

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JESSYKA CAROLINA GALVÃO DA SILVA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DE AAL 195, UM INIBIDOR DE
FOSFODIESTERASE 4, EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

MACEIÓ - AL
2022

JESSYKA CAROLINA GALVÃO DA SILVA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DE AAL 195, UM INIBIDOR DE
FOSFODIESTERASE 4, EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de
Alagoas, como requisito para a
obtenção do grau de Doutora em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Êurica
Adélia Nogueira Ribeiro

MACEIÓ - AL
2022

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

S586e Silva, Jessyka Carolina Galvão da.
Efeitos cardiovasculares de AAL 195, um inibidor fosfodiesterase 4, em
ratos espontaneamente hipertensos / Jessyka Carolina Galvão Silva. – 2022.
135 f. : il. color .

Orientadora: Êurica Adélia Nogueira Ribeiro.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 115-134.
Anexo: f. 135.

1. Hipertensão. 2. Inibidores de fosfodiesterase. 3. AAL 195. 4.
Vasorrelaxamento. I. Título.

CDU: 615.224

Dedico este trabalho à minha mãe, Edselma, por nunca medir esforços para a realização dos meus sonhos.

Dedico também ao meu irmão César, à minha irmã Thamires, ao meu pai James e ao meu bem Daniel, por todo companheirismo, amor e incentivo durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, senhor da minha vida, que me deu sabedoria, força e coragem para chegar até aqui.

À minha orientadora, profa. **Êurica Adélia Nogueira Ribeiro**, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório quando eu ainda estava na graduação e que nesses mais de 11 anos de convivência acreditou em mim, me incentivou, me apoiou, me ensinou, puxou a minha orelha quando necessário e que me inspirou a ser a pesquisadora que sou hoje. Tenho muito orgulho em dizer que fui orientada pela melhor professora, minha mãe na ciência!

Aos meu amigo e companheiro de laboratório **Alessandro César**, por todos os momentos em que esteve me apoiando, incentivando, ouvindo os meus desabafos e me fazendo rir (e não foram poucos esses momentos). Alê, você tornou essa jornada mais leve!

A todos os meus amigos e colegas do **Laboratório de Farmacologia Cardiovascular**. Todos tiveram a sua importância dentro da minha formação, mas em especial **Emanuel** e **Amanda** em que tive um convívio maior e pude contribuir diretamente com seus trabalhos, além de aprender bastante com essas mentes brilhantes. E, claro, não poderia deixar de agradecer às minhas eternas mestras **Edla** e **Cintia**, que foram as primeiras a me acolher dentro do LFC e que me ensinaram tanto! Meninas, também devo a vocês a pesquisadora que sou hoje.

Ao professor **João Xavier** por ceder o AAL 195 para esse estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por compartilhar os seus conhecimentos.

Aos professores **Olagide Castro**, **Hugo Juarez**, **Aline Fidelis** e **Luciano Grillo** por aceitarem avaliar e contribuir com a minha tese de doutorado.

A todos os colegas e amigos que fiz na pós-graduação por dividir momentos e conhecimentos.

À **FAPEAL**, à **CAPES** e à **UFAL**, pelos suportes financeiro e estrutural, fundamentais para o desenvolvimento dessa tese.

Muito obrigada!

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.”

Marie Curie

RESUMO

Introdução: A hipertensão é uma doença com prevalência alta e representa um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Apesar dos anti-hipertensivos disponíveis, muitos pacientes hipertensos não atingem os níveis pressóricos ideais, demonstrando a necessidade da busca por agentes farmacológicos mais eficazes. As fosfodiesterases (PDE), enzimas que hidrolisam a ligação cíclica do AMPc e GMPc, estão amplamente distribuídas no sistema cardiovascular. Inibidores dessas enzimas tem se mostrado úteis na terapia de doenças de origem multifatorial, como a hipertensão. **Objetivo:** Avaliar as ações do inibidor de PDE4, AAL 195, sobre o sistema cardiovascular de ratos hipertensos. **Métodos:** ratos machos SHR foram utilizados para todos os experimentos. Os efeitos cardiovasculares induzidos por AAL 195 foram avaliados através da medida direta da pressão arterial e preparações de artéria mesentérica superior. **Resultados:** Em ratos SHR não anestesiados, a administração i.v. *in bolus* de AAL 195 induziu hipotensão associada a taquicardia, de maneira independente de dose. Após o tratamento com nifedipina, os efeitos hipotensor e taquicárdico foram atenuados, sugerindo a participação dos canais para Ca^{2+} do tipo-L ($\text{Ca}_v\text{-L}$) nesses efeitos. Já o tratamento com propranolol não foi capaz de alterar o efeito hipotensor, no entanto, o efeito taquicárdico foi atenuado. Sabe-se que a inibição da PDE4D3 nos cardiomiócitos é capaz de ativar os $\text{Ca}_v\text{-L}$, bem como modular respostas β_2 -adrenérgicas. Portanto, sugere-se que o efeito taquicárdico seja mediado por uma inibição direta da PDE4 cardíaca. Os efeitos subagudos de AAL 195 foram avaliados após a sua administração por via orogástrica. Desta forma, observou-se que o composto promoveu atividade anti-hipertensiva com a dose 10 mg/kg. Em anéis de artéria mesentérica superior de ratos SHR, AAL 195 promoveu vasorrelaxamento em anéis pré-contraídos com FEN de maneira dependente de concentração. Após a remoção do endotélio, houve um deslocamento da curva concentração-resposta para a direita, sem alteração do efeito máximo. Em preparações sem endotélio, incubadas com TEA (5 mM ou 1 mM), o vasorrelaxamento foi atenuado, revelando o envolvimento dos canais para K^+ , mais precisamente dos BK_{Ca} . Em anéis pré-contraídos com KCl 80 mM, AAL 195 promoveu efeito vasorrelaxante, sugerindo a inibição do influxo de Ca^{2+} através dos VOCCs. Tal hipótese foi confirmada pela atenuação das contrações induzidas por CaCl_2 em solução despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} e pelo vasorrelaxamento promovido por AAL 195 em anéis pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644, um ativador de $\text{Ca}_v\text{-L}$. AAL 195 atenuou as contrações transientes induzidas por FEN em meio livre de Ca^{2+} , indicando a inibição da liberação de Ca^{2+} através dos IP_3R . Em preparações pré-incubadas com KT 5720, o vasorrelaxamento de AAL 195 também foi atenuado, revelando uma possível ativação da PKA por AAL 195. **Conclusão:** AAL 195 foi capaz de promover efeito hipotensor, vasorrelaxante e anti-hipertensivo em ratos SHR. Porém também promoveu efeito taquicárdico, provavelmente devido à inibição da PDE4 nos cardiomiócitos. Os estudos com AAL 195 revelam efeitos cardiovasculares significativos, caracterizando uma molécula com grande potencial à fármaco anti-hipertensivo, bem como uma potente ferramenta farmacológica.

Palavras-chave: AAL 195. Hipertensão. Inibidores da Fosfodiesterase 4. Ratos Espontaneamente Hipertensos. Vasorrelaxamento.

ABSTRACT

Introduction: Hypertension is a disease with high prevalence and represents one of the main risk factors for cardiovascular diseases. Despite the antihypertensive drugs available, many hypertensive patients do not reach ideal blood pressure levels, demonstrating the need to search for more effective pharmacological agents. Phosphodiesterases (PDE), enzymes that hydrolyze the cyclic binding of cAMP and cGMP, are widely distributed in the cardiovascular system. Inhibitors of these enzymes have been shown to be useful in the therapy of diseases of multifactorial origin, such as hypertension. **Objective:** To evaluate the actions of the PDE4 inhibitor, AAL 195, on the cardiovascular system of hypertensive rats. **Methods:** Male SHR rats were used for all experiments. The cardiovascular effects induced by AAL 195 were evaluated through direct measurement of blood pressure and superior mesenteric artery preparations. **Results:** In non-anesthetized SHR rats, i.v. in bolus AAL 195 induced hypotension associated with tachycardia, in a dose-independent manner. After treatment with nifedipine, the hypotensive and tachycardic effects were attenuated, suggesting the participation of L-type Ca^{2+} channels (Cav-L) in these effects. The treatment with propranolol was not able to change the hypotensive effect, however, the tachycardic effect was attenuated. It is known that PDE4D3 inhibition in cardiomyocytes is capable of activating Cav-L, as well as modulating β_2 -adrenergic responses. Therefore, it is suggested that the tachycardic effect is mediated by a direct inhibition of cardiac PDE4. The subacute effects of AAL 195 were evaluated after its administration via the orogastric route. Thus, it was observed that the compound promoted antihypertensive activity at the dose of 10 mg/kg. In superior mesenteric artery rings from SHR rats, AAL 195 promoted vasorelaxation in rings pre-contracted with PHE in a concentration-dependent manner. After removal of the endothelium, there was a shift in the concentration-response curve to the right, with no change in the maximum effect. In preparations without endothelium, incubated with TEA (5 mM or 1 mM), vasorelaxation was attenuated, revealing the involvement of K^+ channels, more precisely BK_{Ca} . In rings pre-contracted with 80 mM KCl, AAL 195 promoted a vasorelaxant effect, suggesting inhibition of Ca^{2+} influx through VOCCs. This hypothesis was confirmed by the attenuation of contractions induced by CaCl_2 in depolarizing solution nominally without Ca^{2+} and by vasorelaxation promoted by AAL 195 in rings pre-contracted with S(-)-Bay K 8644, an activator of Cav-L. AAL 195 attenuated transient contractions induced by PHE in Ca^{2+} -free medium, indicating inhibition of Ca^{2+} release through IP_3R . In preparations pre-incubated with KT 5720, the vasorelaxation of AAL 195 was also attenuated, revealing a possible activation of PKA by AAL 195. **Conclusion:** AAL 195 was able to promote hypotensive, vasorelaxant and antihypertensive effects in SHR rats. However, it also promoted a tachycardic effect, probably due to PDE4 inhibition in cardiomyocytes. Studies with AAL 195 reveal significant cardiovascular effects, characterizing a molecule with great potential as an antihypertensive drug, as well as a potent pharmacological tool.

Keywords: AAL 195. Hypertension. Phosphodiesterase 4 Inhibitors. Spontaneously Hypertensive Rats. Vasodilation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos fatores que influenciam na pressão arterial.....	28
Figura 2	Representação esquemática dos canais para K ⁺ e o tônus vascular.	38
Figura 3	Representação esquemática dos mecanismos induzidos pelas proteínas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos em células do músculo liso vascular.	41
Figura 4	Estrutura química do AAL 195.	50
Figura 5	Representação esquemática dos vasos onde foram implantados os cateteres para registro dos parâmetros cardiovasculares e administração das substâncias.....	54
Figura 6	Sistema de aquisição de dados para medida de PA e FC em ratos não anestesiados.	55
Figura 7	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	56
Figura 8	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos cardiovasculares da DE ₅₀ de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.	56
Figura 9	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência dos receptores muscarínicos nos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	57
Figura 10	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência do óxido nítrico nos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	58
Figura 11	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência das prostaciclinas nos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	58

Figura 12	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência dos canais de Ca^{2+} tipo-L sensíveis a diidropiridinas nos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.	59
Figura 13	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência dos receptores β -adrenérgicos nos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.	60
Figura 14	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos subagudos induzidos pela administração oral de AAL 195.	60
Figura 15	Representação esquemática da retirada da artéria mesentérica superior, da retirada do tecido conectivo e adiposo, da secção em anéis e inserção em hastes metálicas.	61
Figura 16	Representação esquemática da cuba para órgãos isolados.	62
Figura 17	Aparato utilizado para registros de tensões isométricas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	62
Figura 18	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contráidos com FEN, com endotélio (A) ou sem endotélio (B) vascular.....	64
Figura 19	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, no tônus muscular espontâneo e posteriormente à recuperação do órgão.	64
Figura 20	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contráidos com	

	FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com TEA (5 mM)	65
Figura 21	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com TEA (1 mM), GLIB (10 μ M), 4-AP (1 mM) ou Apamina (0,1 μ M)	66
Figura 22	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com solução despolarizante Tyrode (KCl 80 mM), sem endotélio vascular.	67
Figura 23	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar o efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sobre o influxo de cálcio extracelular.	68
Figura 24	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, sem endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM).	69
Figura 25	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sobre a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares. Agonistas: (A) FEN e (B) cafeína.	70
Figura 26	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contraídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com Tapsigargina (1 μ M).	71
Figura 27	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria	

	mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contraídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com KT 5720 (1 μ M).	71
Figura 28	Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AAL 195 sobre a PAM (a), PAS (b), PAD (c) e FC (d) de ratos SHR não-anestesiados (n=5).	73
Figura 29	Registro original do efeito do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a pressão arterial de ratos SHR não-anestesiados.....	74
Figura 30	Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5).	74
Figura 31	Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5) antes e após o tratamento com atropina.	75
Figura 32	Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5) antes e após o tratamento com L-NAME.	76
Figura 33	Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5) antes e após o tratamento com indometacina.	77
Figura 34	Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5) antes e após o tratamento com nifedipina.	78
Figura 35	Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5) antes e após o tratamento com propranolol.	79
Figura 36	Efeitos subagudos sobre a PAS (a) e FC (b) após administração oral de AAL 195 (1, 5 ou 10 mg/kg) em ratos SHR não-anestesiados (n=5).	80
Figura 37	Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR com endotélio intacto (●) ou sem endotélio (○), pré-contraídos com FEN (10 μ M).	82

