, J., ... Barberà, J. A. (2004). *Clinical value of vasodilator test with inhaled nitric oxide for predicting long-term response to oral vasodilators in pulmonary hypertension. Respiratory Medicine*, 98(3), 225–234. doi:10.1016/j.rmed.2003.09.019
69. McLaughlin, V. V. (2005). *Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. European Respiratory Journal*, 25(2), 244–249. doi:10.1183/09031936.05.00054804
70. Rich, S., Kaufmann, E., & Levy, P. S. (1992). *The Effect of High Doses of Calcium-Channel Blockers on Survival in Primary Pulmonary Hypertension. New England Journal of Medicine*, 327(2), 76–81. doi:10.1056/nejm199207093270203
71. Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J.-L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., ... Hoeper, M. (2016). *2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. European Heart Journal*, 37(1), 67–119. doi:10.1093/eurheartj/ehv317
72. Palevsky, H. I. (1990). *Chronic Cor Pulmonale. JAMA*, 263(17), 2347. doi:10.1001/jama.1990.03440170069039
73. Packer, M., Medina, N., & Yushak, M. (1984). *Adverse hemodynamic and clinical effects of calcium channel blockade in pulmonary hypertension secondary to obliterative pulmonary vascular disease. Journal of the American College of Cardiology*, 4(5), 890–901. doi:10.1016/s0735-1097(84)80048-0
74. Humbert, M., Morrell, N. W., Archer, S. L., Stenmark, K. R., MacLean, M. R., Lang, I. M., ... Rabinovitch, M. (2004). *Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. Journal of the American College of Cardiology*, 43(12), S13–S24. doi:10.1016/j.jacc.2004.02.029
75. Channick, R. N., Simonneau, G., Sitbon, O., Robbins, I. M., Frost, A., Tapsen, V. F., ... Rubin, L. J. (2001). *Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebocontrolled study. The Lancet*, 358(9288), 1119–1123. doi:10.1016/s0140-6736(01)06250-x
76. Rubin, L. J., Badesch, D. B., Barst, R. J., Galiè, N., Black, C. M., Keogh, A., ... Simonneau, G. (2002). *Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. New England Journal of Medicine*, 346(12), 896–903. doi:10.1056/nejmoa012212
77. Sitbon, O., Badesch, D. B., Channick, R. N., Frost, A., Robbins, I. M., Simonneau, G., ... Rubin, L. J. (2003). *Effects of the Dual Endothelin*

- Receptor Antagonist Bosentan in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension.* *Chest*, 124(1), 247–254. doi:10.1378/chest.124.1.247 Channick et al., 2001;
78. Iglarz, M., Binkert, C., Morrison, K., Fischli, W., Gattfield, J., Treiber, A., ... Clozel, M. (2008). *Pharmacology of Macitentan, an Orally Active Tissue-Targeting Dual Endothelin Receptor Antagonist.* *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327(3), 736–745. doi:10.1124/jpet.108.142976 Pulido, T. et al., 2013
79. Pulido, T., Adzerikho, I., Channick, R. N., Delcroix, M., Galiè, N., Ghofrani, H.-A., ... Simonneau, G. (2013). *Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension.* *New England Journal of Medicine*, 369(9), 809–818. doi:10.1056/nejmoa1213917
80. Gomberg-Maitland, M., & Olschewski, H. (2008). Prostacyclin therapies for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, 31(4), 891–901. doi:10.1183/09031936.00097107
81. Coleman, R. A., Grix, S. P., Head, S. A., Louttit, J. B., Mallett, A., & Sheldrick, R. L. G. (1994). *A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein.* *Prostaglandins*, 47(2), 151–168. doi:10.1016/0090-6980(94)90084-1
82. Barst, R. J., Rubin, L. J., Long, W. A., McGoon, M. D., Rich, S., Badesch, D. B., ... Crow, J. W. (1996). *A Comparison of Continuous Intravenous Epoprostenol (Prostacyclin) with Conventional Therapy for Primary Pulmonary Hypertension.* *New England Journal of Medicine*, 334(5), 296–301. doi:10.1056/nejm199602013340504
83. Sitbon, O., Delcroix, M., Bergot, E., Boonstra, A. B., Gr Anton Vonk-Noordegraaf, J., Langleben, D., ... Simonneau, G. (2014). *EPITOME-2: An open-label study assessing the transition to a new formulation of intravenous epoprostenol in patients with pulmonary arterial hypertension.* *American Heart Journal*, 167(2), 210–217
84. Kitterman, N., Poms, A., Miller, D. P., Lombardi, S., Farber, H. W., & Barst, R. J. (2012). *Bloodstream Infections in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension Treated With Intravenous Prostanoids: Insights From the REVEAL REGISTRY®.* *Mayo Clinic Proceedings*, 87(9), 825–834. doi:10.1016/j.mayocp.2012.05.014
85. Barnes, H., Fothergill, T., Burns, A., Humbert, M., & Williams, T. (2017). Prostacyclin for pulmonary hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd012785

86. Sitbon, O., Channick, R., Chin, K. M., Frey, A., Gaine, S., Galiè, N., ... McLaughlin, V. V. (2015). *Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension*. *New England Journal of Medicine*, 373(26), 2522–2533. doi:10.1056/nejmoa1503184
87. Kuwano, K., Hashino, A., Noda, K., Kosugi, K., & Kuwabara, K. (2008). *A Long-Acting and Highly Selective Prostacyclin Receptor Agonist Prodrug, 2- -N-(methylsulfonyl)acetamide (NS-304), Ameliorates Rat Pulmonary Hypertension with Unique Relaxant Responses of Its Active Form, acetic Acid (MRE-269), on Rat Pulmonary Artery*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(3), 691–699. doi:10.1124/jpet.108.138305
88. Galiè, N., Corris, P. A., Frost, A., Girgis, R. E., Granton, J., Jing, Z. C., ... Keogh, A. (2013). *Updated Treatment Algorithm of Pulmonary Arterial Hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25), D60–D72. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.031
89. Kaufmann, P., Okubo, K., Bruderer, S., Mant, T., Yamada, T., Dingemanse, J., & Mukai, H. (2015). *Pharmacokinetics and Tolerability of the Novel Oral Prostacyclin IP Receptor Agonist Selexipag*. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 15(3), 195–203. doi:10.1007/s40256-015-0117-4
90. Wardle, A. J., Seager, M. J., Wardle, R., Tulloh, R. M., & Gibbs, J. S. R. (2016). *Guanylate cyclase stimulators for pulmonary hypertension*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd011205.pub2
91. Galiè, N., Badesch, D., Oudiz, R., Simonneau, G., McGoon, M. D., Keogh, A. M., ... Rubin, L. J. (2005). *Ambrisentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(3), 529–535. doi:10.1016/j.jacc.2005.04.050
92. Rubin, L. J., Badesch, D. B., Fleming, T. R., Galiè, N., Simonneau, G., Ghofrani, H. A., ... Barst, R. J. (2011). *Long-term Treatment With Sildenafil Citrate in Pulmonary Arterial Hypertension*. *Chest*, 140(5), 1274–1283. doi:10.1378/chest.10-0969
93. Galie, N., Brundage, B. H., Ghofrani, H. A., Oudiz, R. J., Simonneau, G., ... Safdar, Z. (2009). *Tadalafil Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension*. *Circulation*, 119(22), 2894–2903. doi:10.1161/circulationaha.108.83
94. Lajoie, A. C., Lauzière, G., Lega, J.-C., Lacasse, Y., Martin, S., Simard, S., ... Provencher, S. (2016). *Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis*. *The Lancet*

- Respiratory Medicine, 4(4), 291–305. doi:10.1016/s2213-2600(16)00027-8
95. Yan, S., Wang, Y., Liu, P., Chen, A., Chen, M., Yao, D., ... Huang, X. (2016). *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, 1–9. doi:10.1155/2016/2546402
 96. ZARUBIN, T., & HAN, J. (2005). *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Research*, 15(1), 11–18. doi:10.1038/sj.cr.7290257
 97. Hanks, S., Quinn, A., & Hunter, T. (1988). *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science*, 241(4861), 42–52. doi:10.1126/science.3291115
 98. Seger, R., & Krebs, E. G. (1995). *The MAPK signaling cascade. The FASEB Journal*, 9(9), 726–735. doi:10.1096/fasebj.9.9.7601337
 99. Burton, J. C., Antoniadis, W., Okalova, J., Roos, M. M., & Grimsey, N. J. (2021). Atypical p38 Signaling, Activation, and Implications for Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4183. doi:10.3390/ijms22084183
 100. Canovas, B., & Nebreda, A. R. (2021). Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(5), 346–366. doi:10.1038/s41580-020-00322-w
 101. Hanks, S. K., & Hunter, T. (1995). *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. The FASEB Journal*, 9(8), 576–596. doi:10.1096/fasebj.9.8.7768349
 102. Bogoyevitch, M. A., & Court, N. W. (2004). *Counting on mitogen-activated protein kinases—ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. Cellular Signalling*, 16(12), 1345–1354. doi:10.1016/j.cellsig.2004.05.004
 103. Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). *p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1358–1375. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010
 104. Nebreda, A. R., & Porras, A. (2000). *p38 MAP kinases: beyond the stress response. Trends in Biochemical Sciences*, 25(6), 257–260. doi:10.1016/s0968-0004(00)01595-4

105. Soloaga, A. (2003). *MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. The EMBO Journal*, 22(11), 2788–2797. doi:10.1093/emboj/cdg273
106. Arthur, J. S., C. (2008). *MSK activation and physiological roles. Frontiers in Bioscience, Volume(13)*, 5866. doi:10.2741/3122
107. Shi, Y., & Gaestel, M. (2002). *In the Cellular Garden of Forking Paths: How p38 MAPKs Signal for Downstream Assistance. Biological Chemistry*, 383(10). doi:10.1515/bc.2002.173
108. Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). *ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 320–344. doi:10.1128/mmmbr.68.2.320-344.2004
109. Tanos, T., Marinissen, M. J., Leskow, F. C., Hochbaum, D., Martinetto, H., Gutkind, J. S., & Coso, O. A. (2005). *Phosphorylation of c-Fos by Members of the p38 MAPK Family. Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18842–18852. doi:10.1074/jbc.m500620200
110. Whitaker, R.H.; Cook, J.G. Stress Relief Techniques: p38 MAPK Determines the Balance of Cell Cycle and Apoptosis Pathways. *Biomolecules* 2021, 11, 1444. doi: 10.3390/biom11101444
111. Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, 429(3), 403–417. doi:10.1042/bj20100323
112. Hollenbach, E., Neumann, M., Vieth, M., Roessner, A., Malfertheiner, P., & Naumann, M. (2004). *Inhibition of p38 MAP kinase and RICK/NF-κB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. The FASEB Journal*, 18(13), 1550–1552. doi:10.1096/fj.04-1642fje
113. Jin, C., Guo, J., Qiu, X., Ma, K., Xiang, M., Zhu, X., & Guo, J. (2014). IGF-1 induces iNOS expression via the p38 MAPK signal pathway in the anti-apoptotic process in pulmonary artery smooth muscle cells during PAH. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 34(4), 325–331. doi:10.3109/10799893.2014.903417
114. Patel, M., Predescu, D., Bardita, C., Chen, J., Jeganathan, N., Pritchard, M., ... Predescu, S. (2017). Modulation of Intersectin-1s Lung Expression Induces Obliterative Remodeling and Severe Plexiform Arteriopathy in the Murine Pulmonary Vascular Bed. *The American Journal of Pathology*, 187(3), 528–542. doi:10.1016/j.ajpath.2016.11.012

115. Kojonazarov, B., Novoyatleva, T., Boehm, M., Happe, C., Sibinska, Z., Tian, X., ... Schermuly, R. T. (2017). *p38 MAPK Inhibition Improves Heart Function in Pressure-Loaded Right Ventricular Hypertrophy. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 57(5), 603–614. doi:10.1165/rcmb.2016-0374oc
116. Thomas, H. C., Lamé, M. W., Dunston, S. K., Segall, H. J., & Wilson, D. W. (1998). *Monocrotaline Pyrrole Induces Apoptosis in Pulmonary Artery Endothelial Cells. Toxicology and Applied Pharmacology*, 151(2), 236–244. doi:10.1006/taap.1998.8458
117. Kay, J. M., Harris, P., & Heath, D. (1967). *Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of Crotalaria spectabilis seeds. Thorax*, 22(2), 176–179. doi:10.1136/thx.22.2.176
118. Jasmin, J.-F., Lucas, M., Cernacek, P., & Dupuis, J. (2001). *Effectiveness of a Nonselective ETA/B and a Selective ETA Antagonist in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. Circulation*, 103(2), 314–318. doi:10.1161/01.cir.103.2.314
119. WILSON, D. W. et al. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res*, v. 38, n. 1, p. 57-80, Jul 1989. ISSN 0026-2862 (Print) 0026-2862. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2503687>
120. MEYRICK, B. O.; REID, L. M. Crotalaria-induced pulmonary hypertension. Uptake of 3H-thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls. *Am J Pathol*, v. 106, n. 1, p. 84-94, Jan 1982. ISSN 0002-9440/0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7055214> >
121. Roth, R. A., Dotzlauf, L. A., Baranyi, B., Kuo, C.-H., & Hook, J. B. (1981). *Effect of monocrotaline ingestion on liver, kidney, and lung of rats. Toxicology and Applied Pharmacology*, 60(2), 193–203. doi:10.1016/0041-008x(91)90223-2
122. Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (2008). *Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(1), 14–30. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.09.006
123. Zapata-Sudo, G., Pontes, L. B., Silva, J. S. da, Lima, L. M., Nunes, I. K. da C., Barreiro, E. J., & Sudo, R. T. (2012). *Benzenesulfonamide attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in a rat model. European Journal of Pharmacology*, 690(1-3), 176–182. doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.043