Figura 38	Porcentagem de contração com fenilefrina e recuperação do órgão nos anéis de artéria mesentérica superior de ratos SHR sem endotélio funcional.....	82
Figura 39	Efeito do AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) sobre o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio (○).	83
Figura 40	Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio (○), pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), ou após bloqueio com TEA (5 mM).	84
Figura 41	Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio (○), pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), ou após bloqueio com GLIB ($10 \mu\text{M}$).	85
Figura 42	Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio (○), pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), ou após bloqueio com 4-AP (1 mM).	86
Figura 43	Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio (○), pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), ou após bloqueio com TEA (1 mM).	87
Figura 44	Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio (○), pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), ou após bloqueio com Apamina ($0,1 \mu\text{M}$).	88
Figura 45	Efeito do AAL 195 nas contrações induzidas por KCl 80 mM . Curva concentração-resposta para AAL 195 (3×10^{-8} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio (○), pré-contraídos com KCl 80 mM ($n=5$).	90
Figura 46	Efeito do AAL 195 sobre o influxo de Ca^{2+} . Curva concentração-resposta para CaCl_2 (10^{-6} – 10^{-2} M) em	91

	anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio (○), pré-incubadas com [AAL 195] M (n=5).	
Figura 47	Efeito do AAL 195 nas contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644. Curva concentração-resposta para AAL 195 (3×10^{-8} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio, pré-contraídos com FEN (○) ou com S(-)-Bay K 8644 (□) (n=5).	92
Figura 48	Efeito de AAL 195 na contração induzida por FEN, em anéis de artéria mesentérica exposta a solução livre de Ca^{2+} , sem endotélio funcional (n= 5).	93
Figura 49	Efeito de AAL 195 na contração induzida por cafeína, em anéis de artéria mesentérica exposta a solução livre de Ca^{2+} , sem endotélio funcional (n= 5).	94
Figura 50	Influência da tapsigargina no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195. Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio (○), pré-contraídos com FEN (10 μM), ou após bloqueio com Tapsigargina (1 μM).	95
Figura 51	Influência do KT 5720 no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195. Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio (○), pré-contraídos com FEN (10 μM), ou após bloqueio com KT 5720 (1 μM)...	96
Figura 52	Representação esquemática da provável via de sinalização do efeito vasorrelaxante induzido AAL 195 em artéria mesentérica superior de ratos SHR que resulta na redução da pressão arterial.	111
Figura 53	Representação esquemática da provável via de sinalização do efeito cardíaco induzido AAL 195 ratos SHR.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Anti-hipertensivos disponíveis no Brasil.	31
Tabela 2:	Classificação, distribuição nos tecidos e inibidores de referência das PDEs.	42
Tabela 3:	Inibidores de PDE4 e doenças em estudo através de ensaios clínicos.	47
Tabela 4:	Composição das soluções nutritivas (pH 7,4).	53
Tabela 5:	Comparação dos valores de $E_{máx}$ e pD_2 de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, sem endotélio funcional, após bloqueios para avaliar a participação dos canais K^+	89
Tabela 6:	Comparação dos valores de $E_{máx}$ e pD_2 de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, sem endotélio funcional.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-Aminopiridina
AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
AMPC	3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	análise de variância "One-way"
AT ₁	Receptores para Angiotensina II
ATP	Trifosfato de adenosina
BB	Betabloqueadores
BCC	Bloqueadores de canais de cálcio
BK _{Ca}	Canal para K ⁺ de grande condutância ativado pelo Ca ²⁺
BRA	Bloqueadores de receptores de angiotensina II
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaM	Calmodulina
CE ₅₀	Concentração da droga que produz 50% do efeito máximo
CI ₅₀	Concentração que produz 50% de inibição
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doenças cardiovasculares
DE ₅₀	Dose que produz 50% do efeito máximo
DIU	Diuréticos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
e.p.m	Erro padrão da média
ECA	Enzima conversora de angiotensina
E _{máx}	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
FHDE	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
FRDE	Fator relaxante derivado do endotélio
FRDE	Fatores relaxantes derivados do endotélio

GC	Guanilato ciclase
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GLIB	Glibenclamida
GMPc	3',5'-monofosfato de guanosina cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
HA	Hipertensão arterial
HAR	Hipertensão arterial resistente
IECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IK _{Ca}	Canal para K ⁺ de condutância intermediária ativado pelo Ca ²⁺
IP ₃	Inositol trisfosfato
IP ₃ R	Receptor de IP ₃
K ⁺	Íon potássio
K _{ATP}	Canal para K ⁺ sensível ao ATP
K _{Ca}	Canais para K ⁺ ativado pelo Ca ²⁺
K _{IR}	Canal para K ⁺ retificador de entrada
K _v	Canal para K ⁺ sensível à voltagem
L-NAME	L-N ^G -nitro arginina-metil-éster
MLC ₂₀	Unidade regulatória 20-kDa da cadeia leve da miosina
MLCK	Quinase da cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
MLV	Músculo liso vascular
NCX	Trocador Na ⁺ /Ca ²⁺
NO	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
pD ₂	Logaritmo negativo da CE ₅₀
PDE	Fosfodiesterase
PGI ₂	Prostaciclina
PIP ₂	Fosfatidil inositol bisfosfato
PKA	Proteína quinase ativada por AMPc
PKC	Proteína quinase C

PKG	Proteína quinase ativada por GMPc
PLC	Fosfolipase C
PMCA	Ca ²⁺ ATPase de membrana plasmática
ROC	Canal para cálcio operado por receptor
RS	Retículo sarcoplasmático
RVPT	Resistência vascular periférica total
RyR	Receptor de rianodina
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
SERCA	Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SK _{Ca}	Canal para K ⁺ de pequena condutância ativado pelo Ca ²⁺
SOC	Canal para cálcio operado por estoque
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
STIM	Molécula de interação estromal
TEA	Tetraetilamônio
TRP	Potencial receptor transiente
UCR	Upstream conserved region (região conservada da PDE4)
VOC	Canal para cálcio operado por voltagem
vs	Versus
WKY	Ratos Wistar Kyoto

OBS.: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1	Considerações Gerais sobre a Regulação da Pressão Arterial.....	26
2.2	Considerações Gerais sobre a Hipertensão Arterial.....	29
2.3	Considerações Gerais sobre o Modelo Experimental de Hipertensão Espontânea.....	32
2.4	Considerações Gerais sobre Contração e Relaxamento do Músculo Liso Vascular.....	33
2.5	Considerações Gerais sobre Nucleotídeos Cíclicos.....	39
2.6	Considerações Gerais sobre as Fosfodiesterases de Nucleotídeos Cíclicos.....	41
2.7	Fosfodiesterase como Alvo de Fármacos.....	44
2.8	Fosfodiesterase 4.....	46
2.9	Fosfodiesterase 4 e o Sistema Cardiovascular.....	48
2.10	AAL 195.....	49
3	OBJETIVOS.....	51
3.1	Objetivo Geral.....	51
3.2	Objetivos Específicos.....	51
4	MATERIAL.....	52
4.1	Animais.....	52
4.2	Substâncias Utilizadas.....	52
4.3	Preparação das Soluções de AAL 195.....	52
4.4	Soluções Fisiológicas.....	53
5	MÉTODOS.....	54
5.1	Ensaio Farmacológico <i>in vivo</i>.....	54
5.1.1	Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos SHR não anestesiados.....	54
5.1.2	Estudos de medida direta de PA e FC.....	55

5.1.2.1	Efeito de AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados..	55
5.1.2.2	Efeito da DE ₅₀ de AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	56
5.1.2.3	Verificação da participação muscarínica no efeito induzido por AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	57
5.1.2.4	Verificação da participação do óxido nítrico (NO) no efeito induzido por AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	57
5.1.2.5	Verificação da participação das prostaciclina (PGI ₂) no efeito induzido por AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	58
5.1.2.6	Verificação da participação dos canais de cálcio sensíveis a dihidropiridinas no efeito induzido por AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	59
5.1.2.7	Verificação da participação dos receptores β -adrenérgicos no efeito induzido por AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados	59
5.1.2.8	Efeito subagudo da administração oral de AAL 195 sobre a PAS e a FC de ratos SHR	60
5.2	Ensaios Farmacológicos <i>in vitro</i>.....	61
5.2.1	Preparações de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Rato SHR Com ou Sem Endotélio Funcional.....	61
5.2.2	Protocolos Experimentais Utilizando Anéis de Artéria Mesentérica Superior de Rato SHR.....	63
5.2.2.1	Avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contraídos com FEN.....	63
5.2.2.2	Avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sobre o tônus vascular intrínseco.....	63
5.2.2.3	Avaliação da participação de canais para K ⁺ no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.....	65

5.2.2.4	Identificação dos canais para K ⁺ envolvidos no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.....	65
5.2.2.5	Avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contraídos com solução Tyrode com KCl a 80 Mm.....	66
5.2.2.6	Avaliação do efeito de AAL 195 sobre o influxo de cálcio extracelular.....	67
5.2.2.7	Avaliação do efeito de AAL 195 sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644, um ativador dos canais para cálcio sensíveis a voltagem do tipo-L	68
5.2.2.8	Avaliação do efeito de AAL 195 sobre a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares	69
5.2.2.9	Avaliação da participação da SERCA no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR	70
5.2.2.10	Avaliação da participação da PKA no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR	71
5.3	Análise Estatística.....	72
6	RESULTADOS.....	73
6.1	Estudos Farmacológicos com AAL 195 <i>in vivo</i>.....	73
6.1.1	Efeito do AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	73
6.1.2	Efeito da DE ₅₀ do AAL 195 sobre a PAM e FC de ratos SHR não anestesiados.....	74
6.1.3	Participação dos receptores muscarínicos na resposta induzida por AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados...	75
6.1.4	Participação do NO na resposta induzida por AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	76
6.1.5	Participação das prostaciclinas na resposta induzida por AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	77

6.1.6	Participação dos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo-L na resposta induzida por AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.....	78
6.1.7	Participação dos receptores β -adrenérgicos na resposta induzida por AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados	79
6.1.8	Efeitos subagudos após administração oral de AAL 195 sobre a PAS e FC de ratos SHR não anestesiados	80
6.2	Estudos Farmacológicos com AAL 195 <i>in vitro</i>.....	81
6.2.1	Efeito do AAL 195 sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.....	81
6.2.2	Efeito do AAL 195 sobre o tônus intrínseco de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.....	83
6.2.3	Participação dos canais para K^{+} no efeito induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.	84
6.2.4	Participação dos canais para K^{+} sensíveis ao ATP no efeito induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.....	85
6.2.5	Participação dos canais para K^{+} sensíveis à voltagem no efeito induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.....	86
6.2.6	Participação dos canais para K^{+} de grande condutância no efeito induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.....	87
6.2.7	Participação dos canais para K^{+} de pequena condutância no efeito induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.....	88
6.2.8	Efeito do AAL 195 sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.....	90
6.2.9	Efeito do AAL 195 sobre o influxo de Ca^{2+} em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR	91

6.2.10	Efeito do AAL 195 sobre o influxo de Ca^{2+} por canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem do Tipo-L	92
6.2.11	Efeito do AAL 195 sobre a mobilização de Ca^{2+} pelos receptores de IP_3 dos estoques intracelulares	93
6.2.12	Efeito do AAL 195 sobre a mobilização de Ca^{2+} pelos receptores de rianodina dos estoques intracelulares	94
6.2.13	Participação da SERCA no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR	95
6.2.14	Participação da PKA no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR	96
7	DISCUSSÃO.....	97
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
9	PERSPECTIVAS	114
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXO A	135

1 INTRODUÇÃO

A cada ano, cerca de 17,9 milhões de óbitos são atribuídos às doenças cardiovasculares (DCV), o que torna essas doenças as principais causas de morte a nível mundial (VIRANI et al, 2021). Além disso, as DCVs também são as principais causas de hospitalizações e atendimentos ambulatoriais em todo o mundo, inclusive no Brasil (BARROSO et al, 2021). Em termos econômicos, as DCVs exercem significativo impacto financeiro. A avaliação dos gastos com essas doenças no Brasil foi de R\$ 56,2 bilhões apenas no ano de 2015 (STEVENS et al, 2018). Desse montante, aproximadamente R\$ 37 bilhões foi gasto pelo sistema de saúde, representando um aumento percentual de 17% dos custos entre os anos de 2010 a 2015 (SIQUEIRA; SIQUEIRA-FILHO; LAND, 2017). A prevenção ou o melhor manejo dessas doenças poderia resultar em significativos benefícios para melhorar o bem-estar da população e preservar a economia do país (STEVENS et al, 2018).

Um fator chave para o desenvolvimento das DCVs é a hipertensão arterial (BROWN et al, 2018). Atualmente estima-se que 1,4 bilhões de pessoas no mundo são hipertensas, no entanto, apenas 14% mantêm a doença sob controle (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). A associação entre níveis elevados de pressão arterial e DCV destaca a importância do tratamento da hipertensão (OPARIL et al, 2018).

Atualmente é possível encontrar um grande arsenal terapêutico para reduzir e normalizar os níveis pressóricos e estes apresentam potenciais benefícios para a redução de eventos cardiovasculares. No entanto, um número significativo de pacientes não responde satisfatoriamente às terapias anti-hipertensivas disponíveis, caracterizando a hipertensão arterial resistente (HAR) (SILVA et al, 2017). A HAR é um problema que acomete um número cada vez mais crescente de pacientes, com prevalência estimada entre 10 a 20% dos hipertensos no mundo (YUGAR-TOLEDO et al, 2020) e é caracterizada por valores de pressão arterial que permanecem acima da meta apesar do uso regular de três classes de fármacos anti-hipertensivos, incluindo um diurético (BROWN et al, 2018; SILVA et al, 2017). Esse fato, somado a complexa fisiopatologia da hipertensão, demonstra a necessidade de pesquisas para buscar terapias anti-hipertensivas mais eficazes.

Nesse contexto, os inibidores da enzima fosfodiesterase (PDE) podem surgir como novas estratégias farmacológicas para os distúrbios relacionados ao sistema cardiovascular (BROWN et al, 2014; CHEN; YAN, 2021; ERCU, M. et al, 2020). As PDEs são uma superfamília de enzimas que desempenham importantes papéis na sinalização intracelular por hidrolisar seletivamente o AMPc e/ou o GMPc (BENDER; BEAVO, 2006). Elas estão distribuídas ubiquamente nos tecidos e têm sido consideradas importantes alvos terapêuticos, principalmente em doenças cuja origem é multifatorial, como a hipertensão (LUGNIER, 2006).

No músculo liso vascular os inibidores de PDE estão diretamente relacionados à vasodilatação, devido ao aumento da concentração intracelular de AMPc ou GMPc (LUGNIER, 2006). Além do efeito vasorrelaxante, a maioria dos fármacos que atuam nas PDE vasculares é capaz de promover ação cardiotônica, anti-agregante plaquetária e inibidora da proliferação vascular (RAHIMI et al, 2010). Portanto, atualmente existe uma vasta gama de estudos envolvendo a inibição das PDEs em doenças do sistema cardiovascular (RAHIMI et al, 2010).

Desta forma, AAL 195 foi planejado e sintetizado a partir de modificações estruturais na molécula de dois inibidores de PDE4: Rolipram e Zardaverina. Ensaios de *binding* e modelagem molecular foram realizados, com posterior análise da relação estrutura-atividade, o que foi possível constatar que AAL 195 é um potente e seletivo inibidor de PDE4 (ARAÚJO-JUNIOR et al, 2015; KRIER et al, 2005).

Estudos prévios demonstraram que AAL 195 é capaz de promover vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica de ratos Wistar (normotensos) (SILVA, 2017). Com base nisso, somado aos relatos descritos na literatura que constam os benefícios da inibição de PDEs no sistema cardiovascular, o objetivo desse trabalho é avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos por AAL 195 em ratos espontaneamente hipertensos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações Gerais sobre a Regulação da Pressão Arterial

A pressão arterial (PA) pode ser definida como a força exercida pelo sangue por unidade de área da parede dos vasos sanguíneos (MAGDER, 2018; NEVES; NEVES; OLIVEIRA, 2016). A PA é determinada por vários parâmetros do sistema cardiovascular, podendo ser expressa como um produto do débito cardíaco (DC) com a resistência vascular periférica total (RVPT) (FREIS, 1960 apud SANJULIANI, 2002; KRIEGER; IRIGOYEN; KRIEGER, 1999), resultando na seguinte fórmula matemática:

$$\text{Pressão Arterial Média (PAM)} = \text{DC} \times \text{RVPT}$$

O DC representa a quantidade de sangue bombeado pelo coração por minuto e é influenciado pela contratilidade cardíaca, pelo volume sanguíneo circulante, pelo retorno venoso e pela frequência cardíaca (FC) (FREIS, 1960 apud SANJULIANI, 2002; KRIEGER; IRIGOYEN; KRIEGER, 1999). Já a RVPT é um dos determinantes da regulação da pressão sanguínea e do fluxo sanguíneo para os tecidos e órgãos do corpo. Ela é estabelecida pelo tônus vascular das artérias e arteríolas de resistência (TYKOCKI; BOERMAN; JACKSON, 2017). De um modo geral, qualquer alteração tanto no DC, quanto na RVPT, influencia diretamente na PA (Figura 1).

A regulação da PA é uma das mais complexas funções fisiológicas do organismo. Ela é resultado da atividade de sistemas de retroalimentação que operam a curto e a longo prazo (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; OPARIL et al, 2018).

O controle da PA a curto prazo está relacionado, principalmente, aos mecanismos neurais, onde se destacam: o barorreflexo, o quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar. A velocidade desses mecanismos regulatórios é obtida por um sistema de retroalimentação através do sistema nervoso autônomo e resulta em ajustes rápidos na FC (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

O barorreflexo é considerado o mais importante mecanismo de controle pressórico a curto prazo (THOMAS, 2011), baseado num mecanismo de

feedback negativo (ROWAIYE; JANKOWSKA; PONIKOWSKA, 2013). Esse mecanismo funciona através dos barorreceptores, que são mecanorreceptores alojados nos gânglios nodosos e petrosos e seus terminais inervam vasos sanguíneos arteriais no seio carotídeo e no arco da aorta (OPARIL et al, 2018; STAUSS, 2022). Esses terminais detectam mudanças mecânicas da vasculatura arterial e produzem sinais elétricos excitatórios, que são integrados e modulados nos barorreceptores arteriais por moduladores locais. Em seguida, o sinal integrado é transmitido para a região medial dorsal do núcleo do trato solitário (um componente central do arco barorreflexo) na área medular do tronco cerebral. Essa excitação induz respostas simpatoinibitórias e parassimpatoexcitatórias periféricas (BERDEAUX; GIUDICELLI, 1987; TU; ZHANG; LI, 2019).

Sendo assim, a elevação súbita da PA desencadeia uma resposta excitatória devido a distensão vascular desses barorreceptores arteriais. Isso resulta na redução do fluxo simpático periférico e na ativação do fluxo parassimpático periférico, levando a um aumento do tônus vagal sobre o coração e a uma redução do tônus simpático no coração e nos vasos sanguíneos (TU; ZHANG; LI, 2019). Estes fatores implicam na redução da FC, do retorno venoso, do volume sistólico e da RVPT, com consequente redução da PA. Por outro lado, a redução da PA cessa a estimulação dos barorreceptores, levando à diminuição do tônus vagal e aumento do tônus simpático, elevando a PA (PILOWSKY; GOODCHILD, 2002).

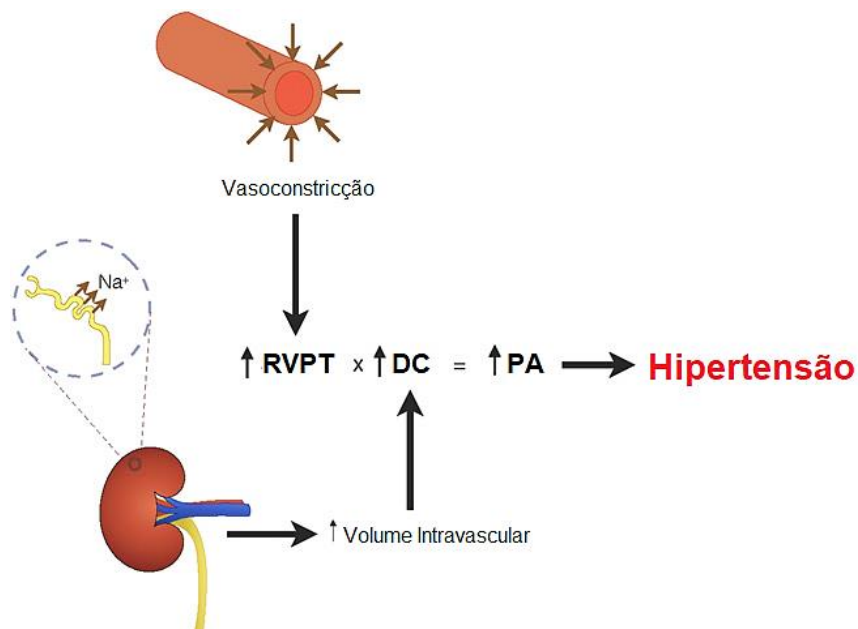
A regulação da PA também pode ocorrer através de mecanismos hormonais que podem resultar no aumento ou na diminuição de seus valores. Os mecanismos que levam ao aumento da PA estão relacionados ao sistema catecolaminérgico (via adrenalina e noradrenalina) e ao hormônio antidiurético. Em contrapartida, a redução da PA é consequência da liberação do peptídeo natriurético atrial e da ativação do sistema caliceína-cininas. Ademais, a PA pode ser modulada por alterações na RVPT, devido às substâncias sintetizadas pelo endotélio (óxido nítrico, prostaglandinas e endotelina) (EVORA et al, 1995).

O controle da PA a longo prazo está relacionado com a regulação da volemia e do equilíbrio hidroeletrólítico do corpo, através do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). A renina é sintetizada e armazenada nas células justaglomerulares do rim e é liberada na corrente sanguínea em resposta

a vários estímulos. A principal função da renina é clivar o angiotensinogênio em angiotensina I. Este último, por sua vez, é clivado a angiotensina II através da enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II é capaz de promover um aumento na PA por diversos mecanismos, tais como: 1) vasoconstrição através de sua interação com os receptores AT_1 das células do MLV; 2) aumento da contratilidade e hipertrofia cardíaca; e 3) estímulo da secreção de aldosterona (OPARIL et al, 2018).

O controle de Na^+ no rim é considerado o principal fator que regula a PA por determinar o volume intravascular (BROZOVICH et al, 2016). O aumento na reabsorção renal de Na^+ necessita do aumento da reabsorção de água para manter a concentração plasmática de desse íon próximo a 140 mM. A elevação do volume intravascular resultante aumenta o retorno de sangue venoso ao coração, aumentando assim o DC e levando diretamente à elevação da PA. Por outro lado, a reabsorção prejudicada de Na^+ reduz o volume sanguíneo e a PA (LIFTON; GHARAVI; GELLER, 2001). Aliás, na patogênese da hipertensão arterial, a excreção renal de Na^+ é a principal determinante do DC e, portanto, da PA (Figura 1) (BROZOVICH et al, 2016).

Figura 1 – Representação esquemática dos fatores que influenciam na pressão arterial.



A PA é o produto da RVPT e do DC. Mudanças na reabsorção renal de Na^+ aumentam ou diminuem o volume intravascular e resultam em aumento ou diminuição do débito cardíaco, o que altera a pressão arterial. Da mesma forma, as alterações vasculares podem aumentar ou diminuir a RVPT, o que também leva a um aumento ou diminuição da PA (Adaptado de BROZOVICH et al, 2016).

Como é possível perceber, a regulação da PA depende de ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino. No entanto, um desequilíbrio em algum desses sistemas pode levar ao surgimento de patologias, com a hipertensão (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; OPARIL et al, 2018).

Em muitos pacientes hipertensos a elevação da PA é decorrente do aumento da RVP enquanto que outros ocorre uma elevação do DC (Figura 1) (BROZOVICH et al, 2016; SANJULIANI, 2002). A manutenção da PA dentro dos parâmetros adequados consiste em variações no DC e na RVP, com inúmeras substâncias e sistemas fisiológicos interagindo de maneira complexa (NEVES; NEVES; OLIVEIRA, 2016).

2.2 Considerações Gerais sobre a Hipertensão Arterial

Segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial - 2020, a hipertensão arterial (HA) é definida como uma condição multifatorial, que depende de fatores genéticos, ambientais e sociais, caracterizada por elevação persistente da PA, ou seja, PA sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mmHg e/ou PA diastólica (PAD) maior ou igual a 90 mmHg, medida com técnica correta, em pelo menos duas ocasiões diferentes, na ausência de medicação anti-hipertensiva. Geralmente, a HA é uma condição assintomática e desta forma, costuma evoluir com alterações estruturais e/ou funcionais em órgãos-alvo, como coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos. Ela é o principal fator de risco modificável com associação independente, linear e contínua para doenças cardiovasculares (DCV), doença renal crônica e morte prematura (BARROSO et al, 2021).

A HA representa a principal causa de morbimortalidade por doença cardiovascular (DCV) em todo o mundo. Nas últimas três décadas, a prevalência de HA aumentou e foi responsável por 10 milhões de mortes (JONES et al, 2021). Estima-se que 1,4 bilhões de pessoas em todo o mundo são hipertensas, destas, apenas 14% mantêm a doença sob controle (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). No Brasil, a taxa de controle pressórico varia de 10,4 a 35,2%, a depender da região do país (YUGAR-TOLEDO et al, 2020).

Estudos observacionais prospectivos demonstraram repetidamente uma relação forte e contínua entre níveis aumentados de PA e DCV, como acidente vascular cerebral (isquêmico e hemorrágico), doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, doença vascular periférica e doença renal em estágio final. Essa relação entre PA e DCV é independente de outros fatores de risco e se aplica tanto à PA sistólica, quanto à diastólica, mas é um pouco mais robusta para a PA sistólica em adultos (OPARIL et al, 2018). Em adultos de meia-idade, cada aumento de 20 mmHg na PAS está associado a uma duplicação na taxa de morte como consequência de acidente vascular cerebral, doença cardíaca isquêmica e outras causas vasculares (JONES et al, 2021).

Mudanças no estilo de vida são recomendadas para todos os pacientes hipertensos, tais como: redução do consumo de sal, aumento no consumo de potássio, consumo moderado de álcool, práticas regulares de atividades físicas e perda de peso em pacientes obesos (OPARIL et al, 2018). No entanto, a maioria dos pacientes hipertensos, mesmo seguindo essas recomendações, necessitará de fármacos para alcançar a meta pressórica ideal (BARROSO et al, 2021). O principal objetivo do tratamento farmacológico é prevenir a morbidade e reduzir a mortalidade cardiovascular associadas à HA (NOBRE et al, 2013).

No Brasil, existem várias classes de medicamentos anti-hipertensivos disponíveis, como listados na tabela 1. As cinco principais classes são: diuréticos (DIU), bloqueadores dos canais de cálcio (BCC), inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRA) e betabloqueadores (BB). Esses medicamentos têm demonstrado diminuição significativa da PA, com reduções consideráveis dos desfechos cardiovasculares fatais e não fatais. As demais classes de fármacos listadas não foram amplamente estudadas em ensaios clínicos e associam-se a maior taxa de eventos adversos e seus usos são recomendados quando não há controle adequado da PA (BARROSO et al, 2021).

Embora o tratamento ou redução da hipertensão possa impedir o início de eventos cardiovasculares, as terapias existentes são apenas parcialmente eficazes (BROWN et al, 2018), visto que um número significativo de pacientes não responde satisfatoriamente às terapias anti-hipertensivas disponíveis, caracterizando a hipertensão arterial resistente (HAR) (SILVA et al, 2017).

O posicionamento mais recente da Sociedade Brasileira de Cardiologia define a HAR como uma condição em que a PA permanece acima das metas recomendadas com o uso de três anti-hipertensivos de diferentes classes, incluindo um IECA ou BRA, um BCC de ação prolongada e um DIU tiazídico de longa ação em doses máximas preconizadas e toleradas, administradas com frequência, dosagem apropriada e comprovada adesão (YUGAR-TOLEDO et al, 2020).

Tabela 1 – Anti-hipertensivos disponíveis no Brasil.

Classe		Principais representantes
Diuréticos (DIU)	Tiazídicos	Clortalidona, Hidroclorotiazida, Indapamida
	Alça	Bumetanida, Furosemida
	Poupadores de potássio	Amlorida, Espironolactona
Inibidores adrenérgicos	Ação central	Alfametildopa, Clonidina, Rilmenidina
	Betabloqueadores (BB)	Atenolol, Bisoprolol, Carvedilol, Metoprolol, Nadolol, Nebivolol, Propranolol, Pindolol
	Alfabloqueadores	Doxazosina, Prazosina
Bloqueadores dos Canais de Cálcio (BCC)	Diidropiridinas	Anlodipino, Felodipino, Lacidipino, Lercarnidipino, Manidipino, Nifedipino, Nitrendipino
	Não-diidropiridinas	Verapamil, Diltiazem
Inibidores da ECA (IECA)		Benazepril, Captopril, Enalapril, Fosinopril, Lisinopril, Perindopril, Ramipril
Bloqueadores dos receptores de angiotensina II (BRA)		Candesartana, Irbersartana, Losartana, Olmesartana, Telmisartana, Valsartana
Inibidor direto da renina		Alisquireno
Vasodilatadores diretos		Hidralazina

Fonte: Adaptado de BARROSO et al, 2021.

A prevalência da HAR no mundo é estimada entre 10 a 20% dos hipertensos, o que significa cerca de 200 milhões de hipertensos resistentes. Essa condição está relacionada a uma alta morbimortalidade cardiovascular, apresentando um risco 47% maior de desenvolver eventos cardiovasculares quando comparados aos hipertensos em geral (YUGAR-TOLEDO et al, 2020). Diante desses fatos, fica evidente a necessidade de estudos para a busca de novas terapias anti-hipertensivas.

2.3 Considerações Gerais sobre o Modelo Experimental de Hipertensão Espontânea

Embora a grande quantidade de estudos que envolvem a fisiopatologia da hipertensão, muitas vezes é uma tarefa difícil determinar com precisão a sua causa. Nesse sentido, os modelos animais de hipertensão têm sido úteis não apenas para desvendar a patogênese da HA, mas também para estudar novas abordagens terapêuticas (LERMAN et al, 2019).