124. Alencar, A. K. N., Pereira, S. L., Montagnoli, T. L., Maia, R. C., Kümmerle, A. E., Landgraf, S. S., ... Zapata-Sudo, G. (2013). *Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. British Journal of Pharmacology*, 169(5), 953–962. doi:10.1111/bph.12193
125. Alencar, A. K. N., Pereira, S. L., da Silva, F. E., Mendes, L. V. P., Cunha, V. do M. N., Lima, L. M., ... Zapata-Sudo, G. (2014). *N-acetylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. International Journal of Cardiology*, 173(2), 154–162. doi:10.1016/j.ijcard.2014.02.022
126. STENMARK, K. R.; FAGAN, K. A.; FRID, M. G. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res*, v. 99, n. 7, p. 675-91, Sep 29 2006. ISSN 1524-4571/0009-7330. Disponível em: < [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008597](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008597) >.
127. MEYRICK, B. O.; PERKETT, E. A. The sequence of cellular and hemodynamic changes of chronic pulmonary hypertension induced by hypoxia and other stimuli. *Am Rev Respir Dis*, v. 140, n. 5, p. 1486-9, Nov 1989. ISSN 0003-0805/0003-0805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2683910> >.
128. Burke, D. L., Frid, M. G., Kunrath, C. L., Karoor, V., Anwar, A., Wagner, B. D., ... Stenmark, K. R. (2009). *Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(2), L238–L250. doi:10.1152/ajplung.90591.2008
129. DREXLER, E. S. et al. Stiffening of the Extrapulmonary Arteries From Rats in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension. *J Res Natl Inst Stand Technol*, v. 113, n. 4, p. 239-49, 2008. ISSN 1044-677X (Print) 1044-677X. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096124> >
130. FRANK, D. B. et al. Increased susceptibility to hypoxic pulmonary hypertension in Bmpr2 mutant mice is associated with endothelial dysfunction in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 294, n. 1, p. L98-109, Jan 2008. ISSN 1040-0605 1040-0605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024717> >
131. NOZIK-GRAYCK, E. et al. Lung EC-SOD overexpression attenuates hypoxic induction of Egr-1 and chronic hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 295, n. 3, p. L422-30, Sep 2008. ISSN 1040-0605/1040-0605. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599502>

132. DEMPSEY, E. C. et al. Neprilysin null mice develop exaggerated pulmonary vascular remodeling in response to chronic hypoxia. *Am J Pathol*, v. 174, n. 3, p. 782-96, Mar 2009. ISSN 1525-2191/0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234135> >.
133. STEINER, M. K. et al. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res*, v. 104, n. 2, p. 236-44, 28p following 244, Jan 30 2009. ISSN 1524-4571/0009-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074475> >.
134. FRID, M. G. et al. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol*, v. 168, n. 2, p. 659-69, Feb 2006. ISSN 0002-9440/0002-9440 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436679> >.
135. RABINOVITCH, M. et al. Changes in pulmonary blood flow affect vascular response to chronic hypoxia in rats. *Circ Res*, v. 52, n. 4, p. 432-41, Apr 1983. ISSN 0009-7330/0009-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6831659> >.
136. Taraseviciene-stewart, L., Kasahara, Y., Alger, L., Hirth, P., MC Mahon, G., Waltenberger, J., ... Tuder, R. M. (2001). *Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. The FASEB Journal*, 15(2), 427–438. doi:10.1096/fj.00-0343com
137. Voelkel, N. F., Vandivier, R. W., & Tuder, R. M. (2006). Vascular endothelial growth factor in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290(2), L209–L221. doi:10.1152/ajplung.00185.2005
138. Ferrara, N. (1999). Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *Journal of Molecular Medicine*, 77(7), 527–543. doi:10.1007/s001099900019
139. Barreiro, E. J. (2002). *Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. Química Nova*, 25(6b), 1172–1180. doi:10.1590/s0100-40422002000700018
140. Lima, P. C., Lima, L. M., da Silva, K. C. M., Léda, P. H. O., de Miranda, A. L. P., Fraga, C. A. M., & Barreiro, E. J. (2000). *Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole*##This paper represents contribution # 36 of the

- LASSBio, UFRJ (Br.) (LASSBio, <http://acd.ufrj.br/~pharma/lassbio>); For contribution # 35, see [24]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35(2), 187–203. doi:10.1016/s0223-5234(00)00120-3
141. Gupta, J., del Barco Barrantes, I., Igea, A., Sakellariou, S., Pateras, I. S., Gorgoulis, V. G., & Nebreda, A. R. (2014). Dual Function of p38 α MAPK in Colon Cancer: Suppression of Colitis-Associated Tumor Initiation but Requirement for Cancer Cell Survival. *Cancer Cell*, 25(4), 484–500. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.019
 142. Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., & Hirth, P. (2012). Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(11), 873–886. doi:10.1038/nrd3847
 143. Turner, N. C., Ro, J., André, F., Loi, S., Verma, S., Iwata, H., ... Cristofanilli, M. (2015). Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(3), 209–219. doi:10.1056/nejmoa1505270
 144. Finn, R. S., Martin, M., Rugo, H. S., Jones, S., Im, S.-A., Gelmon, K., ... Slamon, D. J. (2016). Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(20), 1925–1936. doi:10.1056/nejmoa1607303
 145. Rutkowski, P., Lugowska, I., Kosela-Paterczyk, H., & Kozak, K. (2015). Trametinib: a MEK inhibitor for management of metastatic melanoma. *OncoTargets and Therapy*, 2251. doi:10.2147/ott.s72951
 146. Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2016). Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discovery Today*, 21(1), 5–10. doi:10.1016/j.drudis.2015.07.008
 147. Noble, M. E. M. (2004). Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure. *Science*, 303(5665), 1800–1805. doi:10.1126/science.1095920
 148. Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), 422–439. doi:10.1016/j.tips.2015.04.005
 149. Duarte, C., Barreiro, E., & Fraga, C. (2007). Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 7(11), 1108–1119. doi:10.2174/138955707782331722

150. I.A. Guedes, R.H.C.N. Freitas, N.M. Cordeiro, T.S. do Nascimento, T.S. Valerio, P.D. Fernandes, L.E. Dardenne, C.A.M. Fraga, *ChemMedChem* **2016**, *11*, 234
151. Lima, L., & Barreiro, E. (2005). *Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design*. *Current Medicinal Chemistry*, *12*(1), 23–49. doi:10.2174/0929867053363540
152. Freitas, R. H. C. N., Cordeiro, N. M., Carvalho, P. R., Alves, M. A., Guedes, I. A., Valerio, T. S., ... Fraga, C. A. M. (2017). *Discovery of naphthyl-N -acylhydrazones p38 α MAPK inhibitors with in vivo anti-inflammatory and anti-TNF- α activity*. *Chemical Biology & Drug Design*, *91*(2), 391–397. doi:10.1111/cbdd.13085
153. Goettert, M., Graeser, R., & Laufer, S. A. (2010). *Optimization of a nonradioactive immunosorbent assay for p38 α mitogen-activated protein kinase activity*. *Analytical Biochemistry*, *406*(2), 233–234. doi:10.1016/j.ab.2010.07.007
154. Alencar, A. K., Montes, G. C., Montagnoli, T., Silva, A. M., Martinez, S. T., Fraga, A. G., ... Zapata-Sudo, G. (2017). Activation of GPER ameliorates experimental pulmonary hypertension in male rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *97*, 208–217. doi:10.1016/j.ejps.2016.11.009
155. Thibault, H. B., Kurtz, B., Raher, M. J., Shaik, R. S., Waxman, A., Derumeaux, G., ... Scherrer-Crosbie, M. (2009). *Noninvasive Assessment of Murine Pulmonary Arterial Pressure: Validation and Application to Models of Pulmonary Hypertension*. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, *3*(2), 157– 163. doi:10.1161/circimaging.109.887109
156. Gomez-Arroyo, J., Saleem, S. J., Mizuno, S., Syed, A. A., Bogaard, H. J., Abbate, A., ... Voelkel, N. F. (2012). *A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *302*(10), L977–L991. doi:10.1152/ajplung.00362.2011
157. Alencar, A. K. N., Pimentel-Coelho, P. M., Montes, G. C., Silva, M. M. C., Mendes, L. V. P., Montagnoli, T. L., ... Zapata-Sudo, G. (2018). Human Mesenchymal Stem Cell Therapy Reverses Su5416/Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Mice. *Front. Pharmacol.* *9*:1395. doi: 10.3389/fphar.2018.01395.
158. Bordenave, J., Thuillet, R., Tu, L., Phan, C., Cumont, A., Marsol, C., ... Guignabert, C. (2020). *Neutralization of CXCL12 attenuates established pulmonary hypertension in rats*. *Cardiovascular Research*. doi:10.1093/cvr/cvz153

159. Vitali, S. H., Hansmann, G., Rose, C., Fernandez-Gonzalez, A., Scheid, A., Mitsialis, S. A., & Kourembanas, S. (2014). *The Sugen 5416/Hypoxia Mouse Model of Pulmonary Hypertension Revisited: Long-Term Follow-Up*. *Pulmonary Circulation*, 4(4), 619–629. doi:10.1086/678508
160. Silva, M. de M. C. da, Alencar, A. K. N. de, Silva, J. S. da, Montagnoli, T. L., Silva, G. F. da, Rocha, B. de S., ... Zapata-Sudo, G. (2020). Therapeutic Benefit of the Association of Lodenafil with Mesenchymal Stem Cells on Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Cells*, 9(9), 2120. doi:10.3390/cells9092120
161. Toba, M., Alzoubi, A., O'Neill, K. D., Gairhe, S., Matsumoto, Y., Oshima, K., ... McMurtry, I. F. (2014). Temporal hemodynamic and histological progression in Sugen5416/hypoxia/normoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 306(2), H243–H250. doi:10.1152/ajpheart.00728.2013
162. Jones, J. E., Mendes, L., Rudd, M. A., Russo, G., Loscalzo, J., & Zhang, Y.-Y. (2002). Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(1), H364–H371. doi:10.1152/ajpheart.00979.2001
163. Augustine, D. X., Coates-Bradshaw, L. D., Willis, J., Harkness, A., Ring, L., Grapsa, J., ... Mathew, T. (2018). Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: a guideline protocol from the British Society of Echocardiography. *Echo Research and Practice*, 5(3), G11–G24. doi:10.1530/erp-17-0071
164. Urboniene, D., Haber, I., Fang, Y.-H., Thenappan, T., & Archer, S. L. (2010). Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 299(3), L401–L412. doi:10.1152/ajplung.00114.2010
165. Abe, K., Toba, M., Alzoubi, A., Ito, M., Fagan, K. A., Cool, C. D., ... Oka, M. (2010). *Formation of Plexiform Lesions in Experimental Severe Pulmonary Arterial Hypertension*. *Circulation*, 121(25), 2747–2754. doi:10.1161/circulationaha.109.927681
166. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for

- biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
167. Tudor, R. M., Archer, S. L., Dorfmueller, P., Erzurum, S. C., Guignabert, C., Michelakis, E., ... Morrell, N. W. (2013). *Relevant Issues in the Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25), D4–D12. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.025
 168. Hoshikawa, Y., Nana-Sinkam, P., Moore, M. D., Sotto-Santiago, S., Phang, T., Keith, R. L., ... Geraci, M. W. (2003). Hypoxia induces different genes in the lungs of rats compared with mice. *Physiological Genomics*, 12(3), 209–219. doi:10.1152/physiolgenomics.00081.2001
 169. Vonk-Noordegraaf, A., Haddad, F., Chin, K. M., Forfia, P. R., Kawut, S. M., Lumens, J., ... Hassoun, P. M. (2013). Right Heart Adaptation to Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25), D22–D33. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.027
 170. Zhang, J., Xie, Z., Zhang, N., & Zhong, J. (2017). *Nanosuspension drug delivery system: preparation, characterization, postproduction processing, dosage form, and application*. *Nanostructures for Drug Delivery*, 413–443. doi:10.1016/b978-0-323-46143-6.00013-0
 171. Sukbuntherng, J., Cropp, G., Hannah, A., Wagner, G. S., Shawver, L. K., & Antonian, L. (2001). Pharmacokinetics and interspecies scaling of a novel VEGF receptor inhibitor, SU5416. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(12), 1629–1636. doi:10.1211/0022357011778232
 172. Folkman J: Angiogenesis research: from laboratory to clinic. *Forum* 1999; 9: 59–62.
 173. Stopeck A, Sheldon M, Vahedian M, Cropp G, Gosalia R, Hannah A: Results of a phase I dose-escalating study of the antiangiogenic agent, SU5416, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2798–2805.
 174. Shawver, L. K., Slamon, D., & Ullrich, A. (2002). Smart drugs: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell*, 1(2), 117–123. doi:10.1016/s1535-6108(02)00039-9
 175. Mura, M., dos Santos, C. C., Stewart, D., & Liu, M. (2004). Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *Journal of Applied Physiology*, 97(5), 1605–1617. doi:10.1152/japplphysiol.00202.20
 176. Mendel DB, Schreck RE, West DC, Li G, Strawn L.S, Tanciongco SS, Vasile S, Shawver LK, Cherrington JM: The angiogenesis inhibitor

SU5416 has long lasting effects on VEGF receptor phosphorylation and function. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4848–4858.