Dentre os diversos modelos animais de hipertensão, os ratos são, de longe, as espécies de pesquisa mais utilizadas. Diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos com boa fidelidade humana para diversas causas específicas de hipertensão, como por exemplo, modelos de hipertensão induzidas por estenose da artéria renal, pela administração de mineralocorticoides ou através de uma dieta rica em sódio sobreposta ao fundo genético apropriado, pela desnervação dos barorreceptores sinoaórticos ou pela inibição crônica do óxido nítrico (DORNAS; SILVA, 2011). No entanto, modelos de hipertensão primária são mais difíceis de se desenvolver devido à causa multifatorial da HA humana (LERMAN et al, 2019).

Em 1963, Okamoto e Aoki desenvolveram um modelo experimental para estudo da hipertensão sem que fosse preciso nenhum recurso fisiológico, farmacológico ou cirúrgico. Através de endocruzamentos entre irmãos da linhagem Wistar Kyoto (WKY), foi obtida uma linhagem de 100% de descendentes com doença hipertensiva, surgindo, desta forma, os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (FAZAN et al, 2006). Desde então, a linhagem SHR se tornou referência nas pesquisas em hipertensão experimental devido a semelhança com a fisiopatologia da hipertensão essencial humana, o que torna esse modelo animal tão importante (CONCEIÇÃO-VERTAMATTI et al, 2017).

A similaridade observada entre a hipertensão humana e os ratos SHR, incluem: a predisposição genética para hipertensão sem etiologia específica, o aumento da resistência periférica total sem expansão de volume e igual resposta a tratamentos com drogas (FAZAN et al, 2006).

Entre a 2ª e a 4ª semana de vida, o SHR apresenta a FC elevada em comparação com o WKY, sem alteração da PA. No entanto, entre a 4ª e a 6ª

semana, a PAS encontra-se significativamente elevada em comparação ao WKY, sem alteração da FC. Desse modo, estabeleceu-se que a FC elevada precede a elevação da PAS. Provavelmente uma taquicardia pré-hipertensiva é o primeiro passo do desenvolvimento da hipertensão no SHR (FAZAN et al, 2006). Entre a 6ª e a 24ª semana de idade ocorre a progressão da hipertensão com alterações estruturais no coração que estão associadas à hipertrofia cardíaca progressiva (DORNAS; SILVA, 2011). A partir da 20ª semana, a PAS é aproximadamente 50% mais alta do que a de seus controles WKY, embora, como na hipertensão essencial humana, seu débito cardíaco seja normal (MULVANY; HALPERN, 1977).

Mulvany e Halpern (1977) realizaram estudos com pequenos vasos de resistência arterial do leito mesentérico e constataram que a contratilidade dos vasos de resistência é cerca de 34% maior em SHR do que em WKY, provavelmente devido à hipertrofia da parede arterial nos SHR.

Até recentemente, havia pouca evidência experimental consistente com a regulação do tônus vascular sendo um fator importante para o mecanismo molecular que produz hipertensão. No entanto, vários estudos têm demonstrado a importância das alterações na reatividade vascular ou na regulação da contração dessa musculatura para o controle da PA (BROZOVICH et al, 2016). Sendo assim, logo em seguida serão discutidos com mais detalhes os mecanismos responsáveis pela contração e relaxamento da musculatura lisa vascular.

2.4 Considerações Gerais sobre Contração e Relaxamento do Músculo Liso Vascular

As células do músculo liso vascular (MLV) são componentes altamente especializados que compõem as paredes dos vasos sanguíneos (MAZUREK et al, 2017). Seu objetivo primordial é estabelecer o tônus vascular por meio da contração e do relaxamento celular dinâmico e, conseqüentemente, regular o fluxo sanguíneo (SMITH; NEWBY; BOND, 2019; TYKOCKI; BOERMAN; JACKSON, 2017). Portanto, o tônus vascular representa a atividade contrátil das células do MLV e a sua desregulação pode ocasionar o desenvolvimento de

doenças cardiovasculares, como a hipertensão (JACKSON, 2000; HIRANO; HIRANO; KANAIDE, 2004).

Fisiologicamente, a principal função das células do MLV é gerar força de contração (WEBB, 2003). O estímulo inicial que desencadeia a contração do MLV é o aumento na concentração de Ca^{2+} no meio intracelular (GHEIBI, 2018; THORNELOE; NELSON, 2005). Esse aumento pode ocorrer de duas formas: 1) influxo de Ca^{2+} extracelular, através dos canais presentes na membrana plasmática; ou 2) liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, através do retículo sarcoplasmático (RS) (BERRIDGE, 2004; BROZOVICH et al, 2016; SOMLYO; SOMLYO, 1994).

O influxo de Ca^{2+} extracelular é mediado principalmente pela abertura de canais para cálcio operados por voltagem (VOC, do inglês *voltage-operated channels*) (CRIBBS, 2006; SOMLYO; SOMLYO, 1968). A concentração intracelular de Ca^{2+} livre no citoplasma é de aproximadamente 10 a 100 nM, um nível baixo comparado ao meio extracelular. Quando ocorre uma despolarização da membrana, os VOCs reagem abrindo-se, e desta forma ocorre o influxo de Ca^{2+} a favor do seu gradiente eletroquímico (DOLPHIN, 2016).

Apesar da grande contribuição que os VOCs exercem para a entrada de Ca^{2+} na célula, há uma série de outros canais que modulam o influxo desse íon, como os canais catiônicos potencial receptor transiente (TRP, do inglês *transiente receptor potencial*) (BROZOVICH et al, 2016). Dentre os TRP destacam-se os canais para cálcio operados por receptores (ROC, do inglês *receptor-operated channels*) e os canais para cálcio operados por estoque (SOC, do inglês *store-operated channels*) (CLAPHAM, 2007; THORNELOE; NELSON, 2005).

Os ROCs são canais ativados por agonistas específicos, como por exemplo a noradrenalina, a angiotensina II e a endotelina (SOMLYO; SOMLYO, 1968; ZICHA et al, 2014). Os agonistas interagem com receptores acoplados à proteína G na membrana plasmática, que por sua vez, ativa a enzima fosfolipase C (PLC), e esta promove a hidrólise do fosfatidil inositol bisfosfato (PIP_2) em inositol trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 se difunde no citosol e faz ligação a receptores específicos na membrana do RS (IP_3R – receptor de IP_3), resultando em liberação de Ca^{2+} para o meio intracelular (OGUT; BROZOVICH, 2003; WEBB, 2003). O DAG permanece na membrana, e juntamente com o

Ca^{2+} , ativa uma proteína quinase C (PKC), responsável pelo aumento da condutância iônica dos canais transmembranares para Ca^{2+} . A PKC também modula a sensibilidade do aparato contrátil ao Ca^{2+} (MORGADO et al, 2012; PAIVA; FARIAS, 2005).

Os SOC's estão presentes na membrana celular e são ativados quando há depleção de Ca^{2+} dos estoques do RS (BERRIDGE, 1997; MCFADZEAN; GIBSON, 2002). No momento em que ocorre o esgotamento dos estoques de Ca^{2+} as moléculas de interação estromal (STIM, do inglês *stromal interaction molecule*), sensores que estão presentes no RS, são ativadas, migram para próximo da membrana celular e interagem com proteínas formadoras de poros de canais para Ca^{2+} , o que permite o influxo desse íon (BROZOVICH et al, 2016; MORGADO et al, 2012). A ativação dos SOC's possibilita que a concentração de Ca^{2+} permaneça elevada no citosol mesmo quando as reservas estão se esgotando, além de favorecer o reabastecimento dos estoques intracelulares através da recaptção desse íon via Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA – do inglês *sarcoplasmic-endoplasmatic reticulum Ca^{2+} ATPase*) (THORNELOE; NELSON, 2005).

Apesar do influxo de Ca^{2+} extracelular ser fundamental para o início da contração do MLV, a permanência do estado contrátil é determinada pela liberação do Ca^{2+} estocado no retículo sarcoplasmático (BROZOVICH et al, 2016). No RS estão presentes os receptores de trifosfato de inositol (IP_3R) e receptores de rianodina (RyR), ambos, quando ativos em resposta a um agonista, promovem a liberação do Ca^{2+} desses estoques para o citosol (KAßMANN et al, 2019; WRAY; BURDYGA, 2010). O IP_3R , a classe mais expressa de canais para Ca^{2+} intracelular, promove a efluxo de Ca^{2+} dos estoques intracelulares em resposta à ligação do IP_3 e do próprio Ca^{2+} ao receptor (PROLE; TAYLOR, 2016). Os RyR s, que recebem essa denominação por serem sensíveis à planta alcaloide rianodina e à cafeína, são ativados pelo Ca^{2+} liberado através dos IP_3R (processo conhecido por liberação de cálcio induzida por cálcio) (McHALE et al., 2006; SANDERSON et al., 2008).

A elevação do Ca^{2+} intracelular, independente do estímulo contrátil, permite a ligação do Ca^{2+} à calmodulina (CaM), formando o complexo 4Ca^{2+} -CaM. Este complexo expõe o sítio catalítico e ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK, do inglês *myosin light chain kinase*), que por sua vez, fosforila

Ser19 na unidade regulatória 20-kDa da cadeia leve da miosina (MLC₂₀) através da transferência de um grupo fosfato do trifosfato de adenosina (ATP), promovendo a exposição do sítio de fixação para actina na molécula de miosina, o que possibilita a formação de pontes cruzadas. A miosina ATPase é, então, ativada e a interação molecular entre os filamentos da miosina com a actina produz força e clivagem de ATP, ocorrendo o deslizamento destes filamentos com consequente desenvolvimento de força ou contração do músculo (GHEIBI, 2018; JOHNSON; SNYDER, 1995; MORGADO et al, 2012).

Em contrapartida, o relaxamento do MLV é iniciado quando a concentração citosólica de Ca²⁺ é diminuída. Essa redução nos níveis de Ca²⁺ pode ocorrer em resposta a um estímulo vasodilatador ou pela remoção do estímulo contrátil (MORGADO et al, 2012; WEBB, 2003).

É bem relatado na literatura a presença de diversas substâncias capazes de promover vasodilatação. O endotélio, camada de células que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos, exerce um importante papel na manutenção do tônus vascular por sintetizar diversas substâncias que atuam diretamente no MLV, como por exemplo os fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE). Dentre os FRDE estão o óxido nítrico (NO) e as prostaciclinas (PGI₂) (HUYNH; HEO, 2019; STANKEVIČIUS et al, 2003; SU, 2015).

O NO é sintetizado a partir da catálise da l-arginina pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O NO gerado no endotélio difunde-se rapidamente através da membrana celular e, no MLV, estimula uma guanilato ciclase solúvel (GCs). A GCs ativada facilita a formação do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), que causa uma diminuição na concentração de Ca²⁺ intracelular (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015)

As prostaciclinas são geradas no endotélio pela enzima ciclooxigenase (COX) a partir do ácido araquidônico. No MLV, a ação das prostaciclinas está relacionada à ativação da enzima adenilato ciclase (AC). A AC catalisa a síntese do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), que culmina na diminuição do Ca²⁺ intracelular (STANKEVIČIUS et al, 2003; SU, 2015). As ações do AMPc e GMPc na regulação do tônus vascular serão discutidas mais adiante.

Independente do estímulo, a redução dos níveis de Ca²⁺ das células do MLV ocorre: 1) a partir da extrusão do Ca²⁺ pela membrana plasmática através do trocador Na⁺/Ca²⁺ (NCX – do inglês *Na⁺/Ca²⁺ exchanger*) ou da Ca²⁺ ATPase

da membrana plasmática (PMCA – do inglês *plasma membrane Ca²⁺ ATPase*); ou 2) a partir da recaptação do Ca²⁺ pelo RS através da SERCA (THORNELOE; NELSON, 2005; TOUYZ et al, 2018).

A redução do Ca²⁺ induz um aumento na atividade da enzima fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP, do inglês *myosin light chain phosphatase*). Esta, por sua vez, reverte a fosforilação da MLC₂₀, desfosforilando-a, o que resulta no relaxamento do MLV (HIRANO et al, 2003; WEBB, 2003). Portanto, em condições fisiológicas a homeostasia do tônus vascular é alcançada através do equilíbrio nos efeitos da MLCK e da MLCP, que promovem contração e relaxamento do MLV, respectivamente (HIRANO et al, 2003).

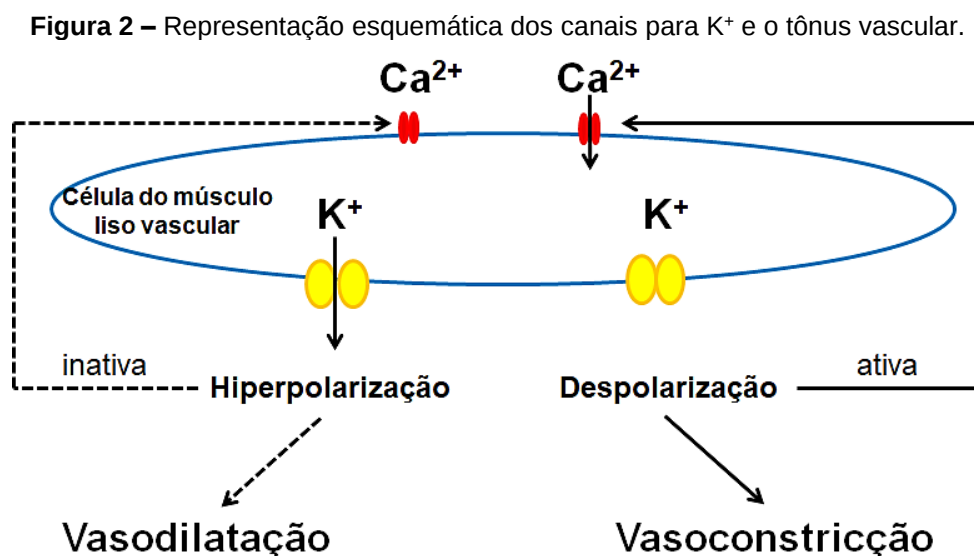
Até aqui foi visto que os canais para Ca²⁺ exercem grande influência na regulação do tônus vascular, no entanto outros canais também participam dessa regulação ao promover alterações no potencial elétrico da membrana, como os canais para K⁺ (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Vale ressaltar que o K⁺ é o cátion intracelular mais abundante, com uma concentração de 140 a 150 nmol/L dentro das células, o que representa cerca de 98% da concentração corporal, e apenas 2% está presente no fluido extracelular. Esse íon é o principal determinante da voltagem da membrana (ZACCHIA et al, 2016).

No MLV, a ativação dos canais para K⁺ pode determinar o influxo de Ca²⁺ através dos VOCs, visto que a condutância aumentada ao K⁺ promove a hiperpolarização da membrana celular, com consequente vasodilatação. Em contrapartida, a diminuição na condutância do K⁺ promove a despolarização da membrana, resultando em vasoconstrição (Figura 2) (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996; THORNELOE; NELSON, 2005).

Há vários tipos de canais para K⁺ que podem estar envolvidos na regulação do tônus basal do MLV, dentre eles, incluem-se: canais para K⁺ sensíveis à voltagem (K_v); canais para K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}); canais para K⁺ ativados pelo Ca²⁺ (K_{Ca}) e canais para K⁺ retificadores de entrada (K_{IR}) (JACKSON, 2000).

Os K_v são uma classe ubíqua de canais para K⁺, expressos pelas células do MLV (NELSON; QUAYLE, 1995). Esses canais são ativados pela despolarização da membrana e, desta forma, promovem o efluxo de K⁺ e a repolarização da membrana, além de participar da manutenção do potencial de repouso e do tônus vascular (KO et al, 2010). Os K_v também podem participar

do mecanismo de ação de drogas vasoconstrictoras e vasodilatadoras: vasoconstrictores podem fechar canais K_v por mecanismos que envolvem a elevação do Ca^{2+} intracelular e a PKC; e vasodilatadores podem promover a abertura desses canais pela cascata de sinalização do AMPc (JACKSON, 2000).



A abertura de canais para K^+ leva a difusão dos íons K^+ para fora da célula, a hiperpolarização da membrana, o fechamento dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem e a diminuição do Ca^{2+} intracelular, o que promove a vasodilatação. O fechamento dos canais para K^+ tem o efeito oposto (Adaptado de JACKSON, 2000).

Os K_{ATP} foram inicialmente identificados em cardiomiócitos. Em estudos posteriores, foram identificados K_{ATP} em diversos outros tipos celulares, incluindo as células do MLV (TERAMOTO, 2006). Os K_{ATP} são uma combinação de canais de K_{IR} ($K_{IR6.x}$) como subunidades formadoras de poros, e receptores de sulfonilureia ($SUR.x$) como subunidades regulatórias (GHEIBI, 2018). Esses canais são seletivos a passagem do K^+ e são ativados por redução na concentração intracelular de ATP (NELSON et al, 1990). Os K_{ATP} desempenham um importante papel na regulação do potencial de repouso da membrana e, portanto, na manutenção do tônus vascular. Eles também parecem participar do mecanismo de ação de substâncias vasodilatadoras através de mecanismos dependentes e independentes da via AMPc/Proteína quinase dependente de AMPc (FOSTER; COETZEE, 2016; JACKSON, 2000).

Os K_{Ca} são subdivididos de acordo com sua condutância em canais para K^+ de grande condutância ativados pelo Ca^{2+} (BK_{Ca}), canais para K^+ de condutância intermediária ativados pelo Ca^{2+} (IK_{Ca}) e canais para K^+ de pequena

condutância ativados pelo Ca^{2+} (SK_{Ca}) (WEI et al, 2005). Os BK_{Ca} são dependentes de Ca^{2+} e de voltagem. Esses canais podem ser regulados, dentre outros fatores, por fosforilação mediada por proteínas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos (CLEMENTS; TERENCEV; SELLKE, 2015). Os BK_{Ca} contribuem para a repolarização do potencial de ação (SAH; FABER, 2002) e desta forma, regulam o tônus vascular e promovem vasodilatação (CLEMENTS; TERENCEV; SELLKE, 2015). Os SK_{Ca} e IK_{Ca} são insensíveis à voltagem e são exclusivamente ativados pela baixa concentração de Ca^{2+} intracelular (WEI et al, 2005). A ativação dos SK_{Ca} no endotélio vascular contribui para o relaxamento das células do MLV (GRGIC et al, 2009).

Os K_{IR} são abundantes no músculo liso de vasos de resistência de pequenos diâmetros. A função exata desses canais no MLV não está totalmente elucidada, mas há duas hipóteses para sua função. A primeira hipótese é de que os K_{IR} contribuem para o potencial de repouso da membrana e o tônus basal em células musculares lisas de vasos de resistência. A segunda é que a ativação do K_{IR} em resposta a aumentos moderados na concentração de K^{+} extracelular pode causar vasodilatação (KO et al, 2008).

2.5 Considerações Gerais sobre Nucleotídeos Cíclicos

Os primeiros segundos mensageiros descritos na literatura foram os nucleotídeos cíclicos 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (LUGNIER, 2006). Eles são responsáveis por regular numerosas funções celulares, dentre elas, a contração e o relaxamento do MLV (BOBIN et al, 2016; OMORI; KOTERA, 2007; RYBALKIN et al, 2003). Como esses segundos mensageiros controlam diversos processos homeostáticos, a desregulação das suas vias de sinalização pode desencadear ou modular estados fisiopatológicos relacionados a várias doenças do sistema cardiovascular, incluindo disfunção erétil, claudicação intermitente, insuficiência cardíaca e hipertensão pulmonar (AHMAD et al, 2014).

Os níveis intracelulares dos nucleotídeos cíclicos são produtos do balanço entre as suas taxas de síntese e degradação (MORGADO et al, 2012). O AMPc é sintetizado a partir de uma molécula de ATP por uma proteína transmembranar, a adenilato ciclase (AC), que geralmente é ativada por

primeiros mensageiros externos (neurotransmissores, hormônios ou fármacos) que se ligam a um receptor acoplado à proteína G (LEE; MAURICE; BAILLIE, 2013). O GMPc, por sua vez, é sintetizado a partir do GTP pela enzima guanilato ciclase (GC) (RUTH, 1999). Nas células do MLV, a GC pode ocorrer de duas formas, a GC presente na membrana plasmática, o qual é ativada por peptídeos natriuréticos, ou a GC solúvel, que está presente no citoplasma e pode ser ativada pelo NO ou fármacos doadores de óxido nítrico (MUNZEL et al, 2003). Ambos os nucleotídeos cíclicos são degradados por enzimas denominadas de fosfodiesterases (PDEs) (LUGNIER, 2006).

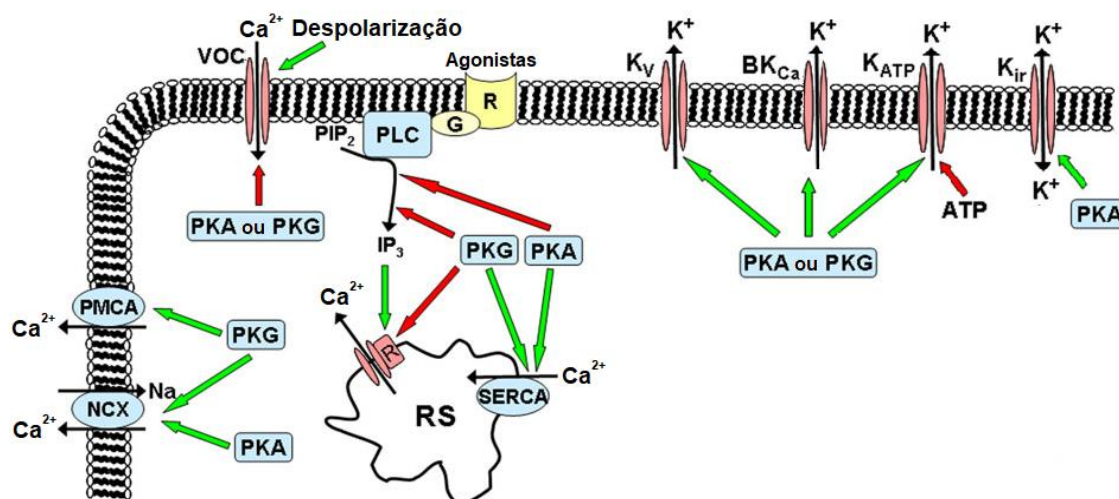
Uma vez sintetizados, o AMPc e o GMPc iniciam sua sinalização intracelular por ativar, respectivamente, uma proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (MAURICE et al, 2014). A PKA é uma proteína heterotrimérica, composta por duas subunidades catalíticas e duas subunidades regulatórias. A ligação do AMPc às subunidades regulatórias promove uma alteração conformacional dessa proteína, resultando em dissociação do complexo. As subunidades catalíticas, por estarem livres, fosforilam substratos proteicos específicos, promovendo seus efeitos biológicos (NEWTON; SMITH, 2004). A PKG é uma proteína homodimérica, composta de um domínio N-terminal, um domínio regulatório e um domínio catalítico. É o domínio N-terminal da PKG que interage com os substratos proteicos específicos (TSAI; KASS, 2009).

Apesar do AMPc e do GMPc modular a atividade de uma proteína quinase específica, como citado anteriormente, vale ressaltar que em situações em que estes nucleotídeos cíclicos se encontram em concentrações citosólicas bastante altas (aproximadamente 10 vezes mais), cada um deles pode ativar ambas proteínas quinases, PKA e PKG (REMBOLD, 1992).

Nas células do MLV, o aumento na concentração de AMPc e GMPc é um dos principais fatores que está relacionado com a redução dos níveis de Ca^{2+} . Os mecanismos que provavelmente estão envolvidos nesse efeito encontram-se representados na figura 3. São eles: 1) a recaptação de Ca^{2+} para o RS, a inibição da liberação de Ca^{2+} do RS, o aumento do efluxo de Ca^{2+} intracelular e/ou a redução do influxo de Ca^{2+} extracelular; 2) a hiperpolarização da membrana celular pela ativação de canais para K^{+} ; 3) a diminuição na sensibilidade do Ca^{2+} pela maquinaria contrátil devido a uma redução na

atividade da MLCK e/ou elevação na atividade da MLCP; e 4) a redução na sensibilidade da maquinaria contrátil pela desfosforilação da MLC_{20} (MORGADO et al, 2012).

Figura 3 – Representação esquemática dos mecanismos induzidos pelas proteínas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos em células do músculo liso vascular.



AMPC e GMPc ativam, respectivamente, a PKA e a PKG, que por sua vez fosforilam diversos alvos proteicos que resultam na redução do Ca²⁺ intracelular, com consequente relaxamento do músculo liso vascular. Dentre os alvos da PKA e PKG, destacam-se: a recaptação de Ca²⁺ para o RS pela SERCA, a inibição da liberação de Ca²⁺ do RS através da inibição dos receptores de IP₃, o aumento do efluxo de Ca²⁺ intracelular e/ou a redução do influxo de Ca²⁺ extracelular e a hiperpolarização da membrana celular pela ativação de canais para K⁺. Setas verdes indicam estimulação e setas vermelhas, inibição. (Adaptado de MORGADO et al, 2012).

2.6 Considerações Gerais sobre as Fosfodiesterases de Nucleotídeos Cíclicos

As fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) são uma superfamília de enzimas, do tipo fosfotransferases, que catalisam de maneira seletiva a hidrólise da ligação 3'-fosfodiéster do AMPC e GMPc resultando na formação de seus metabólitos inativos 5'-AMP e 5'-GMP, respectivamente (BENDER; BEAVO, 2006). As PDEs representam a principal via para uma diminuição rápida nos níveis desses segundos mensageiros dentro da célula e, desta forma, desempenham um papel crucial na sinalização intracelular (BOBIN et al, 2016; KERAVIDIS; LUGNIER, 2012).

Atualmente as PDEs estão classificadas em onze famílias (PDE1 a PDE11) (Tabela 2). Cada família compreende de um a quatro genes distintos

que, nas células dos mamíferos, codificam mais de 50 diferentes isoenzimas de PDEs (CONTI, 2000; CONTI; BEAVO, 2007; FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011). Essa classificação em famílias está relacionada às diferenças nas funções celulares, estruturas primárias, afinidade ao AMPc e ao GMPc, propriedades catalíticas e respostas a inibidores, ativadores e efetores específicos, bem como aos mecanismos de regulação das PDEs (BENDER; BEAVO, 2006; MAURICE et al, 2014).

Tabela 2 – Classificação, distribuição nos tecidos e inibidores de referência das PDEs

Família	Substrato	Características	Localização	Inibidores
PDE1	AMPc e GMPc	Estimulada por Ca^{2+} -CaM	Cérebro, Coração, rim, fígado, músculo esquelético, músculo liso vascular e visceral.	Nimodipino, IC224
PDE2	AMPc e GMPc	Estimulada por GMPc	Córtex adrenal, cérebro, corpo cavernoso, rim, fígado, coração, músculo liso visceral e músculo esquelético.	EHNA, BAY60-7550, Oxindol
PDE3	AMPc > GMPc	Inibida por GMPc	Corpo cavernoso, coração, plaquetas, músculo liso vascular e visceral, fígado, rim.	Cilostamida, Milrinona, Cilostazol
PDE4	AMPc	Específica para AMPc, Insensível a GMPc	Rim, pulmão, cérebro, mastócitos, coração, músculo esquelético, músculo liso vascular e visceral.	Rolipram, Cilomilast, Roflumilast, Zardaverina
PDE5	GMPc	Específica para GMPc, fosforilada por PKA/PKG	Corpo cavernoso, plaquetas, músculo esquelético, músculo liso visceral e vascular.	Zaprinast, DMPPO, Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil
PDE6	GMPc	Específica para GMPc	Retina.	Zaprinast, DMPPO, Sildenafil, Vardenafil
PDE7	AMPc	Específica para AMPc	Músculo esquelético, coração e linfócitos.	BRL 50481, IC1242
PDE8	AMPc	Específica para AMPc	Testículo, ovário, baixo intestino e cólon.	PF-04957325
PDE9	GMPc	Específica para GMPc	Baço, intestino e cérebro.	BAY73-6691, PF-04447943
PDE10	AMPc e GMPc	Hidrolisa GMPc, inibida por AMPc	Cérebro, testículo e tireoide.	Papaverina, TP-10
PDE11	AMPc e GMPc	Ligação com dois GMPc	Células esqueléticas, próstata, bexiga, células secretoras, testículos, fígado e rim.	Desconhecido

Fonte: Adaptado de KERAVIDIS; LUGNIER, 2012; LUGNIER, 2006; MAURICE et al, 2014.

A regulação das PDEs ocorre a nível genético ou por diversos mecanismos bioquímicos, tais como fosforilação e desfosforilação, ligação alostérica ao AMPc ou GMPc, ligação ao complexo Ca^{2+} -calmodulina e várias interações proteína-proteína (BENDER; BEAVO, 2006).

A organização estrutural das PDEs exibe três domínios funcionais: um domínio C-terminal, um núcleo catalítico conservado e um domínio regulatório N-terminal. A região C-terminal é similar em todas as famílias de PDE, exceto na PDE6. O domínio catalítico contém cerca de 250 a 300 aminoácidos mostrando um alto grau de conservação dessa região entre as onze famílias de PDE (OTERO et al, 2014). No entanto, cada isoforma da enzima difere acentuadamente na região regulatória N-terminal (MAURICE et al, 2014).