177. Sakao, S., & Tatsumi, K. (2011). The Effects of Antiangiogenic Compound SU5416 in a Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension. *Respiration*, 81(3), 253–261. doi:10.1159/000322011
178. Moreno-Vinasco, L., Gomberg-Maitland, M., Maitland, M. L., Desai, A. A., Singleton, P. A., Sammani, S., ... Garcia, J. G. N. (2008). *Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. Physiological Genomics*, 33(2), 278–291. doi:10.1152/physiolgenomics.00169.2007
179. Rajkumar, R., Konishi, K., Richards, T. J., Ishizawar, D. C., Wiechert, A. C., Kaminski, N., & Ahmad, F. (2010). *Genomewide RNA expression profiling in lung identifies distinct signatures in idiopathic pulmonary arterial hypertension and secondary pulmonary hypertension. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 298(4), H1235–H1248. doi:10.1152/ajpheart.00254.2009
180. Goncharov, D. A., Kudryashova, T. V., Ziai, H., Ihida-Stansbury, K., DeLisser, H., Krymskaya, V. P., ... Goncharova, E. A. (2013). *Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 (mTORC2) Coordinates Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Metabolism, Proliferation, and Survival in Pulmonary Arterial Hypertension. Circulation*, 129(8), 864–874. doi:10.1161/circulationaha.113.004581
181. Huertas, A., Guignabert, C., Barberà, J. A., Bärtsch, P., Bhattacharya, J., Bhattacharya, S., ... Wilkins, M. R. (2018). *Pulmonary vascular endothelium: the orchestra conductor in respiratory diseases. European Respiratory Journal*, 51(4), 1700745. doi:10.1183/13993003.00745-2017
182. Tudor, R. M., Cool, C. D., Yeager, M., Taraseviciene-Stewart, L., Bull, T. M., & Voelkel, N. F. (2001). *THE PATHOBIOLOGY OF PULMONARY HYPERTENSION. Clinics in Chest Medicine*, 22(3), 405–418. doi:10.1016/s0272-5231(05)70280-x
183. ITOH, T., NAGAYA, N., ISHIBASHI-UEDA, H., KYOTANI, S., OYA, H., SAKAMAKI, F., ... NAKANISHI, N. (2006). *Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Respirology*, 11(2), 158–163. doi:10.1111/j.1440-1843.2006.00821.x
184. Hurst, L. A., Dunmore, B. J., Long, L., Crosby, A., Al-Lamki, R., Deighton, J., ... Morrell, N. W. (2017). *TNFα drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering*

- NOTCH signalling. Nature Communications*, 8, 14079. doi:10.1038/ncomms14079
185. Ferrero, E., Zocchi, M. R., Magni, E., Panzeri, M. C., Curnis, F., Rugarli, C., ... Corti, A. (2001). *Roles of tumor necrosis factor p55 and p75 receptors in TNF- α -induced vascular permeability. American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 281(4), C1173–C1179. doi:10.1152/ajpcell.2001.281.4.c1173
 186. Zhang, S., Fantozzi, I., Tigno, D. D., Yi, E. S., Platoshyn, O., Thistlethwaite, P. A., ... Yuan, J. X.-J. (2003). *Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(3), L740–L754. doi:10.1152/ajplung.00284.2002
 187. White, K., Dempsie, Y., Caruso, P., Wallace, E., McDonald, R. A., Stevens, H., ... Baker, A. H. (2014). *Endothelial Apoptosis in Pulmonary Hypertension Is Controlled by a microRNA/Programmed Cell Death 4/Caspase-3 Axis. Hypertension*, 64(1), 185–194. doi:10.1161/hypertensionaha.113.03037
 188. JAVADOV, S., JANG, S., & AGOSTINI, B. (2014). CROSSTALK BETWEEN MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES AND MITOCHONDRIA IN CARDIAC DISEASES: THERAPEUTIC PERSPECTIVES. *PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*, 144(2), 202–225. DOI:10.1016/J.PHARMTHERA.2014.05
 189. Kubota, T.; McTiernan, C.F.; Frye, C.S.; Slawson, S.E.; Lemster, B.H.; Koretsky, A.P.; Demetris, A.J.; Feldman, A.M. Dilated Cardiomyopathy in Transgenic Mice With Cardiac-Specific Overexpression of Tumor Necrosis Factor- α . *Circ. Res.* 1997, 81, 627–635. <https://doi.org/10.1161/01.RES.81.4.627>
 190. Smith, R. M., McCarthy, J., & Sack, M. N. (2001). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 219(1/2), 139–143. doi:10.1023/a:1010811414206
 191. Jobe, L. J., Meléndez, G. C., Levick, S. P., Du, Y., Brower, G. L., & Janicki, J. S. (2009). TNF- α inhibition attenuates adverse myocardial remodeling in a rat model of volume overload. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297(4), H1462–H1468. doi:10.1152/ajpheart.00442.2009
 192. Tang, H.; Fernandez, R.A.; Yuan, J.X.-J. miRNA208/Mef2 and TNF- α in Right Ventricular Dysfunction. *Circ. Res.* 2015, 116, 6–8. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.305446>.

193. Imoto, K.; Okada, M.; Yamawaki, H. Periostin Mediates Right Ventricular Failure through Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Right Ventricular Fibroblasts from Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertensive Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 20, 62. <https://doi.org/10.3390/ijms20010062>.

8.0 ANEXO A - Certificados de participação em congressos



XXXIII Reunião Anual

02 A 06 DE SETEMBRO DE 2018

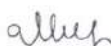
Certificado



Certificamos que

"o resumo **A NOVEL P38-ALPHA MAPK INHIBITOR (LASSBIO-1824) REVERSES SUGEN/HYPOXIA-INDUCED PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION IN RATS**, de autoria de **GRAZIELLE FERNANDES DA SILVA, ALLAN KARDEC NOGUEIRA DE ALENCAR, JAQUELINE SOARES DA SILVA, JOSENILDO SEGUNDO CHAVES DE ARAÚJO, LUIZA VILLARINHO P. MENDES, MARINA MORAES SILVA, ROSANA C. FREITAS, TADEU LIMA MONTAGNOLI, CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA, ROBERTO TAKASHI SUDO, GISELE ZAPATA-SUDO** foi apresentado na forma de painel durante"

XXXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada no período de 02 a 06 de setembro de 2018, no Campos do Jordão Convention Center, Campos de Jordão - SP.


Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho
Presidente da FeSBE


Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel
1º Secretário Geral da FeSBE

XXXIII Reunião Anual

02 A 06 DE SETEMBRO DE 2018

Certificado



Certificamos que

"GRAZIELLE FERNANDES DA SILVA participou da"

XXXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada no período de 02 a 06 de setembro de 2018, no Campos do Jordão Convention Center, Campos de Jordão - SP.


Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho
Presidente da FeSBE


Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel
1º Secretário Geral da FeSBE



XXXIV Reunião Anual

9 A 13 • SETEMBRO • 2019



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 04.011 - A novel p38-alpha MAPK inhibitor (LASSBio-1824) reverses SU5416/Hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats - Silva GF, Alencar AKN, Silva JS, Silva MM, Freitas RC, Montagnoli TL, Fraga CAM, Sudo RT, Zapata-Sudo G, PROGRAMA DE PESQUISA EM DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ) foi apresentado na forma de painel durante a XXXIV Reunião Anual da FeSBE, realizado de 09 de setembro de 2019 a 13 de setembro de 2019 no Campos do Jordão Convention Center.

XXXIV Reunião Anual

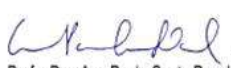
9 A 13 • SETEMBRO • 2019



CERTIFICADO

Certificamos que GRAZIELLE FERNANDES DA SILVA participou da XXXIV Reunião Anual da FeSBE, realizado de 09 de setembro de 2019 a 13 de setembro de 2019 no Campos do Jordão Convention Center.


Prof. Dr. Hernandes Fastino de Carvalho
Presidente da FeSBE


Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel
1º Secretário Geral da FeSBE



XXXIV Reunião Anual

9 A 13 • SETEMBRO • 2019



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 04.011 - A novel p38-alpha MAPK inhibitor (LASSBio-1824) reverses SU5416/Hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats - Silva GF, Alencar AKN, Silva JS, Silva MM, Freitas RC, Montagnoli TL, Fraga CAM, Sudo RT, Zapata-Sudo G, PROGRAMA DE PESQUISA EM DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ) foi contemplado com MENÇÃO HONROSA durante a XXXIV Reunião Anual da FeSBE, realizado de 09 de setembro de 2019 a 13 de setembro de 2019 no Campos do Jordão Convention Center.



2ND
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
**PHARMACOLOGY AND
MEDICINAL CHEMISTRY**
DECEMBER 2-3, 2019

Certificate

The Graduate Program on Pharmacology and Medicinal Chemistry certify that

GRAZIELLE F. SILVA, ALLAN K. N. ALENCAR, JAQUELINE S. DA SILVA, MARINA M. SILVA, ROSANA C. FREITAS,
TADEU L. MONTAGNOLI, CARLOS A. M. FRAGA, ROBERTO T. SUDO, GISELE ZAPATA-SUDO

presented the poster titled A NOVEL P38-ALPHA MAPK INHIBITOR (LASSBio-1824)
REVERSES SUGEN/HYPOXIA-INDUCED PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION IN
RATS in the 2nd International Symposium on Pharmacology and Medicinal
Chemistry, held from December 2-3, 2019 at Federal University of Rio de Janeiro.

Dra. Lídia Moreira Lima

President of the 2nd International Symposium on Pharmacology and Medicinal Chemistry
& Coordinator of the Graduate Program in Pharmacology and Medicinal Chemistry of
Federal University of Rio de Janeiro



2ND
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
**PHARMACOLOGY AND
MEDICINAL CHEMISTRY**
DECEMBER 2-3, 2019

Certificate

Grazielle Fernandes da Silva

participated in the 2nd International Symposium on Pharmacology and Medicinal
Chemistry, from December 2-3, 2019 at Federal University of Rio de Janeiro.

Dra. Lídia Moreira Lima

President of the 2nd International Symposium on Pharmacology and Medicinal Chemistry
& Coordinator of the Graduate Program in Pharmacology and Medicinal Chemistry of
Federal University of Rio de Janeiro



MULHERES
DO CORAÇÃO

**Women of
the Heart #2**



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

Novo inibidor de MAPK p38 α reduz disfunção ventricular induzida pela hipertensão arterial pulmonar em ratos.

Dos autores: Grazielle Fernandes da Silva, Marina Moraes Silva, Roberto Takashi Sudo, Gisele Zapata-Sudo

Foi apresentado em formato on-line no Simpósio Mulheres do Coração #2, na modalidade Jovem Pesquisadora.

Rio de Janeiro, 18 de julho de 2020

Glaucia M. Moraes Oliveira
Coordenadora do Simpósio Mulheres do Coração #2

Marcus Vinícius B. Malachias
ACC Brazil Chapter Governor

Marcelo Queiroga
Presidente da Sociedade Brasileira de Cardiologia



Departamento
de Cardiologia
da Mulher



Brazil
DISTINGUISHED CHAPTER



ESC
European Society
of Cardiology

CERTIFICATE

This is to certify that

Miss G Silva

(Rio De Janeiro - Brazil)

has presented an abstract entitled

Pulmonary hypertension: reduction of vascular and cardiac remodeling by a new inhibitor of p38-alpha MAPK

Authors: GRA Silva (Rio de Janeiro, BR), F Beltrame (Rio de Janeiro, BR), AKN Alencar (Rio de Janeiro, BR), MM Silva (Rio de Janeiro, BR), B Rocha (Rio de Janeiro, BR), JS Da Silva (Rio de Janeiro, BR), TL Montagnoli (Rio de Janeiro, BR), RC Freitas (Rio de Janeiro, BR), CAM Fraga (Rio de Janeiro, BR), RT Sudo (Rio de Janeiro, BR), G Zapata-Sudo (Rio de Janeiro, BR)

in the session entitled

Pulmonary Hypertension: Targets for Therapies

On Tuesday 01 September 2020, from 08:30 to 08:30

during the

ESC CONGRESS 2020 - The Digital Experience

European Society of Cardiology

Isabel Bardinet
Chief Executive Officer

The American Heart Association

Presents this

**Paul Dudley White
International Scholar Award**

Recognizing excellence in science from around the world



*To Recognize the Authors with the Highest Ranked Abstract
from Brazil at the Basic Cardiovascular Science Scientific Sessions 2022*

*Grazielle F. Silva, Jaqueline S. Da Silva, Marina Silva, Tadeu Montagnoli,
Allan Kardec Alencar, Bruna Rocha, Rosana Freitas, Carlos Fraga, Gisele Zapata-Sudo*

Pilar Alcaide, MS, PhD, FAHA
Chair, BCVS Program Committee Chair



American
Heart
Association.

Sumanth Prabhu, MD, FAHA
Vice-Chair, BCVS Program Committee

9.0 ANEXO B - Artigo publicado na revista *Pharmaceuticals* baseado no estudo desenvolvido durante o doutorado



Article

Novel p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor Reverses Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats

Grazielle Fernandes Silva ^{1,2}, Jaqueline Soares da Silva ^{1,2}, Allan Kardec Nogueira de Alencar ¹, Marina de Moraes Carvalho da Silva ^{1,3}, Tadeu Lima Montagnoli ^{1,3}, Bruna de Souza Rocha ^{1,2}, Rosana Helena Coimbra Nogueira de Freitas ¹, Roberto Takashi Sudo ^{1,3}, Carlos Alberto Manssour Fraga ^{1,3,*} and Gisele Zapata-Sudo ^{1,2,3,*}

- ¹ Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil; graziellemed@gmail.com (G.F.S.); ssjck@hotmail.com (J.S.d.S.); allankdc@gmail.com (A.K.N.d.A.); marina-mcs@hotmail.com (M.d.M.C.d.S.); tmontagnoli@gmail.com (T.L.M.); brunadesouzarochoa.98@gmail.com (B.d.S.R.); freitasrh@yahoo.com.br (R.H.C.N.d.F.); rtakashisudo@gmail.com or rtsudo@icb.br (R.T.S.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Cardiologia, Instituto do Coração Edson Saad, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-913, RJ, Brazil
- ³ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil
- * Correspondence: cmfraga@ccsdecania.ufrj.br (C.A.M.F.); gzsudo@gmail.com or gsudo@icb.ufrj.br (G.Z.-S.); Tel./Fax: +55-21-39386478 (C.A.M.F.); +55-21-39386505 (G.Z.-S.)



Citation: Silva, G.F.; da Silva, J.S.; de Alencar, A.K.N.; de Moraes Carvalho da Silva, M.; Montagnoli, T.L.; de Souza Rocha, B.; de Freitas, R.H.C.N.; Sudo, R.T.; Fraga, C.A.M.; Zapata-Sudo, G. Novel p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor Reverses Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 900. <https://doi.org/10.3390/ph15070900>

Academic Editor: Gary J. Stephens

Received: 7 June 2022

Accepted: 16 July 2022

Published: 21 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling is strongly implicated in cardiovascular remodeling in pulmonary hypertension (PH) and right ventricle (RV) failure. The effects of a newly designed p38 inhibitor, LASSBio-1824, were investigated in experimentally induced PH. Male Wistar rats were exposed to hypoxia and SU5416 (SuHx), and normoxic rats were used as controls. Oral treatment was performed for 14 days with either vehicle or LASSBio-1824 (50 mg/kg). Pulmonary vascular resistance and RV structure and function were assessed by echocardiography and catheterization. Histological, immunohistochemical and Western blot analysis of lung and RV were performed to investigate cardiovascular remodeling and inflammation. Treatment with LASSBio-1824 normalized vascular resistance by attenuating vessel muscularization and endothelial dysfunction. In the heart, treatment decreased RV systolic pressure, hypertrophy and collagen content, improving cardiac function. Protein content of TNF- α , iNOS, phosphorylated p38 and caspase-3 were reduced both in lung vessels and RV tissues after treatment and a reduced activation of transcription factor c-fos was found in cardiomyocytes of treated SuHx rats. Therefore, LASSBio-1824 represents a potential candidate for remodeling-targeted treatment of PH.

Keywords: pulmonary hypertension; right ventricle failure; MAPK inhibitor; SU5416/hypoxia; inflammation

1. Introduction

Pulmonary hypertension (PH) is a clinical condition in which remodeling and deleterious obstruction of the pulmonary vessels are observed and culminate in a significant rise in pulmonary arterial resistance and pressure [1]. It affects approximately 10% of the elderly population worldwide [2] and 3–10 new cases per million are diagnosed each year, mostly in young women [3]. When no adequate treatment is used, a mean survival of 2.8 years is expected, and, even considering recent advances in therapeutics, the survival rate remains only 61% after 5 years of diagnosis [3,4].

Low survival rates are associated with right-ventricle (RV) dysfunction and failure, as consequences of increased pulmonary-vessel tone and vascular remodeling [1,5,6]. Currently available treatment for PH targets the reduction of pulmonary arterial vasoconstriction but does not significantly attenuate vascular remodeling or pathophysiological

mechanisms involved in the advent of heart failure [1,5]. Alternative targets are highlighted in studies of drug development, which could delay the rapid progression of vascular lesions and RV dysfunction.

The events involved in cardiac and vascular remodeling observed in PH are conducted by abnormal smooth-muscle cells, endothelium, fibroblasts, myofibroblasts and perivascular immune cells [1,6–11]. Therefore, it is important to consider the multiple molecular signaling pathways in order to explore novel therapeutic targets for PH treatment [5,9,12]. Recently, sotatercept, which counterbalances hypertrophic stimuli caused by decreased signaling through bone morphogenetic protein receptor 2, is ultimately reducing pulmonary vascular resistance and cardiac hypertrophy [13].

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) trigger pathophysiological mechanisms in several diseases, by modulating cell proliferation, differentiation, survival and tissue inflammation [14–18]. Inhibition of p38 has shown beneficial effects in animal models of both PH and RV failure [9,12,19–21]. Activation of p38 is implicated in increased production of inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor (TNF)- α and inducible nitric oxide synthase (iNOS) [22–24]. In addition, p38 also regulates cell apoptosis mediated by caspases [14–16], which is an important condition involved in vascular remodeling during PH. Moreover, an independent role in RV hypertrophy and dysfunction in response to pressure overload was also demonstrated for this MAPK [14,19]. Thus, p38 inhibition in the cardiopulmonary system could promote beneficial effects directly in both RV and lungs with slight systemic side effects.

Recently, the synthesis of (E)-N'-(4-(pyridin-2-yl)benzylidene)-2-naphthohydrazide (LASSBio-1824, Figure 1) was reported [25]. This new N-acylhydrazone derivative inhibited p38 in an in vitro biochemical assay and showed anti-inflammatory activity in vivo after oral administration in mice [25]. Based on this, the present work investigated the pharmacological effects of LASSBio-1824 in the pathophysiological changes in structure and function of the cardio-pulmonary system in rats with hypoxia+SU5416-induced (SuHx) PH.

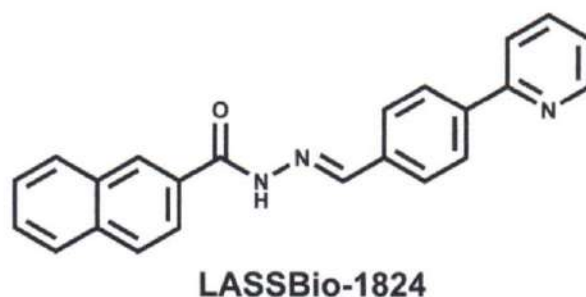


Figure 1. Molecular structure of LASSBio-1824.

2. Results

2.1. LASSBio-1824 Selectively Decreases Pulmonary Vascular Resistance

Increased vascular resistance was observed after induction of PH due to a significant reduction of the ratio of pulmonary flux acceleration time (PAT) to total ejection time (PET) detected on Doppler transthoracic echocardiography (TTE) in rats submitted to SuHx model ($p < 0.05$; Figure 2A). When orally administered for 2 weeks, LASSBio-1824 significantly reduced vascular resistance in pulmonary vascular bed, as indicated by increased PAT/PET ratio when compared with vehicle-treated SuHx rats ($p < 0.05$; Figure 2A). At the end of protocol, the appearance of a mid-systolic notch was evident in the flow profile in pulmonary arteries from SuHx + vehicle group, while LASSBio-1824 normalized the flow shape (Figure 2B upper). Meanwhile, no alterations in body weight or systemic hemodynamics were observed between SuHx and normoxic groups, regardless of treatment (Table 1).

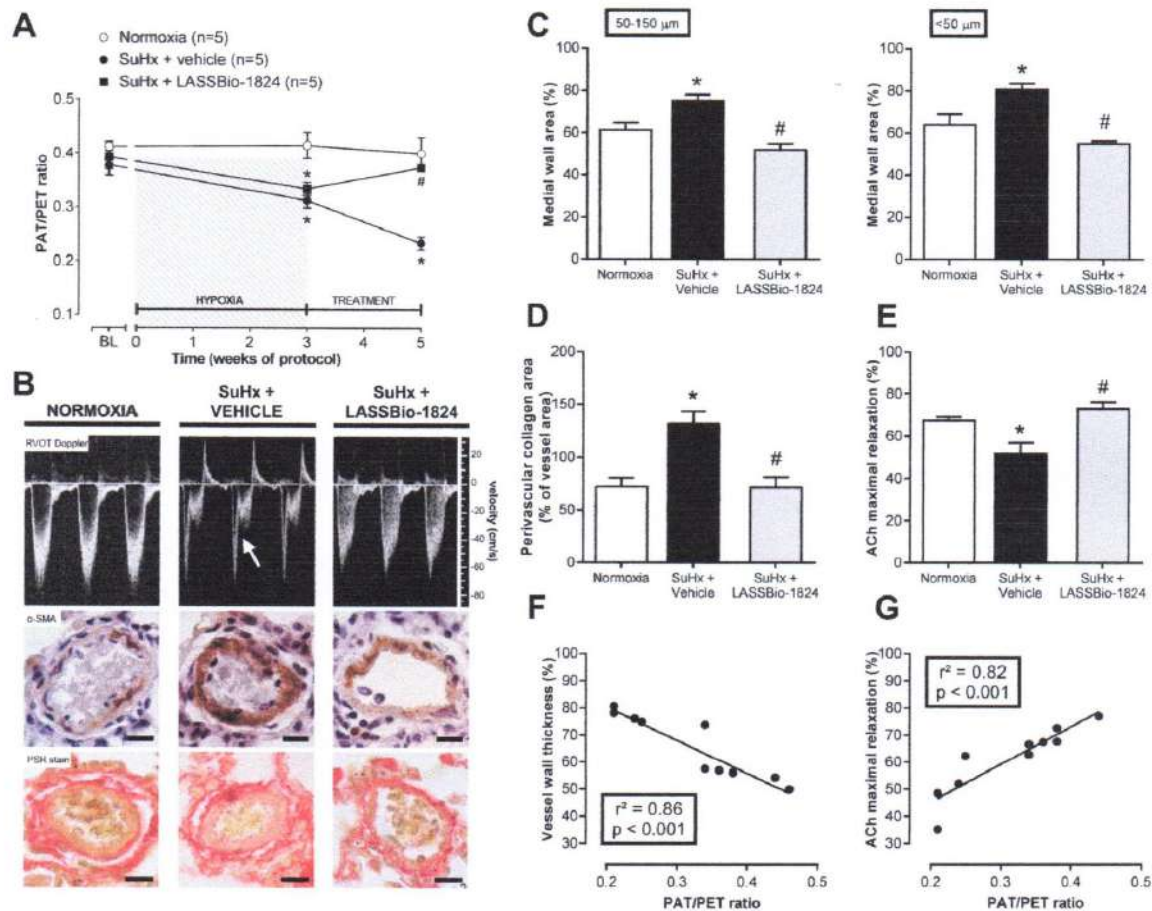


Figure 2. Effect of LASSBio-1824 on pulmonary vascular resistance and remodeling in SuHx. (A) Time course of pulmonary vascular resistance development after model induction and treatments ($n = 5$ rats per group). (B) Representative images of RVOT Doppler TTE, α -SMA immunostain and PSR stain of lung vessels. Arrow depicts a mid-systolic notch in pulmonary flux profile. Bars represent 20 μ m. (C), Medial wall hypertrophy of lung vessels ($n = 5$ rats per group). (D) Perivascular fibrosis around lung vessels ($n = 5$ rats per group). (E) Maximal ACh-induced relaxation of pulmonary arteries ($n = 5$ rats per group). (F) Correlation analysis between endpoint pulmonary vascular resistance and wall hypertrophy. (G) Correlation analysis between endpoint pulmonary vascular resistance and endothelial function. ACh, acetylcholine; PAT, pulmonary acceleration time; PET, total ejection time; PSR, picro-Sirius red; RVOT, right-ventricle outflow tract; SMA, smooth-muscle actin; TTE, transthoracic echocardiography. * $p < 0.05$ compared to normoxia. # $p < 0.05$ compared to SuHx + Vehicle.

Table 1. Body morphometry and vascular hemodynamics.

Parameter	Normoxia	SuHx + Vehicle	SuHx + LASSBio-1824
Body weight (g)	236.4 $\pm$ 5.5	220.8 $\pm$ 9.1	206.5 $\pm$ 16.5
Systolic BP (mmHg)	106.9 $\pm$ 6.8	104.7 $\pm$ 3.8	97.2 $\pm$ 8.6
Diastolic BP (mmHg)	79.5 $\pm$ 7.1	81.6 $\pm$ 4.5	71.3 $\pm$ 5.4
Mean BP (mmHg)	93.3 $\pm$ 6.9	93.4 $\pm$ 4.1	84.2 $\pm$ 2.8

Data represent mean $\pm$ SEM ($n = 5$ rats per group). BP, blood pressure.

2.2. LASSBio-1824 Reduces Medial Hypertrophy and Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arteries

After five weeks of protocol, smooth-muscle actin immunostaining of lung sections showed that SuHx + vehicle rats displayed a significant thickening of distal pulmonary vessels when compared to normoxic rats ($p < 0.05$; Figure 2B middle, and Figure 2C). Medial hypertrophy was accompanied by a marked expansion of perivascular collagen, as noticed in picro-Sirius red stain ($p < 0.05$; Figure 2B lower, and Figure 2D). Such changes were not observed in SuHx + LASSBio-1824 group ($p < 0.05$; Figure 2C,D), indicating that oral treatment for 14 days with this *N*-acylhydrazone significantly reduced the proliferation of smooth-muscle cells and fibroblasts in vascular walls.

Endothelial-mediated vasodilatation of pulmonary arteries was impaired in SuHx + vehicle animals ($p < 0.05$; Figure 2E and Table 1), as indicated by a reduction in acetylcholine (ACh)-induced maximal relaxation. In contrast, endothelial function was preserved in SuHx rats treated with LASSBio-1824, as indicated by increased vasodilatory response to ACh compared to SuHx + vehicle rats ($p < 0.05$). No changes were observed in contractile responses of pulmonary arteries to phenylephrine (Table 2). In addition, both medial hypertrophy and endothelial function displayed significant correlations with the improvement in pulmonary vascular resistance ($p < 0.05$; Figure 2F,G).

Table 2. Pulmonary artery dose-response parameters.

Parameter	Normoxia	SuHx + Vehicle	SuHx + LASSBio-1824
Phenylephrine EC ₅₀ (nM)	62.6 ± 5.9	82.7 ± 22.8	91.1 ± 2.6
Phenylephrine E _{max} (%)	100.0	100.0	100.0
Acetylcholine EC ₅₀ (nM)	66.1 ± 18.6	72.2 ± 26.2	136.0 ± 49.2
Acetylcholine E _{max} (%)	67.5 ± 2.1	51.9 ± 5.0 *	74.1 ± 3.0 #

Data represent mean ± SEM ($n = 5$ rats per group). * $p < 0.05$ compared to Normoxia. # $p < 0.05$ compared to SuHx + Vehicle. EC₅₀, half maximal effective concentration; E_{max}, maximal effect.

2.3. LASSBio-1824 Alleviates RV Overload and Remodeling and Preserves RV Function

While no significant differences were detected in LV hemodynamics and structure between groups (Table 3), increased pulmonary vascular resistance in the SuHx + vehicle group resulted in elevated RV systolic pressures and severe reduced RV cardiac output ($p < 0.05$; Figure 3A and Table 3). SuHx-induced RV overload led to a significant ventricular hypertrophy, as indicated by both TTE (Figure 3B upper and Figure 3C) and Fulton index (Figure 3D). Moreover, RV dilatation was also detected in echocardiographic analysis in SuHx rats (Figure 3B lower and Figure 3E). Reduction in vascular resistance by oral treatment with LASSBio-1824 resulted in normalization of RV systolic pressure and cardiac function, as well as preservation of RV thickness and area in rats with PH ($p < 0.05$; Figure 3A–E and Table 3).

Table 3. Cardiac function and ventricular hemodynamic measurements.