Os domínios catalíticos são responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos cíclicos (AZEVEDO; KÜMMERLE, 2015). Estes domínios possuem sequências específicas para cada família, o que determina os alvos distintos de cada PDE (LEE; MAURICE; BAILLIE, 2013). As últimas evidências descritas na literatura sugerem que a especificidade aos substratos das PDEs é conferida pela orientação de um resíduo de glutamina dentro do sítio catalítico, o qual pode formar ligações de hidrogênio com o AMPc, o GMPc ou ambos, dependendo da sua orientação fixa ou capacidade de rotação (OTERO et al, 2014). As famílias PDE4, PDE7 e PDE8 hidrolisam seletivamente o AMPc; PDE5, PDE6 e PDE9 fazem a hidrólise seletiva do GMPc; e as demais famílias (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 e PDE11) possuem especificidade dupla, hidrolisando tanto AMPc quanto GMPc, com afinidades variadas a depender da isoforma (Tabela 2) (BOBIN et al, 2016; LEE; MAURICE; BAILLIE, 2013).

O domínio N-terminal define essencialmente propriedades específicas de cada membro e a variante genética de cada família de PDE (AZEVEDO et al, 2014), incluindo o entendimento da regulação e localização celular das diferentes isoformas da enzima. Essa região inclui o domínio de ligação à calmodulina, encontrada na PDE1; os domínios de ligação ao GMPc, encontrados nas famílias PDE2, 5, 6, 10 e 11; e as chamadas *upstream conserved region 1* e *2* (UCR1 e UCR2), encontradas na PDE4 (OTERO et al, 2014).

Nos mamíferos, as PDEs encontram-se distribuídas de forma ubíqua (LUGNIER, 2006). Apenas um tipo de célula pode expressar diferentes

isoformas dessas enzimas (BENDER; BEAVO, 2006). A ampla distribuição das PDEs pode influenciar em muitas funções celulares, tais como a produção e ação de mediadores pró-inflamatórios, diferenciação, apoptose, lipogênese, gliconeogênese, glicogenólise, agregação plaquetária, resposta erétil e resposta visual, além de funções cardíacas, regulação de canais iônicos e a contração do MLV (RAHIMI et al, 2010; JUILFS et al., 1999; PERRY; HIGGS, 1998).

Alteração na atividade das PDEs tem sido associada ao desenvolvimento de doenças, como a asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, disfunção erétil, doenças autoimunes, esquizofrenia, depressão, claudicação, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca e hipertensão (LUGNIER, 2011). Desta forma, cada vez mais as PDEs tem sido consideradas importantes alvos terapêuticos, principalmente ao que se refere às doenças de origem multifatorial (LUGNIER, 2006).

2.7 Fosfodiesterase como Alvo de Fármacos

A teofilina foi o primeiro inibidor de PDE descrito na literatura (LUGNIER, 2006). Entretanto, não estava clara a vantagem terapêutica que a inibição dessas enzimas poderia proporcionar. Um dos motivos que levaram os pesquisadores a considerar as PDEs como possíveis alvos de fármacos foi o princípio básico da farmacologia de que a regulação das taxas de degradação de qualquer ligante ou segundo mensageiro pode alterar muito mais a concentração dos mesmos ao comparar com a regulação da sua síntese. No caso das PDEs, esse pressuposto foi ratificado quando se constatou que na maioria das células a atividade desta enzima é bem maior, quando comparado à sua atividade ciclase, tanto para o AMPc, quanto para o GMPc. A baixa concentração intracelular dos substratos (aproximadamente de 1 a 10 μM) também foi outra razão para que as PDEs fossem consideradas bons alvos terapêuticos, visto que um inibidor competitivo não necessitaria competir com altos níveis de substratos endógenos para exercer seus efeitos (BENDER; BEAVO, 2006).

Posteriormente, observou-se que alterações na sinalização intracelular relacionadas a desregulações das PDEs podem contribuir para explicar as dificuldades observadas na prevenção e tratamento, assim como no

desenvolvimento de patologias como a inflamação, o câncer, distúrbios neurodegenerativos e doenças cardiovasculares (FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011; KERAVIS; LUGNIER, 2012).

A descoberta de inibidores específicos e potentes para cada família de PDE alavancou ainda mais as pesquisas e a cada dia, o impacto funcional e as utilidades terapêuticas destes inibidores vêm ganhando grande reconhecimento (AHMAD et al, 2015; CORBIN; FRANCIS, 1999; MAURICE et al, 2014). Exemplo disso é o Sildenafil, um inibidor seletivo para a PDE5. O Sildenafil inicialmente foi descoberto e introduzido no mercado farmacêutico para tratar a disfunção erétil e acabou gerando grande repercussão ao se tornar um dos medicamentos mais vendidos nos Estados Unidos. Atualmente, este fármaco tem sido considerado bastante promissor no tratamento de diversas patologias, como por exemplo, na hipertensão arterial pulmonar e em diversas outras disfunções relacionadas à musculatura lisa (BOSWELL-SMITH; SPINA; PAGE, 2006).

Além do Sildenafil, outros inibidores de PDE têm sido utilizados na prática clínica. Cilostazol, um inibidor de PDE3, é amplamente utilizado para tratar claudicação intermitente, uma doença vascular periférica. Milrinona, também inibidora de PDE3, é utilizada para a terapia aguda na insuficiência cardíaca refratária e para estabilizar e manter pacientes em preparação para transplantes cardíacos. Roflumilaste e Cilomilaste, inibidores de PDE4, tem uso clínico no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica e redução da inflamação das vias aéreas (AZEVEDO et al, 2014).

Recentemente, inibidores de PDE tem sido considerados alvos farmacológicos interessantes para o tratamento dos sintomas causados pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) (GIORGI et al, 2020), visto que já é bem descrito na literatura que a elevação do AMPc desempenha um papel crucial na manutenção de células pulmonares e brônquicas, levando a efeitos antifibróticos, vasodilatadores, antiproliferativos e ao controle dos eventos anti-inflamatórios (BILLINGTON et al, 2013). Desta forma, inibidores de PDE despertaram o interesse para o tratamento da sintomatologia do SARS-CoV-2, a exemplo do roflumilaste (EL TABAA; EL TABAA, 2020; SINGH et al, 2022; SUGIN LAL JABARIS; RANJU, 2021), do tanimilaste (NGUYEN et al, 2022), do cilostazol (MOTTA et al, 2021), da cafeína (ROMARO-MARTÍNEZ et al, 2021), do apremilast (SANTANIELLO; VIGONE;

BERETTA, 2020), da vinpocetina (AL-KURAISHY et al, 2022), da teofilina (MONTAÑO et al, 2022), da pentoxifilina (MOSTAFA-HEDEAB et al, 2022), bem como dos inibidores de PDE5 de uma forma geral (AL-KURAISHY et al, 2020). No entanto, até o momento, isso permanece especulativo, visto que ainda não há nenhum ensaio clínico em andamento (SCHICK; SCHLEGEL, 2022).

O número de inibidores de PDE em estudo é cada dia mais crescente e tem representado ferramentas farmacológicas importantes (independente se são ou não seletivos ou potentes) para caracterizar a distribuição e o papel funcional dessas enzimas em órgãos ou tecidos, em condições normais ou em estados patológicos (AZEVEDO et al, 2014). Destes, os inibidores seletivos da família PDE4 têm atraído bastante a atenção e o interesse dos pesquisadores, sendo, portanto, uma família de PDE bastante explorada atualmente (OTERO et al, 2014).

2.8 Fosfodiesterase 4

A família de PDE4, como descrito na tabela 2, é responsável em promover a hidrólise seletiva do AMPc com alta afinidade (AZEVEDO et al, 2014). Portanto, o aumento na atividade da PDE4 resulta no retorno para o estado basal dos níveis desse segundo mensageiro (ESKANDARI et al, 2015). A PDE4 é codificada por quatro genes, denominados PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D, dos quais originam mais de 25 isoformas distintas, tornando essa família a mais vasta dentre as demais PDEs (ESKANDARI et al, 2015; KERAVIDIS; LUGNIER, 2012). A expressão das isoformas de PDE4 varia com o tipo celular e o sítio intracelular em que estão compartimentalizadas (AZEVEDO; KÜMMERLE, 2015).

A PDE4 pode ser encontrada em vários tipos celulares, como descrito na tabela 2. O envolvimento da PDE4 em processos patológicos associados aos tecidos em que ela se encontra, sugere um grande potencial para intervenções farmacológicas em uma variedade de distúrbios inflamatórios, neurológicos, angiogênicos e vasculares (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005).

Inibidores seletivos dessa família vêm sendo extensamente estudados nas últimas décadas devido ao seu grande potencial clínico em diversas doenças (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005). O rolipram foi o primeiro inibidor

identificado como seletivo para a PDE4. Inicialmente ele foi desenvolvido para o tratamento da depressão, no entanto falhou no ensaio clínico por apresentar efeitos eméticos e distúrbios no trato gastrointestinal devido à sua estreita janela terapêutica (BOSWELL-SMITH; SPINA; PAGE, 2006). Apesar da limitação em seu uso, o rolipram instigou novos estudos a fim de buscar inibidores de PDE4 com uma maior janela terapêutica e com menos efeitos colaterais (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005; PERRY; HIGGS, 1998).

Outros fármacos que inibem a PDE4, tais como a zardaverina e o piclamilaste, também tiveram seus usos limitados devido à estreita janela terapêutica que apresentaram (LIPWORTH, 2005). No entanto, roflumilaste e cilomilaste foram aprovados para o uso clínico no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) grave e para a redução da inflamação das vias aéreas, ambos com segurança e eficácia terapêutica comprovada (AHMAD et al, 2015; CHONG; LEUNG; POOLE, 2013; LEE et al, 2016; LI et al, 2016; ROGLIANI et al, 2016).

Tabela 3 – Inibidores de PDE4 e doenças em estudo através de ensaios clínicos.

Inibidor de PDE4	Doenças
Apremilaste	Psoríase, psoríase-artrite, lúpus eritematoso discoide, dermatite atópica, líquen plano da vulva, acne conglobata.
CHF6001	DPOC, asma.
Cilomilaste	DPOC.
Crisaborol	Dermatite atópica, eczema, dermatite seborreica, alopecia areata, dermatite de estase, psoríase.
DRM02	Rosácea, dermatite atópica, psoríase.
Ibudilaste	Transtornos por uso de álcool, dependência de metanfetamina, cefaleia por uso excessivo de medicamentos, enxaqueca, esclerose lateral amiotrófica, Abuso de opioides, glioblastoma, esclerose lateral amiotrófica, pneumonia viral, esclerose múltipla, mielopatia, doenças da medula espinhal.
LEO 29102	Psoríase, dermatite atópica.
OPA-15406/ MM36	Dermatite atópica.
Roflumilaste	DPOC, transtorno depressivo maior, asma, pós-AVC, obesidade, doença de Alzheimer, bronquiectasia, fibrose não cística, dermatite, diabetes mellitus tipo 2, síndrome do desconforto respiratório, psoríase, obesidade, síndrome dos ovários policísticos, comprometimento cognitivo, sarcoidose, nefropatias diabéticas, linfoma (células B), esquizofrenia, dermatite atópica, esteatohepatite não alcoólica, alergia, dermatite seborreica.

Fonte: Adaptado de SCHICK; SCHLEGEL, 2022.

Estudos pré-clínicos têm documentado os potenciais efeitos de inibidores de PDE4 nos leucócitos, na secreção de muco em doenças das vias aéreas, no câncer (efeitos antitumor e anti-angiogênico), no sistema nervoso central (HOUSLAY; SCHAFER; ZHANG, 2005) e no MLV (SILVA, 2017). Os estudos clínicos têm demonstrado os benefícios de inibidores de PDE4 em diversas patologias, como descrito na tabela 3.

2.9 Fosfodiesterase 4 e o Sistema Cardiovascular

No coração, as isoformas de PDE4 expressas são a PDE4A, PDE4B e PDE4D (PREEDY, 2020). Juntas, elas coordenam diversas propriedades, incluindo frequência cardíaca, crescimento e sobrevivência celular, fibrose intersticial, tônus vascular, permeabilidade e proliferação endotelial, além de contratilidade muscular e lusitropia (ou seja, relaxamento diastólico). A PKA (principal efetora do AMPc), está envolvida principalmente na fosforilação de proteínas estimuladas por agentes adrenérgicos, resultando em elevação na concentração intracelular de Ca^{2+} através do influxo aumentado dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo-L e do “vazamento” do RyR₂ dos estoques intracelulares (DUNKERLY-EYRING; KASS, 2020). Simultaneamente, o Ca^{2+} é recaptado para o RS via ativação da SERCA (PREEDY, 2020).

As respostas β_2 -adrenérgicas no tecido cardíaco moduladas pela PDE4, são, em parte, por meio de interações com a β -arrestina. A estimulação adrenérgica causa recrutamento de β -arrestina, que se liga ao domínio catalítico da PDE4. O complexo β -arrestina/PDE4 é recrutado para o receptor β_2 ativado, onde contribui para a degradação do AMPc (constituindo assim uma regulação de feedback negativo), inibição da atividade PKA e modulação da mudança do receptor β_2 de sinalização G_s para G_i . A PDE4 está envolvida no controle do AMPc local e funcionamento normal do miocárdio, bem como no desenvolvimento de hipertrofia miocitária (AZEVEDO et al, 2014).

Estudos com camundongos nocaute para PDE4D3 com insuficiência cardíaca mostraram que a atividade reduzida dessa isoforma contribui para uma disfunção cardíaca, bem como para arritmia induzida por exercício e morte súbita. Esses achados lançam luz sobre os potenciais efeitos cardíacos adversos que os inibidores de PDE4 podem ter no tratamento crônico da asma

e acidente vascular cerebral (MILLER; YAN, 2010). Em contrapartida, diversos ensaios *in vitro* apontaram que inibidores de PDE4 parecem afetar a contratilidade apenas quando o miocárdio já está estimulado, visto que em condições basais a concentração intracelular de Ca^{2+} permaneceu inalterada (RAO; XI, 2009).

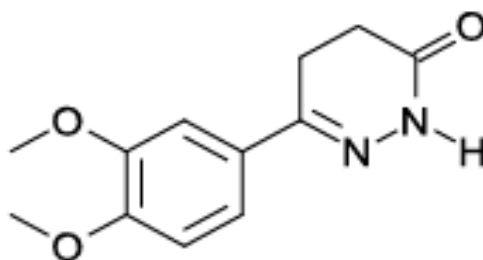
Embora os efeitos cardíacos demonstrados até aqui, alguns estudos apontaram o Rolipram com potencial efeito cardioprotetor, porém existe a necessidade de uma melhor investigação sobre os mecanismos que possivelmente promove esse efeito (RAO; XI, 2009).

No sistema vascular, o AMPc desempenha um papel chave na inibição da contração, proliferação e migração de células do MLV (HUBERT et al, 2014). Sendo assim, diversos estudos mostraram inibidores de PDE4 capazes de promover o relaxamento dessa musculatura (ORALLO et al, 2005; TANAKA et al, 1988; WALDKIRCH et al, 2010), conseqüentemente, regular a pressão arterial (HOUSLAY; BAILLIE; MAURICE, 2007).