Parameter	Normoxia	SuHx + Vehicle	SuHx + LASSBio-1824
Heart rate (bpm)	283.0 ± 110.2	302.5 ± 25.56	285.1 ± 13.67
LV cardiac output (mL·min ⁻¹)	86.18 ± 7.55	73.23 ± 3.91	81.36 ± 4.35
LV systolic pressure (mmHg)	98.1 ± 4.1	83.3 ± 5.2	89.6 ± 2.4
LV area (mm ²)	35.3 ± 3.0	34.2 ± 3.6	32.4 ± 4.3
RV cardiac output (mL·min ⁻¹)	90.25 ± 3.9	67.45 ± 5.4 *	91.21 ± 6.15 #
RV end diastolic pressure (mmHg)	6.77 ± 1.23	7.01 ± 3.62	4.81 ± 1.66
RV + dP/dt (mmHg·s ⁻¹)	1162 ± 193	1608 ± 317	1114 ± 209
RV − dP/dt (mmHg·s ⁻¹)	−1117 ± 171	−1753 ± 426	−1074 ± 165

Data represent mean ± SEM ($n = 5$ rats per group). * $p < 0.05$ compared to Normoxia. # $p < 0.05$ compared to SuHx + Vehicle. LV, left ventricle; RV, right ventricle.

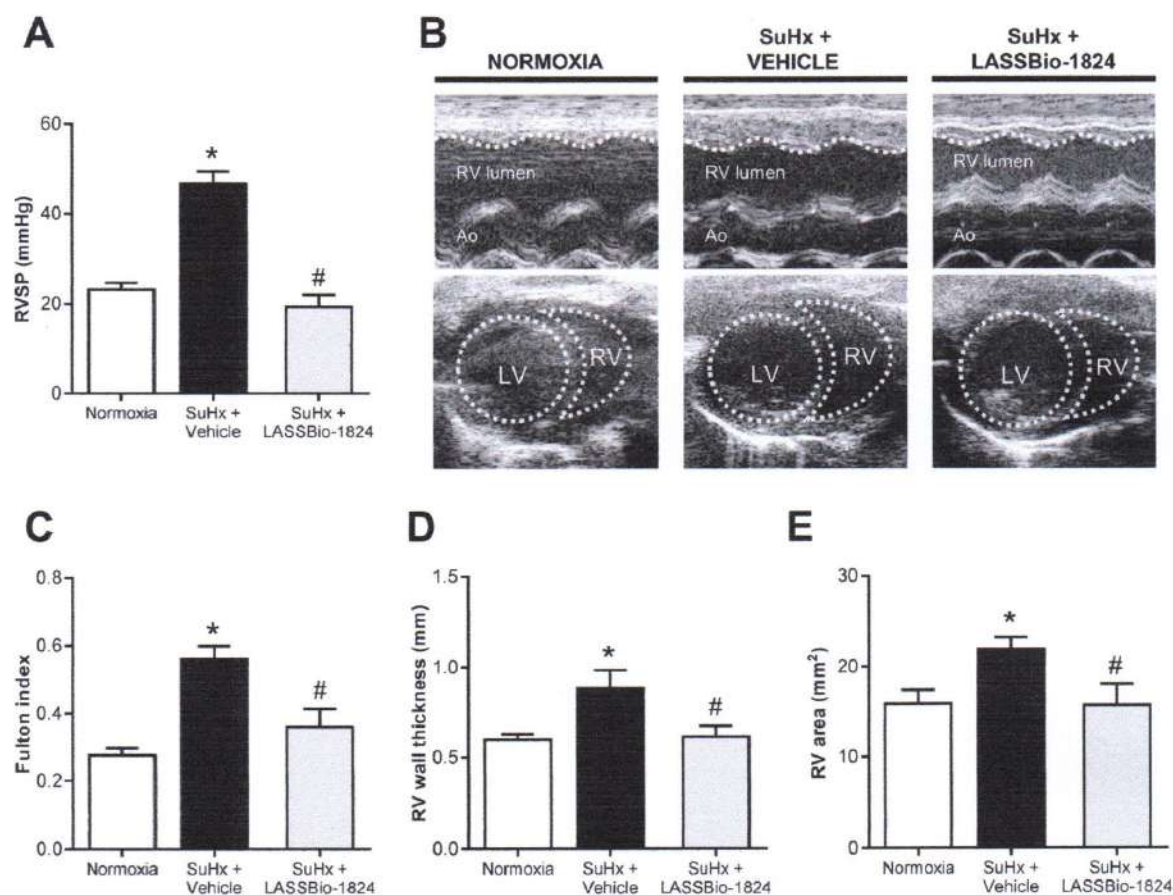


Figure 3. Effect of LASSBio-1824 on right-ventricle remodeling and hemodynamics in SuHx. (A) RV systolic pressures after treatment ($n = 5$ rats per group). (B) Representative images of cardiac structure by TTE. Traced lines depict ventricular endocardial surfaces. (C) Fulton index of hypertrophy of RV ($n = 5$ rats per group). (D) Echocardiographic measurement of RV wall hypertrophy ($n = 5$ rats per group). (E) Echocardiographic measurement of RV end-diastolic area ($n = 5$ rats per group). Ao, aorta; LV, left ventricle; RV, right ventricle; RVSP, right-ventricle systolic pressure; TTE, transthoracic echocardiography. * $p < 0.05$ compared to normoxia. # $p < 0.05$ compared to SuHx + Vehicle.

A similar trend was observed in histologic analysis of RV tissues, since increased interstitial cell numbers and collagen deposition were found in SuHx rats and LASSBio-1824 significantly reduced both parameters ($p < 0.05$; Figure 4A–C).

2.4. Administration of LASSBio-1824 Normalized Inflammation in Lung and RV

When compared to the normoxia group, lung immunohistochemistry in SuHx + vehicle rats revealed a significant increase in vascular protein content of important inflammatory mediators, such as TNF- α and iNOS, which resembled p38 MAPK expression ($p < 0.05$; Figure 5A–D). Oral treatment with LASSBio-1824 greatly attenuated vessel inflammatory marker content and p38 protein expression ($p < 0.05$; Figure 5A–D).

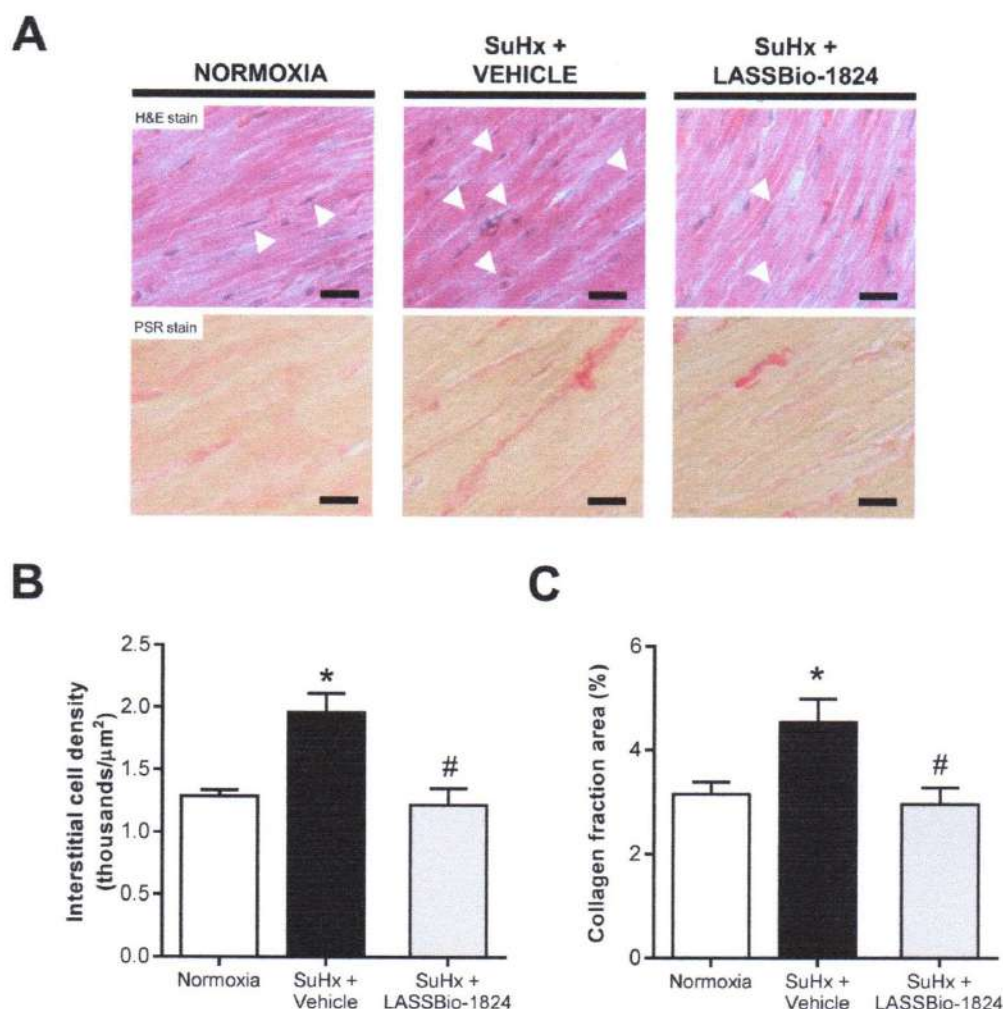


Figure 4. Impact of LASSBio-1824 on RV histology in SuHx. **(A)** Representative micrographs of RV sections with H&E and PSR stains. White arrowheads indicate interstitial cell nuclei. Bars represent 20 μm . **(B)** Interstitial cell density in RV tissue ($n = 5$ rats per group). **(C)** Red-stained collagen area of RV ($n = 5$ rats per group). H&E, hematoxylin-eosin; PSR, picro-Sirius red; RV, right ventricle. * $p < 0.05$ compared to normoxia. # $p < 0.05$ compared to SuHx + Vehicle.

Furthermore, the increase in $\text{TNF-}\alpha$ and iNOS was reinforced by using Western blot analysis, and exacerbated activation of p38 and caspase 3 was observed in RV homogenates from vehicle-treated SuHx animals ($p < 0.05$; Figure 6A–B). LASSBio-1824 normalized the expression of inflammatory markers and caspase activation, matching the reduction seen in p38 phosphorylation (Figure 6A–B). Immunohistochemical staining displayed intense nuclear localization of c-fos in RV from SuHx + vehicle rats, possibly in response to higher cardiomyocyte stress ($p < 0.05$; Figure 6C,D) which was attenuated by LASSBio-1824. The reduction in the activity of this transcription factor in RV myocytes indicates possible inhibition of the early gene program and consequent cell dysfunction and apoptosis ($p < 0.05$; Figure 6C,D).

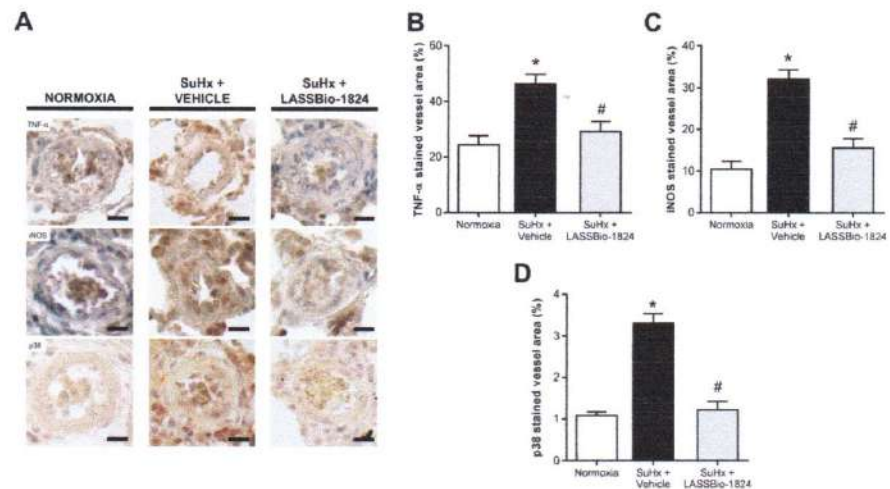


Figure 5. Effect of LASSBio-1824 on lung vasculature content of tissue-inflammation mediators in SuHx. (A) Representative micrographs of TNF- α , iNOS and total p38 immunohistochemistry. Bars represent 20 μ m. (B) Brown-stained wall area of pulmonary vessels corresponding to detected TNF- α ($n = 5$ rats per group). (C) Brown-stained wall area of pulmonary vessels corresponding to detected iNOS ($n = 5$ rats per group). (D), Brown-stained wall area of pulmonary vessels corresponding to detected total p38 ($n = 5$ rats per group). iNOS, inducible nitric oxide synthase; TNF, tumor necrosis factor. * $p < 0.05$ compared to normoxia. # $p < 0.05$ compared to SuHx + Vehicle.

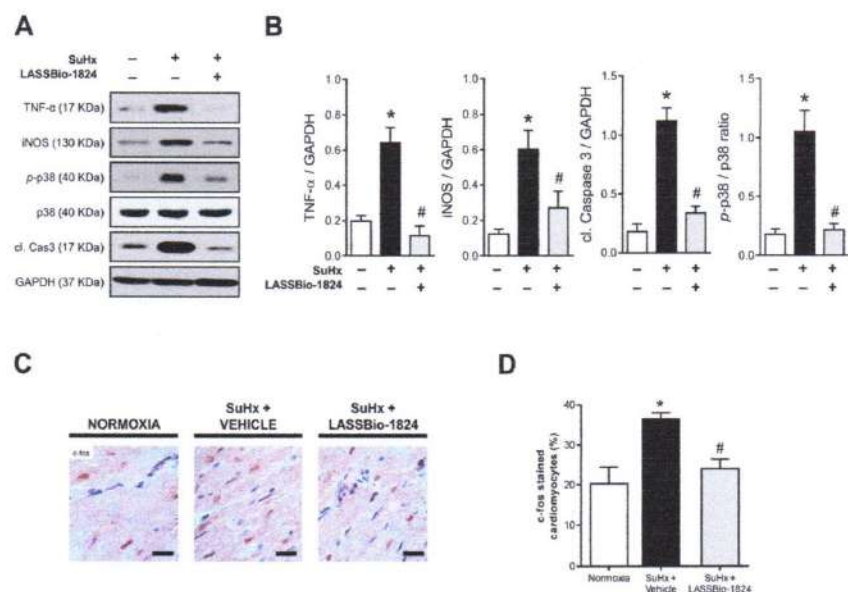


Figure 6. Effect of LASSBio-1824 on RV content of tissue inflammation mediators and cardiac stress and apoptosis in SuHx. (A) Representative images of TNF- α , iNOS, phosphorylated and total p38, cleaved caspase 3 and GAPDH immunodetection after Western blot ($n = 5$ biological replicates). (B) Relative densities of TNF- α , iNOS, cleaved caspase 3 and phosphorylated p38 in RV samples, respectively ($n = 5$ rats per group). (C) Representative micrographs of c-fos immunohistochemistry in RV sections. Bars represent 20 μ m. (D) Brown-stained cardiomyocyte nuclei abundance in RV samples ($n = 5$ rats per group). cl., cleaved; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; RV, right ventricle; TNF, tumor necrosis factor. * $p < 0.05$ compared to normoxia. # $p < 0.05$ compared to SuHx + Vehicle.

3. Discussion

Although the number of therapies for PH has increased in the last years, currently used vasodilators do not directly address the cardiovascular remodeling associated with disease progression. Therefore, the investigation of new targets that regulate tissue remodeling is of great interest for the development of new drugs for treatment of PH. Recently, the importance of inflammation to the pathways involved in tissue remodeling has gained attention [8,10], and drugs with anti-inflammatory activity represent a promising alternative for management of disease progression.

PH is a multifactorial disease associated with low survival rate in the absence of adequate treatment [1,3,4]. Mortality is correlated to RV dysfunction, which in turn is a consequence of increased pulmonary vascular resistance and remodeling [1,5,6]. Many cell types and stimuli are involved in the initiation, evolution and stabilization of vascular lesions [6–11]. Inflammatory stimuli in the vessel wall not only induces infiltration of circulating leukocytes but also stimulates endothelial and smooth-muscle cells to oppose apoptosis, resulting in a proliferative condition [8,10]. Although these aspects may involve different intracellular pathways, some enzymes such as MAPK are important key factors [12,14–18]. Among MAPK enzymes, the importance of p38 in PH was previously reported, because its expression and activity are increased in patients [12,20,21,26]. The relevance of p38 activation to PH pathogenesis is evidenced by its involvement in different cellular processes triggered by growth factors, inflammatory cytokines, reactive oxygen species, hypoxia and environmental stress [14,15,18]. Signaling through p38 interferes with the balance between cell survival and apoptosis, and mediates inflammatory cytokine production locally [14–18]. Recently, a noncanonical pathway was demonstrated which may also contribute to MAPK signaling perpetuation by a positive feedback of p38 activation [14,15].

When activated, p38 translocates from cytoplasm to nucleus and phosphorylate transcription factors involved in inflammation, cell proliferation and apoptosis [14,15]. Increased p38 expression and activity found in lung vessels from patients with idiopathic PH further suggest a key role for this MAPK in pulmonary vascular remodeling [20,21,26], in addition to a selective pulmonary vasoconstriction in response to hypoxia [26]. Those features could significantly account for the vascular remodeling in the small circulation [11], hypertrophy and dysfunction of RV with subsequent failure. Furthermore, the role of p38 in cardiac and vascular remodeling was previously described in rodent models of PH and pressure-overload-induced RV dysfunction [19–21].

N-acylhydrazones are known for their extensive beneficial biological activities, including anti-inflammatory effects [27,28]. LASSBio-1824 is a new N-acylhydrazone that demonstrated p38 inhibiting activity *in vitro* and promoted a reduction in inflammatory cell migration by attenuating cytokine production in mice [25]. Oral administration of this compound displayed improved anti-TNF activity when compared to SB203580, suggesting a better drug-likeness profile than currently studied p38 inhibitors [25]. Therefore, the kinase inhibition activity and anti-inflammatory effects *in vivo* prompted the study of LASSBio-1824 as a potential treatment for PH.

PH is marked by an increase in pulmonary vascular resistance caused by increased tone and remodeling in intrapulmonary arterioles. The SuHx model exhibits several characteristics of human PH, including histological and hemodynamic alterations [29–31]. Herein, it was demonstrated that SuHx rats developed PH after 21 days due to slower blood flow through the pulmonary arteries, as indicated by short PAT/PET ratio. Moreover, elevated pulmonary vascular resistance and vessel stiffness lead to premature wave reflection towards the RV during systole, impairing RV ejection and causing a notch in the Doppler profile [32,33], an alteration seen in late-stage PH [33,34]. Treatment with LASSBio-1824 normalized the pulmonary blood-flow wave shape and abolished the mid-systolic notch, which accompanied the increase in PAT/PET, indicating a normalization of blood flow through pulmonary circulation.

Increased vascular tone on pulmonary arteries results from an association of increased vessel stiffness and decreased endothelial-mediated vasodilation. Decreased endothelial

function results of impaired production of vasodilators [9,11], contributing to increased pulmonary vascular resistance, suggesting a significant correlation between PAT/PET ratios and ACh-induced maximal relaxation in SuHx rats. Endothelial dysfunction occurs in PH due to endothelial phenotype changes associated with excessive release of growth factors, chemokines, cytokines and vasoconstrictors [1]. The actions of these mediators converge to p38 activation, resulting in exacerbated cell proliferation, resistance to apoptosis and inflammation observed in PH subjects [20,35–37]. LASSBio-1824 enhanced ACh response in pulmonary arteries from SuHx rats, normalizing the endothelial control of vascular tone, suggesting that p38 inhibition decreased endothelial phenotype transition.

Pulmonary vascular remodeling contributes not only to raise vascular tone but also to reduce vessel wall compliance. Increased wall thickness and perivascular fibrosis are among the most common alterations seen in vascular lesions from PH patients [1]. In this study, increased muscularization and perivascular collagen content were found in lung arterioles from SuHx + vehicle animals, indicating significant vessel remodeling in this group. This alteration affected the pulmonary vascular resistance, as PAT/PET ratios were negatively correlated to medial wall area.

Vascular remodeling results from activation of smooth-muscle cells and fibroblasts [1,38], which involve p38 MAPK pathways [22,26]. Increased p38 content is found in lung arterioles and peripheral blood leukocytes from PH patients [20,39], and its activation upregulates TNF- α and iNOS in the vessel wall, stimulating proliferation, arteriole muscularization and collagen synthesis [16,22,26,40,41]. In addition, TNF- α secretion in the vasculature also promotes endothelial permeability, facilitating the infiltration of circulating leukocytes and aggravating tissue inflammation [42–44]. Our data demonstrate not only an increase in iNOS and TNF- α expression, but also higher p38 content in pulmonary vessels of SuHx rats, which indicates abnormal p38 MAPK signaling in these remodeled arterioles. The effect of LASSBio-1824 on vascular remodeling is concomitant to the normalization in p38 protein content, presumably by limiting the signaling through this MAPK and reducing TNF- α and iNOS concentration in arterioles.

The persistent afterload induced by PH promotes adaptive changes on RV structure, leading to dysfunction and failure [12,19]. Increased RV systolic pressure was found in SuHx rats, which affected RV structure and function, as seen by its hypertrophy, dilatation and impaired output. However, after LASSBio-1824 treatment those parameters were similar to normoxic controls, which could be due, in part, to the attenuation in vascular remodeling and consequent afterload, since p38 MAPK signaling is also directly implicated in ventricular remodeling [19].

Increased protein content and phosphorylation are observed in RV in PH models, where it stimulates cardiac fibroblasts through myocardin-related transcription factor and metalloproteinase-9 activation [19,45]. Elevated interstitial cell density and collagen content were seen in RV from SuHx rats, indicating increased stromal cell proliferation and activation in response to cardiac overload. LASSBio-1824 reversed these alterations, reducing RV fibrosis and cell density in SuHx animals. Simultaneously to these findings, a reduction in p38 phosphorylation was found, which implies noncanonical activation of this enzyme by a positive feedback loop, mediated by the scaffold protein and p38 substrate TAB1 [14,15].

p38 MAPK signaling is directly involved in the progression of ventricular dysfunction, because it promotes cardiomyocyte adaptation to different stressors, which in turn triggers mechanisms of cardiac inflammation and further stimulates fibrosis [14,15,46,47]. Cardiac activation of caspase-3 leads to an ongoing apoptotic process in RV tissue in PH rats, indicating a transitioning to failing phenotype in RV myocytes [16,48]. This finding is related to the chamber dilatation seen in TTE images in the SuHx + vehicle group. Chronic mechanical overload leads to cardiomyocyte stress and activation of early response pathways, such as increased c-fos expression and activity [49,50]. Transcription of the FOS gene is dependent on serum response factor activation, which in turn is a downstream target of p38 MAPK signaling [18,19]. Therefore, increased c-fos nuclear expression in

cardiomyocytes indicates increased p38 phosphorylation and activity in these cells, as seen by the concomitant increase in both parameters in SuHx rats. In contrast, LASSBio-1824 reduced caspase-3 activation by reducing cardiomyocyte stress signaling, as suggested by attenuated c-fos expression in myocyte nuclei through inhibition of p38 signaling.

Cardiac expression of TNF- α and iNOS is also dependent on p38 activity [15,23,24] and has been associated with the development of RV hypertrophy and progression to RV failure [51–55]. Increased content of both mediators was found in the SuHx + vehicle group and was normalized by treatment with LASSBio-1824, correlating their expressions to activated p38 levels. Moreover, since those proteins are responsible for the cardiac inflammation and fibrosis [27,56,57], the effect of LASSBio-1824 on attenuating their expression also contributes to the reduction in cardiac collagen content.

4. Materials and Methods

4.1. Drugs and Reagents

LASSBio-1824 and SU5416 were provided by Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio[®]; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro Brazil). Dimethylsulfoxide, ketamine and xylazine were gently provided by Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos (Itapira, São Paulo, Brazil). Antibodies used in this work are described in Table 4. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Table 4. Antibodies used in this work.

Target	Host	Clonality	Conjugate	Cat. No.	Vendor
p38	Mouse	Monoclonal	–	ab1793	AbCam (Cambridge, MA, USA)
phosphorylated-p38	Rabbit	Polyclonal	–	ab13847	AbCam (Cambridge, MA, USA)
TNF- α	Rabbit	Polyclonal	–	ab7952	AbCam (Cambridge, MA, USA)
iNOS	Rabbit	Polyclonal	–	4511	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
cleaved caspase 3	Rabbit	Polyclonal	–	2982	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
α -SMA	Mouse	Monoclonal	–	5174	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
GAPDH	Mouse	Monoclonal	–	A2547	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Rabbit IgG	Goat	Polyclonal	HRP	1706515	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Mouse IgG	Goat	Polyclonal	HRP	1706516	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Mouse/Rabbit IgG	Goat	Polyclonal	HRP	414191F	Nichirei Biosciences (Tokyo, Japan)

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HRP, horseradish peroxidase; IgG, immunoglobulin G; iNOS, inducible nitric oxide synthase; SMA, smooth-muscle actin; TNF, tumor necrosis factor.

4.2. Animals and Experimental Design

All experimental protocols were approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals at Universidade Federal do Rio de Janeiro (license number 039/19). Male Wistar rats (180–250 g) originated from the Animal Facility of Universidade Federal do Rio de Janeiro and were housed in cages containing 3–4 animals at 21 ± 1 °C, under a light/dark cycle of 12 h with free access to chow and water. Rats were kept in accordance with the Brazilian Guide of Production, Maintenance and Utilization of Animals for Teaching or Scientific Research Activities (1st edition, 2016) approved by the National Council for Control of Animal Experimentation.

PH was induced in rats by administration of SU5416 during exposure to hypoxia, which reproduces the severe and persistent vascular remodeling and RV failure similar to late-stage human disease [29,30,58]. This rat model, SuHx, develops more severe features than hypoxia only [29–31] with a progressive proliferative endotheliopathy caused by SU5416 after their return to normoxia [29,30].

Figure 7 shows the delineation of the experimental protocol.

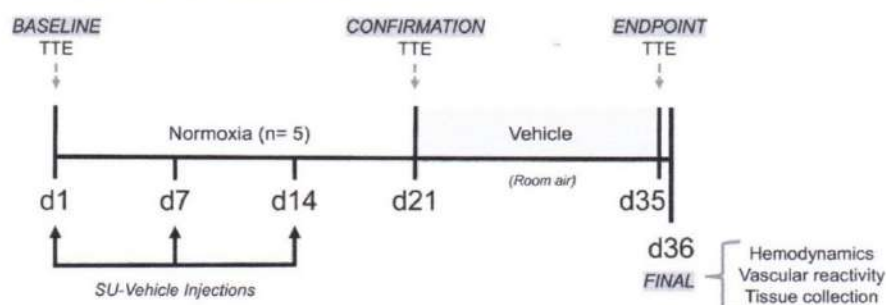
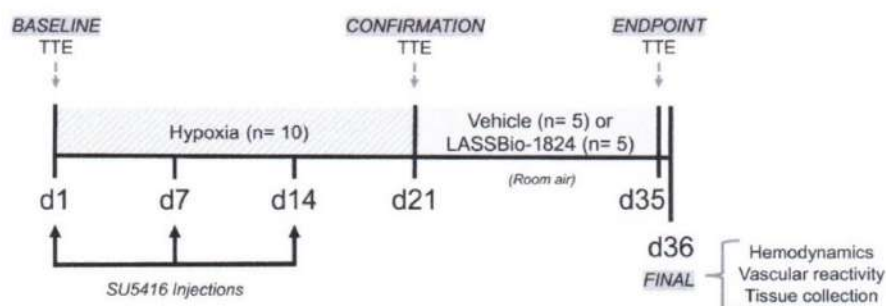
A CONTROL: Normoxia**B PH MODEL: SuHx**

Figure 7. Model induction, therapeutic protocol and measurement schedules. **(A)** Control animals ($n = 5$) were maintained in room air (normoxia, FiO_2 : 21%) throughout the experimental protocol and received both weekly SU-vehicle (i.p.) and after 3 weeks, daily vehicle (DMSO, 100 μL p.o.). **(B)** SuHx animals were maintained in hypoxic chamber (FiO_2 : 10%) and received both weekly SU5416 (20 mg/kg i.p.) for 3 weeks and after return to normoxia, daily vehicle (DMSO, 100 μL p.o., $n = 5$) or LASSBio-1824 (50 mg/kg p.o., $n = 5$). TTE, transthoracic echocardiography.

Rats were randomly divided into two groups: Normoxia ($n = 5$), who were maintained in room air and used as controls; and SuHx ($n = 10$), in which PH was induced. Animals in the SuHx group were subjected to 3 weeks of normobaric hypoxia in a ventilated acrylic chamber, where atmospheric oxygen concentration was kept at 10% by an oxycycler controller (ProOx 360, BioSpherix; Lacona, NY, USA) using nitrogen. Humidity and carbon dioxide were kept at a minimum by continuous adsorption with silica gel and soda lime granules. The chamber was opened every 3 days for less than 20 min in order to clean cages and replenish food and water. SuHx rats received weekly intraperitoneal injections of 20 mg/kg SU5416 suspended in SU-vehicle (0.5% carboxymethylcellulose, 0.4% Tween80 and 0.9% benzyl alcohol in isotonic saline) [31].

Doppler TTE was performed before and after three weeks of hypoxia in rats, as described in the next section. The reduction in the PAT/PET ratio indicated the establishment of PH [29,30,59]. Once disease onset had been confirmed, SuHx rats were then re-exposed to normoxia for two additional weeks and randomly assigned into two groups for oral treatment with either vehicle (DMSO; 100 μL) or LASSBio-1824 (50 mg/kg in DMSO). Normoxic controls were orally administered with DMSO (100 μL). The dose of LASSBio-1824 used was chosen considering previous reports, in which similar N-acylhydrazone compounds (1,2) promoted significant improvement of right ventricular dysfunction and vascular remodeling in monocrotaline-induced PH [28,60].

4.3. Transthoracic Echocardiography (TTE)

Under spontaneous ventilation, animals were anesthetized initially with 3% and followed by 1.5% of isoflurane/oxygen mixture. Each examination, from anesthesia to acquiring recordings, required not more than 10 min. RV hemodynamics and cardiac structure and function were assessed using a high-resolution ultrasound imaging system equipped with a RMV-710B transducer with 25 MHz and a fixed focal length of 15 mm (Vevo 770, Visualsonics, Toronto, Canada). All measurements were obtained according to the American Society of Echocardiography Guidelines.

Assessment of pulmonary vascular resistance was performed noninvasively through measurement of PAT obtained by pulsed-wave Doppler TTE at the RV outflow tract (RVOT) [29,31,33,34]. Values obtained for PAT were normalized to PET, in order to attenuate the influence of possible heart-rate fluctuations unrelated to PH [30,61].

Pulmonary-artery diameter (PAd) and velocity-time integral (VTI) were measured in the parasternal short-axis plane in mid-systole by 2-dimensional and pulsed-wave Doppler, respectively. RV cardiac output (RVCO) was calculated as $RVCO = 0.785 \times (PAd)^2 \times VTI \times \text{heart rate}$. RV wall thickness was obtained in M-mode in order to determine an indirect index of hypertrophy [31,61]. RV and LV areas were obtained in B-mode and LV stroke volume (LVSV) was calculated using Simpson's method. LV cardiac output (LVCO) was calculated using $LVCO = LVSV \times \text{heart rate}$ [29,31].

4.4. Vascular and Intraventricular Hemodynamic Measurements

Animals underwent deep anesthesia with ketamine (80 mg/kg, i.p.) and xylazine (15 mg/kg, i.p.) and were maintained on spontaneous ventilation during the procedures. A PTFE30 catheter was inserted into the carotid artery to measure systemic systolic, diastolic and mean arterial pressures, and the same was introduced to the LV to measure the LV systolic pressure (LVSP). The right jugular vein was used to access the right ventricle using a second PTFE30 catheter to record the RV systolic pressure, end diastolic pressure and contraction and relaxation rates (positive and negative dP/dt). All parameters were measured using Lab Chart software (Version 7.0, ADInstruments, Inc.; Sydney, Australia). Immediately after completion, animals were exsanguinated for tissue collection.

4.5. Vascular Reactivity of Pulmonary Artery Rings

Isometric tension measurements from pulmonary artery rings in response to phenylephrine and acetylcholine were recorded as described elsewhere [28]. Briefly, after dissection, arterial rings were immersed in oxygenated Tyrode saline solution. After equilibration for 2 h at 1.5 g resting tension, preparations were exposed to increasing concentrations of phenylephrine, and after attaining maximal contraction, to increasing concentrations of acetylcholine.

4.6. Morphometric and Histochemical Analysis

Before fixation, the RV was isolated from the LV and ventricular septum (S) and their wet weights were recorded for calculation of Fulton index of hypertrophy, as the ratio $RV/(LV + S)$ [31]. RV tissues were set in immersion in neutral buffered formalin. Left lungs were inflated with neutral buffered formalin to obtain a smooth surface.

Tissues were prepared using graded ethanol and xylene and embedded in molten paraffin. Paraffin blocks were randomly separated in order to stain and analyze by an independent observer. Paraffin sections (4 μ m) of RV and lungs were stained by hematoxylin-eosin and picro-Sirius red methods and analyzed following previously described protocols [31]. Immunostaining for smooth-muscle actin in lung sections was also performed as described earlier [31].

Lung sections were immunostained for TNF- α , iNOS and p38 after dewaxing, endogenous peroxidase quenching in 3% hydrogen peroxide and antigen retrieval in citrate (TNF α and p38) or Tris/EDTA (iNOS) buffer for 30 min at 98 °C. Nonspecific binding block was performed by incubation with 5% BSA in phosphate-buffered saline (PBS) for 60 min before

incubating overnight in primary antibodies at 1:50 dilution in 1% BSA-PBS. After washing in PBS, slides were incubated for 2 h in HRP polymer-conjugated secondary antibody (diluted 1:3 in PBS) followed by staining in 3,3'-diaminobenzidine solution. Hematoxylin was used as a counterstain and protein content was expressed by percentage stained area of the total field area under 1000 $\times$ magnification using the color threshold tool of Fiji software [62].

RV sections were immunostained for c-fos as described above, except for a permeabilization step in PBS containing 0.05% Tween20 for 30 min before nonspecific blocking in 1% normal goat serum in PBS for further 30 min. Nuclear translocation of c-fos protein in RV was expressed by the percentage of stained cardiomyocyte nuclei under 1000 $\times$ magnification.

4.7. Membrane Preparation and Western Blot

Immunoblotting was performed as previously described [31,32]. RV tissues were harvested, stored in lysis buffer and frozen in liquid nitrogen until homogenization. Cardiac tissues were homogenized in a potter glass homogenizer using lysis buffer (12.5% sucrose, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA) containing 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 mM benzamidine, 1 mM dithiothreitol, and 1 μ g/mL of protease inhibitors (pepstatin, chymostatin, aprotinin, leupeptin and antipain). The mixture was centrifuged for 5 min at 1000 $\times$ g and supernatant was collected and frozen. Total protein concentration in each sample was determined using Coomassie Blue reagent. Proteins (50 μ g) were separated in 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane using a semi-dry system (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Membranes were blocked using PBS 5% nonfat milk and 0.1% Tween20 and incubated with primary antibodies TNF- α (1:1000), active caspase-3 (1:1000), p-p38 (1:1000), iNOS (1:1000) and GAPDH (1:1000), in PBS. Freshly made antibody solution was used twice. After labeling the membranes with primary and secondary antibodies (1:10,000 in PBS), detection of specific bands was performed by chemiluminescence using ImageQuant (LAS4000, GE Healthcare Life Sciences; Chicago, IL, USA). Images acquired were analyzed in Fiji software [62] and individual protein-band densities from 5 biological replicates were normalized to GAPDH.

4.8. Statistical Analysis

Data were expressed as means $\pm$ standard errors of the mean (SEM) and were analyzed using GraphPrism software (version 6.0; GraphPad, San Diego, CA, USA). Data normality and homogeneity within groups were confirmed using Kolmogorov–Smirnov and Brown–Forsythe tests, respectively. The experimental groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) with a significance level of $p < 0.05$, followed by a *post hoc* Tukey test. Pearson correlation was used for correlation analysis between vessel wall thickness, endothelial function and changes in the PAT/PET ratio.

5. Conclusions

The novelty of this work is the demonstration of beneficial effects of a new orally active p38 inhibitor in rats with chronic hypoxia plus SU5416-induced PH. Oral treatment with LASSBio-1824 during 14 days reduced PH characteristics including altered blood flow and endothelial function in pulmonary arteries and tissue remodeling in lung vessels and RV. Inhibition of p38 by LASSBio-1824 attenuated tissue inflammation by reducing TNF- α and iNOS expressions and prevented apoptosis in response to stress in RV tissues by inhibiting c-fos and caspase-3 activation. The effects promoted by LASSBio-1824 contributed to lung and RV repair, which reinforce the importance of considering the p38 MAPK as a promising target to treat PH. Thus, the present data contribute to the hypothesis that p38 inhibition is an important approach for treatment of this deleterious cardio-pulmonary disease.

Author Contributions: Conceptualization, G.F.S., J.S.d.S., A.K.N.d.A., R.T.S. and G.Z.-S.; methodology, G.F.S., J.S.d.S., A.K.N.d.A., M.d.M.C.d.S., T.L.M. and B.d.S.R.; validation, J.S.d.S., A.K.N.d.A. and T.L.M.; formal analysis, G.F.S., J.S.d.S., A.K.N.d.A., M.d.M.C.d.S. and B.d.S.R.; investigation, G.F.S., J.S.d.S., A.K.N.d.A., M.d.M.C.d.S., T.L.M., B.d.S.R. and R.H.C.N.d.F.; resources, T.L.M., R.H.C.N.d.F.,

R.T.S., C.A.M.F. and G.Z.-S.; writing—original draft preparation, G.F.S. and A.K.N.d.A.; writing—review and editing, J.S.d.S., T.L.M. and G.Z.-S.; visualization, G.F.S., J.S.d.S., A.K.N.d.A., M.d.M.C.d.S. and T.L.M.; supervision, R.T.S. and G.Z.-S.; project administration, G.F.S., A.K.N.d.A. and G.Z.-S.; Funding acquisition, R.T.S., C.A.M.F. and G.Z.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro—FAPERJ, (# E-26/200.881/2021); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos—INCT-INOVAR.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Rio de Janeiro (# 039/19, 21 May 2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Humbert, M.; Guignabert, C.; Bonnet, S.; Dorfmüller, P.; Klinger, J.R.; Nicolls, M.R.; Olschewski, A.J.; Pullamsetti, S.S.; Schermuly, R.T.; Stenmark, K.R.; et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: State of the art and research perspectives. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*, 1801887. [\[CrossRef\]](#)
- Hooper, M.M.; Humbert, M.; Souza, R.; Idrees, M.; Kawut, S.M.; Sliwa-Hahnle, K.; Jing, Z.-C.; Gibbs, J.S.R. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir. Med.* **2016**, *4*, 306–322. [\[CrossRef\]](#)
- Hooper, M.M.; Ghofrani, H.-A.; Grünig, E.; Klose, H.; Olschewski, H.; Rosenkranz, S. Pulmonary Hypertension. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2017**, *114*, 73–84. [\[CrossRef\]](#)
- Wood, C.; Balciunas, M.; Lordan, J.; Mellor, A. Perioperative Management of Pulmonary Hypertension: A Review. *J. Crit. Care Med.* **2021**, *7*, 83–96. [\[CrossRef\]](#)
- Galiè, N.; McLaughlin, V.V.; Rubin, L.J.; Simonneau, G. An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*, 1802148. [\[CrossRef\]](#)
- Rajagopal, S.; Yu, Y.-R.A. The Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiol. Clin.* **2022**, *40*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
- Lechartier, B.; Berrebeh, N.; Huertas, A.; Humbert, M.; Guignabert, C.; Tu, L. Phenotypic Diversity of Vascular Smooth Muscle Cells in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **2022**, *161*, 219–231. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, R.; Yuan, T.; Wang, J.; Chen, Y.; Zhao, J.; Li, M.; Fang, L.; Du, G. Immunity and inflammation in pulmonary arterial hypertension: From pathophysiology mechanisms to treatment perspective. *Pharmacol. Res.* **2022**, *180*, 106238. [\[CrossRef\]](#)
- Shafiq, M.; Lone, Z.R.; Bharati, P.; Singh, H.; Jagavelu, K.; Verma, N.K.; Ghosh, J.K.; Gaestel, M.; Hanif, K. Involvement of mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase 2 (MK2) in endothelial dysfunction associated with pulmonary hypertension. *Life Sci.* **2021**, *286*, 120075. [\[CrossRef\]](#)
- Huertas, A.; Tu, L.; Humbert, M.; Guignabert, C. Chronic inflammation within the vascular wall in pulmonary arterial hypertension: More than a spectator. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 885–893. [\[CrossRef\]](#)
- Huertas, A.; Guignabert, C.; Barberà, J.A.; Bartsch, P.; Bhattacharya, J.; Bhattacharya, S.; Bonsignore, M.R.; Dewachter, L.; Dinh-Xuan, A.T.; Dorfmüller, P.; et al. Pulmonary vascular endothelium: The orchestra conductor in respiratory diseases. *Eur. Respir. J.* **2018**, *51*, 1700745. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Weiss, A.; Boehm, M.; Egemnazarov, B.; Grimminger, F.; Savai Pullamsetti, S.; Kwapiszewska, G.; Schermuly, R.T. Kinases as potential targets for treatment of pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *178*, 31–53. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Humbert, M.; McLaughlin, V.; Gibbs, J.S.R.; Gombert-Maitland, M.; Hooper, M.M.; Preston, I.R.; Souza, R.; Waxman, A.; Escribano Subias, P.; Feldman, J.; et al. Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 1204–1215. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Burton, J.C.; Antoniades, W.; Okalova, J.; Roos, M.M.; Grimsey, N.J. Atypical p38 Signaling, Activation, and Implications for Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4183. [\[CrossRef\]](#)
- Canovas, B.; Nebreda, A.R. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 346–366. [\[CrossRef\]](#)
- Whitaker, R.H.; Cook, J.G. Stress Relief Techniques: p38 MAPK Determines the Balance of Cell Cycle and Apoptosis Pathways. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1444. [\[CrossRef\]](#)
- Kim, E.K.; Choi, E.-J. Compromised MAPK signaling in human diseases: An update. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 867–882. [\[CrossRef\]](#)
- Cuadrado, A.; Nebreda, A.R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* **2010**, *429*, 403–417. [\[CrossRef\]](#)

19. Kojonazarov, B.; Novoyatleva, T.; Boehm, M.; Happe, C.; Sibinska, Z.; Tian, X.; Sajjad, A.; Luitel, H.; Kriechling, P.; Posern, G.; et al. p38 MAPK Inhibition Improves Heart Function in Pressure-Loaded Right Ventricular Hypertrophy. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2017**, *57*, 603–614. [\[CrossRef\]](#)
20. Church, A.C.; Martin, D.H.; Wadsworth, R.; Bryson, G.; Fisher, A.J.; Welsh, D.J.; Peacock, A.J. The reversal of pulmonary vascular remodeling through inhibition of p38 MAPK- α : A potential novel anti-inflammatory strategy in pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2015**, *309*, L333–L347. [\[CrossRef\]](#)
21. Lu, J.; Shimp, H.; Shimamoto, A.; Chong, A.J.; Hampton, C.R.; Spring, D.J.; Yada, M.; Takao, M.; Onoda, K.; Yada, I.; et al. Specific inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase with FR167653 attenuates vascular proliferation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2004**, *128*, 850–859. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Jin, C.; Guo, J.; Qiu, X.; Ma, K.; Xiang, M.; Zhu, X.; Guo, J. IGF-1 induces iNOS expression via the p38 MAPK signal pathway in the anti-apoptotic process in pulmonary artery smooth muscle cells during PAH. *J. Recept. Signal Transduct.* **2014**, *34*, 325–331. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Patel, M.; Predescu, D.; Bardita, C.; Chen, J.; Jeganathan, N.; Pritchard, M.; DiBartolo, S.; Machado, R.; Predescu, S. Modulation of Intersectin-1s Lung Expression Induces Obliterative Remodeling and Severe Plexiform Arteriopathy in the Murine Pulmonary Vascular Bed. *Am. J. Pathol.* **2017**, *187*, 528–542. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Gong, Y.; Yang, Y.; Wu, Q.; Gao, G.; Liu, Y.; Xiong, Y.; Huang, C.; Wu, S. Activation of LXR α improves cardiac remodeling induced by pulmonary artery hypertension in rats. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6169. [\[CrossRef\]](#)
25. Freitas, R.H.C.N.; Cordeiro, N.M.; Carvalho, P.R.; Alves, M.A.; Guedes, I.A.; Valerio, T.S.; Dardenne, L.E.; Lima, L.M.; Barreiro, E.J.; Fernandes, P.D.; et al. Discovery of naphthyl- N -acylhydrazones p38 α MAPK inhibitors with in vivo anti-inflammatory and anti-TNF- α activity. *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, *91*, 391–397. [\[CrossRef\]](#)
26. Mortimer, H.J.; Peacock, A.J.; Kirk, A.; Welsh, D.J. p38 MAP kinase: Essential role in hypoxia-mediated human pulmonary artery fibroblast proliferation. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2007**, *20*, 718–725. [\[CrossRef\]](#)
27. Costa, G.C.; Montagnoli, T.L.; Da Silva, J.S.; de Alencar, A.K.N.; Reina Gamba, L.E.; Alves, B.E.O.; da Silva, M.M.C.; Trachez, M.M.; do Nascimento, J.H.M.; Pimentel-Coelho, P.M.; et al. New Benzofuran N-Acylhydrazones Reduces Cardiovascular Dysfunction in Obese Rats by Blocking TNF-Alpha Synthesis. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 3337–3350. [\[CrossRef\]](#)
28. Alencar, A.K.N.; Pereira, S.L.; Montagnoli, T.L.; Maia, R.C.; Kümmerle, A.E.; Landgraf, S.S.; Caruso-Neves, C.; Ferraz, E.B.; Tesch, R.; Nascimento, J.H.M.; et al. Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A 2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 953–962. [\[CrossRef\]](#)
29. Toba, M.; Alzoubi, A.; O'Neill, K.D.; Gairhe, S.; Matsumoto, Y.; Oshima, K.; Abe, K.; Oka, M.; McMurtry, I.F. Temporal hemodynamic and histological progression in Sugen5416/hypoxia/normoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2014**, *306*, H243–H250. [\[CrossRef\]](#)
30. Abe, K.; Toba, M.; Alzoubi, A.; Ito, M.; Fagan, K.A.; Cool, C.D.; Voelkel, N.F.; McMurtry, I.F.; Oka, M. Formation of Plexiform Lesions in Experimental Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2010**, *121*, 2747–2754. [\[CrossRef\]](#)
31. Silva, M.D.M.C.D.; Alencar, A.K.N.D.; Silva, J.S.D.; Montagnoli, T.L.; Silva, G.F.D.; Rocha, B.D.S.; Montes, G.C.; Mendez-Otero, R.; Pimentel-Coelho, P.M.; Vasques, J.F.; et al. Therapeutic Benefit of the Association of Lodenafil with Mesenchymal Stem Cells on Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Cells* **2020**, *9*, 2120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Alencar, A.K.; Montes, G.C.; Montagnoli, T.; Silva, A.M.; Martinez, S.T.; Fraga, A.G.; Wang, H.; Groban, L.; Sudo, R.T.; Zapata-Sudo, G. Activation of GPER ameliorates experimental pulmonary hypertension in male rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *97*, 208–217. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Jones, J.E.; Mendes, L.; Rudd, M.A.; Russo, G.; Loscalzo, J.; Zhang, Y.-Y. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2002**, *283*, H364–H371. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Augustine, D.X.; Coates-Bradshaw, L.D.; Willis, J.; Harkness, A.; Ring, L.; Grapsa, J.; Coghlan, G.; Kaye, N.; Oxborough, D.; Robinson, S.; et al. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: A guideline protocol from the British Society of Echocardiography. *Echo Res. Pract.* **2018**, *5*, G11–G24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Goncharov, D.A.; Kudryashova, T.V.; Ziai, H.; Ihida-Stansbury, K.; DeLisser, H.; Krymskaya, V.P.; Tudor, R.M.; Kawut, S.M.; Goncharova, E.A. Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 (mTORC2) Coordinates Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Metabolism, Proliferation, and Survival in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2014**, *129*, 864–874. [\[CrossRef\]](#)
36. Rajkumar, R.; Konishi, K.; Richards, T.J.; Ishizawa, D.C.; Wiechert, A.C.; Kaminski, N.; Ahmad, F. Genomewide RNA expression profiling in lung identifies distinct signatures in idiopathic pulmonary arterial hypertension and secondary pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2010**, *298*, H1235–H1248. [\[CrossRef\]](#)
37. Moreno-Vinasco, L.; Gomberg-Maitland, M.; Maitland, M.L.; Desai, A.A.; Singleton, P.A.; Sammani, S.; Sam, L.; Liu, Y.; Husain, A.N.; Lang, R.M.; et al. Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. *Physiol. Genomics* **2008**, *33*, 278–291. [\[CrossRef\]](#)
38. Zhang, S.; Fantozzi, I.; Tigno, D.D.; Yi, E.S.; Platoshyn, O.; Thistlethwaite, P.A.; Kriett, J.M.; Yung, G.; Rubin, L.J.; Yuan, J.X.-J. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2003**, *285*, L740–L754. [\[CrossRef\]](#)
39. Bull, T.M.; Coldren, C.D.; Moore, M.; Sotto-Santiago, S.M.; Pham, D.V.; Nana-Sinkam, S.P.; Voelkel, N.F.; Geraci, M.W. Gene Microarray Analysis of Peripheral Blood Cells in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2004**, *170*, 911–919. [\[CrossRef\]](#)

40. Hurst, L.A.; Dunmore, B.J.; Long, L.; Crosby, A.; Al-Lamki, R.; Deighton, J.; Southwood, M.; Yang, X.; Nikolic, M.Z.; Herrera, B.; et al. TNF α drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14079. [\[CrossRef\]](#)
41. Yang, X.; Lee, P.J.; Long, L.; Trembath, R.C.; Morrell, N.W. BMP4 Induces HO-1 via a Smad-Independent, p38 MAPK-Dependent Pathway in Pulmonary Artery Myocytes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2007**, *37*, 598–605. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Lin, J.-W.; Yang, L.-H.; Ren, Z.-C.; Mu, D.-G.; Li, Y.-Q.; Yan, J.-P.; Wang, L.-X.; Chen, C. Resveratrol downregulates TNF- α -induced monocyte chemoattractant protein-1 in primary rat pulmonary artery endothelial cells by P38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Drug Des. Devel. Ther.* **2019**, *13*, 1843–1853. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Itoh, T.; Nagaya, N.; Ishibashi-Ueda, H.; Kyotani, S.; Oya, H.; Sakamaki, F.; Kimura, H.; Nakanishi, N. Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology* **2006**, *11*, 158–163. [\[CrossRef\]](#)
44. Ferrero, E.; Zocchi, M.R.; Magni, E.; Panzeri, M.C.; Curnis, F.; Rugarli, C.; Ferrero, M.E.; Corti, A. Roles of tumor necrosis factor p55 and p75 receptors in TNF- α -induced vascular permeability. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2001**, *281*, C1173–C1179. [\[CrossRef\]](#)
45. Yan, S.; Wang, Y.; Liu, P.; Chen, A.; Chen, M.; Yao, D.; Xu, X.; Wang, L.; Huang, X. 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. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2016**, *2016*, 2546402–9. [\[CrossRef\]](#)
46. See, F.; Thomas, W.; Way, K.; Tzanidis, A.; Kompa, A.; Lewis, D.; Itescu, S.; Krum, H. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, *44*, 1679–1689. [\[CrossRef\]](#)
47. Ramos-Kuri, M.; Meka, S.H.; Salamanca-Buentello, F.; Hajjar, R.J.; Lipskaia, L.; Chemaly, E.R. Molecules linked to Ras signaling as therapeutic targets in cardiac pathologies. *Biol. Res.* **2021**, *54*, 23. [\[CrossRef\]](#)
48. Mosele, F.; Tavares, A.M.V.; Colombo, R.; Caron-Lienert, R.; Araujo, A.S.R.; Ribeiro, M.F.; Belló-Klein, A. Effects of Purple Grape Juice in the Redox-sensitive Modulation of Right Ventricular Remodeling in a Pulmonary Arterial Hypertension Model. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2012**, *60*, 15–22. [\[CrossRef\]](#)
49. Zhang, S.; Zhang, M.; Goldstein, S.; Li, Y.; Ge, J.; He, B.; Ruiz, G. The Effect of c-fos on Acute Myocardial Infarction and the Significance of Metoprolol Intervention in a Rat Model. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**, *65*, 249–255. [\[CrossRef\]](#)
50. Min, W.; Bin, Z.W.; Quan, Z.B.; Hui, Z.J.; Sheng, F.G. The signal transduction pathway of PKC/NF- κ B/c-fos may be involved in the influence of high glucose on the cardiomyocytes of neonatal rats. *Cardiovasc. Diabetol.* **2009**, *8*, 8. [\[CrossRef\]](#)
51. Imoto, K.; Okada, M.; Yamawaki, H. Periostin Mediates Right Ventricular Failure through Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Right Ventricular Fibroblasts from Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertensive Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *20*, 62. [\[CrossRef\]](#)
52. Tang, H.; Fernandez, R.A.; Yuan, J.X.-J. miRNA208/Mef2 and TNF- α in Right Ventricular Dysfunction. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 6–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Jobe, L.J.; Meléndez, G.C.; Levick, S.P.; Du, Y.; Brower, G.L.; Janicki, J.S. TNF- α inhibition attenuates adverse myocardial remodeling in a rat model of volume overload. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2009**, *297*, H1462–H1468. [\[CrossRef\]](#)
54. Smith, R.M.; McCarthy, J.; Sack, M.N. TNF alpha is required for hypoxia-mediated right ventricular hypertrophy. *Mol. Cell. Biochem.* **2001**, *219*, 139–143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Kubota, T.; McTiernan, C.F.; Frye, C.S.; Slawson, S.E.; Lemster, B.H.; Koretsky, A.P.; Demetris, A.J.; Feldman, A.M. Dilated Cardiomyopathy in Transgenic Mice With Cardiac-Specific Overexpression of Tumor Necrosis Factor- α . *Circ. Res.* **1997**, *81*, 627–635. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Westermann, D.; Linthout, S.; Dhayat, S.; Dhayat, N.; Schmidt, A.; Noutsias, M.; Song, X.-Y.; Spillmann, F.; Riad, A.; Schultheiss, H.-P.; et al. Tumor necrosis factor- α antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.* **2007**, *102*, 500–507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Mann, D.L. Stress-Activated Cytokines and The Heart: From Adaptation to Maladaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **2003**, *65*, 81–101. [\[CrossRef\]](#)
58. Stenmark, K.R.; Meyrick, B.; Galie, N.; Mooi, W.J.; McMurtry, I.F. Animal models of pulmonary arterial hypertension: The hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2009**, *297*, L1013–L1032. [\[CrossRef\]](#)
59. Bordenave, J.; Thuillet, R.; Tu, L.; Phan, C.; Cumont, A.; Marsol, C.; Huertas, A.; Savale, L.; Hibert, M.; Galzi, J.-L.; et al. Neutralization of CXCL12 attenuates established pulmonary hypertension in rats. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 686–697. [\[CrossRef\]](#)
60. Alencar, A.K.N.; Pereira, S.L.; da Silva, F.E.; Mendes, L.V.P.; Cunha, V.D.M.N.; Lima, L.M.; Montagnoli, T.L.; Caruso-Neves, C.; Ferraz, E.B.; Tesch, R.; et al. N-acylhydrazones derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. *Int. J. Cardiol.* **2014**, *173*, 154–162. [\[CrossRef\]](#)
61. Urboniene, D.; Haber, I.; Fang, Y.-H.; Thenappan, T.; Archer, S.L. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2010**, *299*, L401–L412. [\[CrossRef\]](#)
62. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)