2.10 AAL 195

A partir da otimização estrutural da zardaverina e do rolipram, foram sintetizadas várias moléculas a fim de se obter um inibidor seletivo para a PDE4, com melhores propriedades farmacológicas. Uma das moléculas que mostraram grande potencial inibitório foi o AAL 195, cuja principal característica é o sistema piridazinona em sua estrutura (Figura 4) (KRIER et al., 2005). O anel piridazinona representa um heterociclo de seis membros que contém dois átomos de nitrogênio adjacentes e uma carbonila (AKHTAR et al, 2016).

Figura 4 – Estrutura química do AAL 195.



(Adaptado de KRIER et al, 2005)

Na literatura, compostos que contém o anel piridazinona mostraram efeitos antidiabético, antiinflamatório, analgésico, antiplaquetário, broncodilatador e anti-hipertensivo, além de propriedades inotrópica positiva, cardiotônica e vasodilatadora, através da inibição de PDEs (AKHTAR et al, 2016; BANOGLU et al, 2004; CHEN et al, 1997; DUBEY; BHOSLE, 2015; VAN DER MEY et al, 2003). Inclusive, foram desenvolvidos fármacos derivados da piridazinona, tais como: minaprina, como antidepressivo; emorfazona, como antiinflamatório; e indolidan, pimobendan e levosimendan, como anti-hipertensivos (DUBEY; BHOSLE, 2015).

AAL 195 foi submetido a ensaios de *binding* e modelagem molecular, onde demonstrou possuir alta potência inibitória para a PDE4 ($CI_{50} = 2 \mu M$) (KRIER et al, 2005). Após a análise da relação estrutura-atividade das moléculas sintetizadas, AAL 195 mostrou-se mais seletivo à PDE4 em relação às demais estudadas (ARAÚJO-JÚNIOR et al, 2015). Sendo assim, AAL 195 pode ser considerado um potente e seletivo inibidor de PDE4.

Estudos prévios mostraram que AAL 195 promove efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar (normotensos). Esse efeito mostrou-se independente de endotélio vascular e parece envolver a ativação de canais para K^+ , bem como a redução do Ca^{2+} via inibição do influxo de Ca^{2+} extracelular e inibição da mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (SILVA, 2017). No entanto, não há estudos que avaliem o efeito desse composto em um modelo experimental de hipertensão.

Com base nisso, somado ao conhecimento dos efeitos benéficos que inibidores de PDE4 podem ter sobre o sistema cardiovascular, o objetivo desse estudo é avaliar as ações de AAL 195 sobre o sistema cardiovascular de ratos hipertensos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos por AAL 195 em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), bem como elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos.

3.2 Objetivos Específicos

- Testes *in vivo*:
 - Caracterizar os efeitos agudos de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados;
 - Elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos agudos induzidos por AAL 195;
 - Avaliar os efeitos subagudos da administração oral de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR.
- Testes *in vitro*:
 - Investigar o efeito vasorrelaxante de AAL 195 em ratos SHR e o papel do endotélio vascular e nesse efeito;
 - Avaliar a influência dos íons K^+ no efeito promovido por AAL 195;
 - Avaliar a influência dos íons Ca^{2+} e de sua liberação intracelular no efeito promovido por AAL 195;
 - Avaliar a influência da PKA no efeito promovido por AAL 195.

4 MATERIAL

4.1 Animais

Foram utilizados 150 ratos machos SHR (*Rattus norvegicus*), todos com peso em torno de 250-300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, lotado no Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF-UFAL), sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas, e tendo livre acesso à água e a alimentação. Os protocolos realizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFAL, nº: 15/2018 (Anexo A).

4.2 Substâncias Utilizadas

Na realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes substâncias: L-NAME, Indometacina, Atropina, Nifedipina, Propranolol, Nitroprussiato de Sódio, Cloridrato de Fenilefrina (FEN), Cloridrato de Acetilcolina (ACh), Cafeína, Glibenclamida (GLIB), 4-aminopiridina (4-AP), Apamina, S(-)-Bay K 8644, Tapsigargina, KT 5720 e Cremofor - todas obtidos da Sigma-Aldrich® Brazil – e Tetraetilamônio, obtido da Fluka®. Para a preparação das soluções estoques, a Indometacina foi dissolvida juntamente com bicarbonato de sódio (NaHCO_3), a GLIB e a Tapsigargina foram dissolvidas em DMSO e as demais soluções estoque foram dissolvidas em solução salina a 9% para os experimentos *in vivo* e em água destilada para os experimentos *in vitro*. Todas as soluções foram mantidas entre 0 a 4 °C e somente retiradas no momento do experimento.

4.3 Preparação das Soluções de AAL 195

AAL 195 foi solubilizado em cremofor (3% por mL de solução) e diluído em solução salina a 9% para os experimentos *in vivo* e em água destilada na concentração de 10^{-1} M para os experimentos *in vitro*. As soluções foram estocadas a 0 °C, sendo novamente diluídas de acordo com a necessidade de

cada protocolo experimental. A concentração final de cremofor utilizada nesse estudo foi desprovido de efeito farmacológico (dados não mostrados).

4.4 Soluções Fisiológicas

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e EDTA. Na tabela 4 estão listadas as composições das soluções utilizadas:

Tabela 4 – Composição das soluções nutritivas (pH 7,4).

Sal	Soluções (mM)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
NaCl	158,3	158,3	158,3	102,3	102,3	102,3	142,3	83,3
KCl	4,0	4,0	4,0	60,0	60,0	60,0	20,0	80,0
CaCl_2	2,0	-	-	2,0	-	-	2,0	2,0
MgCl_2	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05
NaHCO_3	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
NaH_2PO_4	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
NaH_2PO_4	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
EDTA	-	-	10	-	-	10	-	-

Solução 1: Solução nutritiva Tyrode

Solução 2: Solução nutritiva Tyrode nominalmente sem cálcio

Solução 3: Solução nutritiva Tyrode livre de cálcio

Solução 4: Solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 60 mM

Solução 5: Solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 60 mM nominalmente sem cálcio

Solução 6: Solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 60 mM livre de cálcio

Solução 7: Solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 20 mM

Solução 8: Solução nutritiva Tyrode despolarizante com KCl a 80 mM

Fonte: Adaptado de TANAKA; MOCHIZUKI; SHIGENOBU, 1999

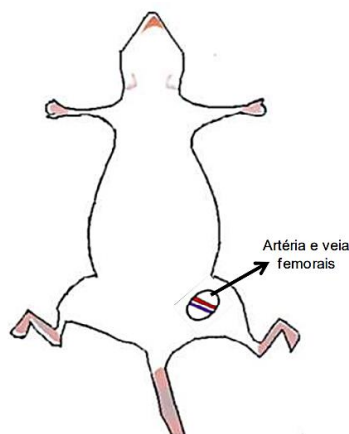
5 MÉTODOS

5.1 Ensaios Farmacológicos *in vivo*

5.1.1 Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos SHR não anestesiados

Os animais foram anestesiados (cetamina 80 mg/Kg + xilazina 4 mg/Kg i.p.), e cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), preenchidos com solução salina heparinizada (1: 10 v/v), foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente (Figura 5). Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (scapulae).

Figura 5 – Representação esquemática dos vasos onde foram implantados os cateteres para registro dos parâmetros cardiovasculares e administração das substâncias.



Fonte: QUEIROZ, 2011

A PA e a FC foram medidas 24h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (BLPR, AECAD, São Paulo, Brasil) pré-calibrado, acoplado a um amplificador (Modelo 04P, AECAD, Brasil) e conectado a um microcomputador equipado com placa conversora analógico-digital e com o programa AQCAD (AQCAD, Brasil) (Figura 6). A

frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 200 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). O cateter venoso foi implantado para a administração das substâncias.

Figura 6 – Sistema de aquisição de dados para medida de PA e FC em ratos não anestesiados.



Fonte: AUTORA, 2022

5.1.2 Estudos de medida direta de PA e FC

5.1.2.1 Efeito de AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados

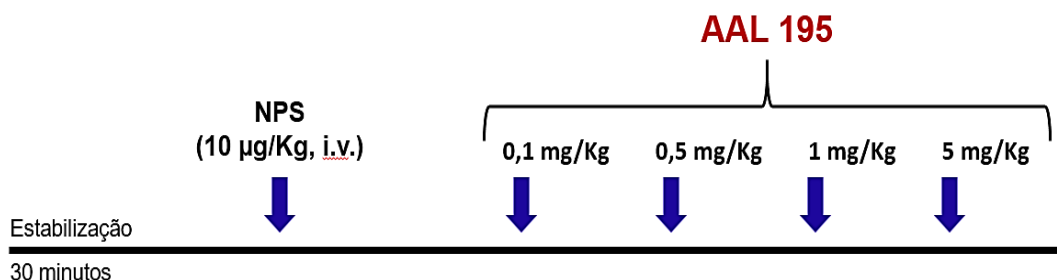
Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de, no mínimo, 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida foi administrado nitroprussiato de sódio (10 $\mu\text{g/kg}$, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 minutos, doses crescentes de AAL 195 (0,1; 0,5, 1 e 5 mg/Kg) foram administrados randomicamente pela via endovenosa *in bolus* com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base (Figura 7).

Os valores de PA e FC foram computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração de AAL 195. As variações dos parâmetros hemodinâmicos foram expressas em porcentagem para cada dose, calculadas através das seguintes equações:

$$\text{Resposta PA (\%)} = \frac{(\text{PA depois} - \text{PA antes}) \times 100}{\text{PA antes}}$$

$$\text{Resposta FC (\%)} = \frac{(\text{FC depois} - \text{FC antes}) \times 100}{\text{FC antes}}$$

Figura 7 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.

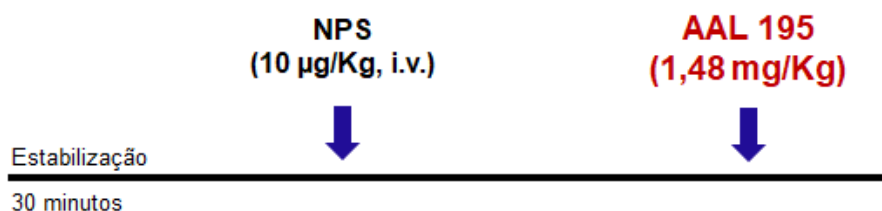


Fonte: AUTORA, 2022

5.1.2.2 Efeito da DE₅₀ de AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados

Após a curva dose-resposta obtida no item 5.1.2.1, foi calculada a DE₅₀ (dose que produz 50% do efeito máximo) de AAL 195 com base no efeito hipotensor promovido por esse composto. A dose estabelecida foi de 1,48 mg/kg. Desta forma, mudanças na PAM e na FC foram comparadas antes (valores basais) e após a administração da DE₅₀ de AAL 195 (Figura 8).

Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos cardiovasculares da DE₅₀ de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.

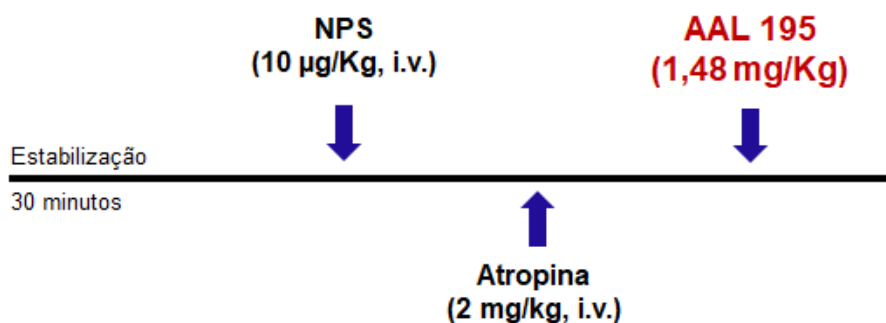


Fonte: AUTORA, 2022

5.1.2.3 Verificação da participação muscarínica no efeito induzido por AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados

Após um registro controle obtido como descrito no item 5.1.2.1, os animais foram tratados com atropina (2 mg/kg, i.v.), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (MITCHELSON, 1984). Após 30 minutos, a DE₅₀ de AAL 195 foi administrada. Mudanças na PAM e na FC induzidas por AAL 195 foram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com atropina (Figura 9).

Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência dos receptores muscarínicos nos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.

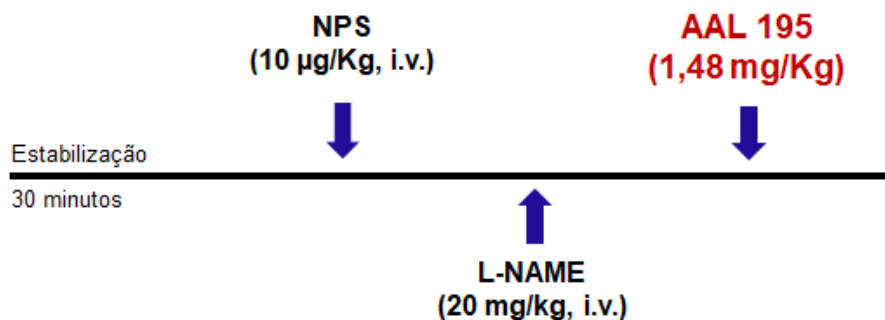


Fonte: AUTORA, 2022

5.1.2.4 Verificação da participação do óxido nítrico (NO) no efeito induzido por AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados

Após um registro controle obtido como descrito no item 5.1.2.1, os animais foram tratados com L-NAME (20 mg/kg, i.v.), um inibidor competitivo da sintase do NO (MONCADA; HIGGS, 1993). Após 30 minutos, a DE₅₀ de AAL 195 foi administrada. Mudanças na PAM e na FC induzidas por AAL 195 foram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com L-NAME (Figura 10).

Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência do óxido nítrico nos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.

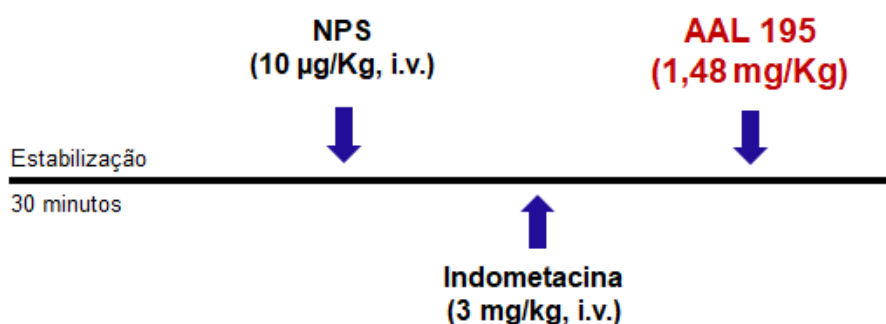


Fonte: AUTORA, 2022

5.1.2.5 Verificação da participação das prostaciclina (PGI₂) no efeito induzido por AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados

Após um registro controle obtido como descrito no item 5.1.2.1, os animais foram tratados com indometacina (3 mg/kg, i.v.), um inibidor da ciclooxygenase (COX) (CLARK; FUCHS, 1997). Após 30 minutos, a DE₅₀ de AAL 195 foi administrada. Mudanças na PAM e na FC induzidas por AAL 195 foram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com indometacina (Figura 11).

Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência das prostaciclina nos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.

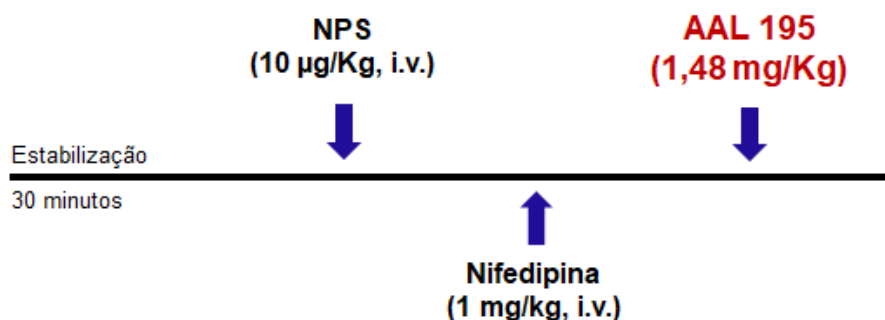


Fonte: AUTORA, 2022

5.1.2.6 Verificação da participação dos canais de cálcio sensíveis a diidropiridinas no efeito induzido por AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados

Após um registro controle obtido como descrito no item 5.1.2.1, os animais foram tratados com nifedipina (1 mg/kg, i.v.), um bloqueador seletivo dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem tipo-L sensíveis a diidropiridinas (HAGIWARA; MITSUI; KARAKI, 1993; TYKOCKI; BOERMAN; JACKSON, 2017). Após 30 minutos, a DE_{50} de AAL 195 foi administrada. Mudanças na PAM e na FC induzidas por AAL 195 foram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com nifedipina (Figura 12).

Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência dos canais de Ca^{2+} tipo-L sensíveis a diidropiridinas nos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.

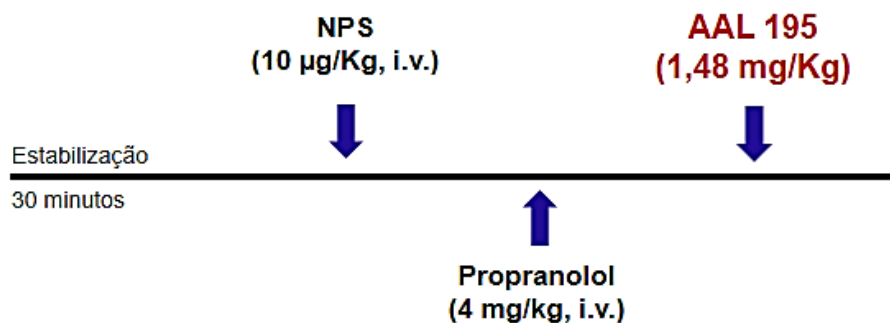


Fonte: AUTORA, 2022

5.1.2.7 Verificação da participação dos receptores β -adrenérgicos no efeito induzido por AAL 195 na PA e FC de ratos SHR não anestesiados

Após um registro controle obtido como descrito no item 5.1.2.1, os animais foram tratados com propranolol (4 mg/kg, i.v.), um bloqueador não seletivo dos receptores β -adrenérgicos (HAGIWARA; MITSUI; KARAKI, 1993; TYKOCKI; BOERMAN; JACKSON, 2017). Após 30 minutos, a DE_{50} de AAL 195 foi administrada. Mudanças na PAM e na FC induzidas por AAL 195 foram comparadas antes (valores basais) e após o tratamento com propranolol (Figura 13).

Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência dos receptores β -adrenérgicos nos efeitos cardiovasculares de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados.

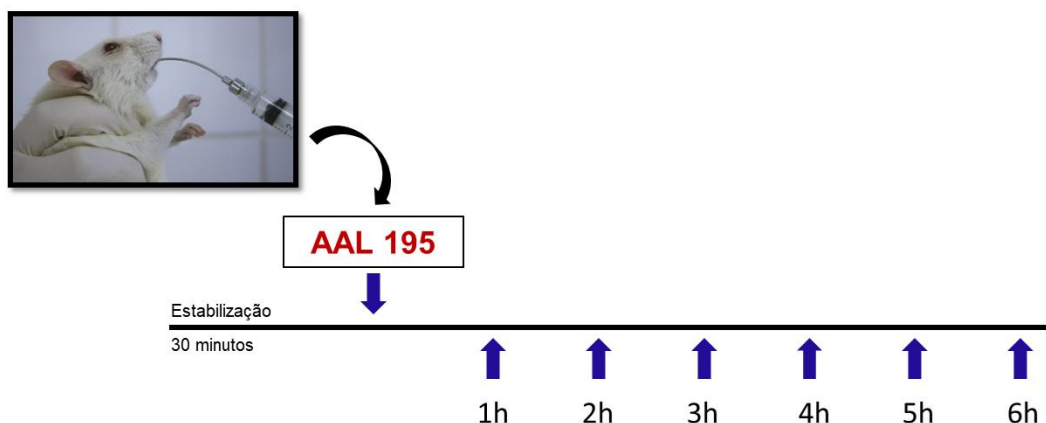


Fonte: AUTORA, 2022

5.1.2.8 Efeito subagudo da administração oral de AAL 195 sobre a PAS e a FC de ratos SHR

Os efeitos subagudos induzidos pela administração oral de AAL 195 foram avaliados de acordo com Galicia e colaboradores (2008). Os ratos SHR foram divididos em três grupos: a) SHR tratados com dose única de 1 mg/kg, V.O. de AAL 195, b) SHR tratados com dose única de 5 mg/kg, V.O. de AAL 195 e c) SHR tratados com dose única de 10 mg/kg, V.O. de AAL 195. Para isto, valores da PAS e FC foram registrados antes (valores de base) e durante 6 horas após o tratamento. A porcentagem de redução da PAS e da FC foi calculada. Os valores de base foram considerados como 100% da atividade (Figura 14). Os efeitos da administração das doses de AAL 195 foram comparados com aqueles obtidos antes da administração do composto.

Figura 14 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos subagudos induzidos pela administração oral de AAL 195.



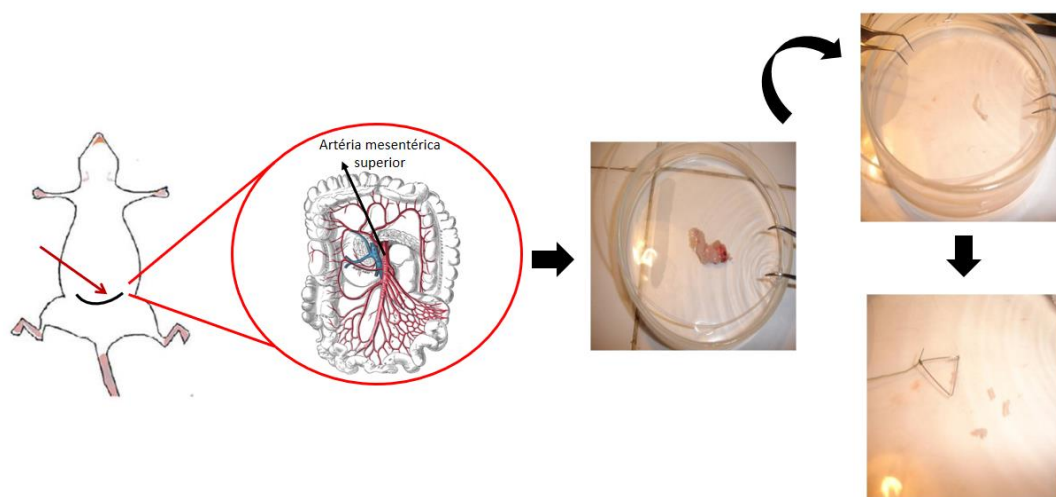
Fonte: AUTORA, 2022

5.2 Ensaios Farmacológicos *in vitro*

5.2.1 Preparações de Artéria Mesentérica Superior Isolada de Rato SHR Com ou Sem Endotélio Funcional

Os ratos foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia. Através de uma incisão no abdômen do animal, a artéria mesentérica superior foi identificada, removida, dissecada para a remoção de todo o tecido conectivo e adiposo, e seccionada em anéis (1 – 2 mm) (Figura 15). Os anéis da artéria foram inseridos em hastes metálicas, suspensos por fios de algodão num transdutor de força.

Figura 15 – Representação esquemática da retirada da artéria mesentérica superior, da retirada do tecido conectivo e adiposo, da secção em anéis e inserção em hastes metálicas.



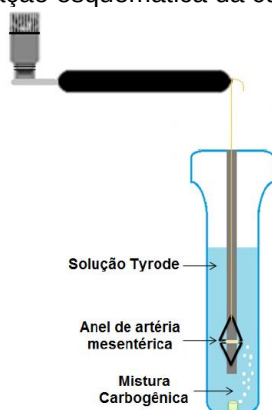
Fonte: Compilação da autora¹

As preparações foram mantidas em uma cuba para órgãos isolados contendo 5 mL de solução nutritiva Tyrode (pH = 7,4), aerada com uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), a uma temperatura de 37 °C (Figura 16). O registro da tensão isométrica do músculo foi realizado através do transdutor de força (AECAD 1604, AVS Projetos, Brasil), acoplado a um sistema de aquisição de dados (AQCAD, AVS Projetos, Brasil) (Figura 17).

¹ Montagem a partir de imagem de domínio público coletada no site Wikipédia e imagens adaptadas de OLIVEIRA, 2008 e QUEIROZ, 2011.

Os anéis foram submetidos a uma tensão constante de 0,5 g por um período de estabilização de 1 hora. Durante esse tempo a solução nutritiva foi substituída a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Figura 16 – Representação esquemática da cuba para órgãos isolados.



Fonte: MACHADO, 2013

Figura 17 – Aparato utilizado para registros de tensões isométricas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.



Fonte: SILVA, 2017

Para avaliar a presença do endotélio funcional intacto, foi induzida uma contração com 10 μ M de fenilefrina (FEN) e, após o platô, foi adicionado 10 μ M de acetilcolina (ACh) ao meio. Foram considerados anéis com endotélio funcional quando o vasorrelaxamento foi maior ou igual a 70% da contração e sem endotélio, aqueles que promoviam vasorrelaxamento menor ou igual a 10% da contração.

5.2.2 Protocolos Experimentais Utilizando Anéis de Artéria Mesentérica Superior de Rato SHR

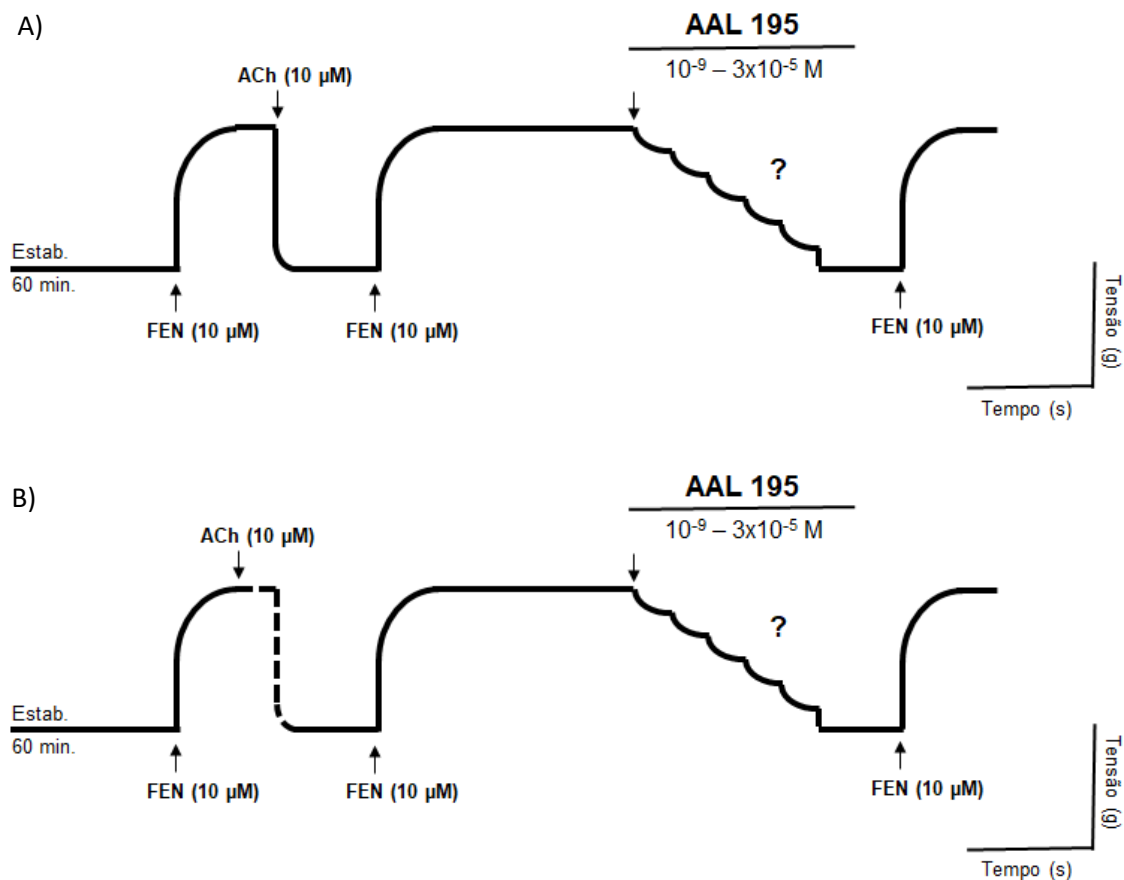
5.2.2.1 Avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contraídos com FEN

Após a verificação da integridade do endotélio funcional, como descrito no item 5.2.1, uma nova contração com FEN (10 μ M) foi induzida. Após atingir o platô, esperou-se um período de 40 minutos para a estabilização da contração e foram adicionadas concentrações crescentes de AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M), de maneira cumulativa, tanto em anéis com endotélio como em anéis sem endotélio (Figura 18). Em seguida, para avaliar um possível dano tecidual induzido por AAL 195, foram realizadas lavagens sucessivas com solução Tyrode, esperando-se um novo período de estabilização, e uma nova contração com FEN (10 μ M) foi obtida.

5.2.2.2 Avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sobre o tônus vascular intrínseco

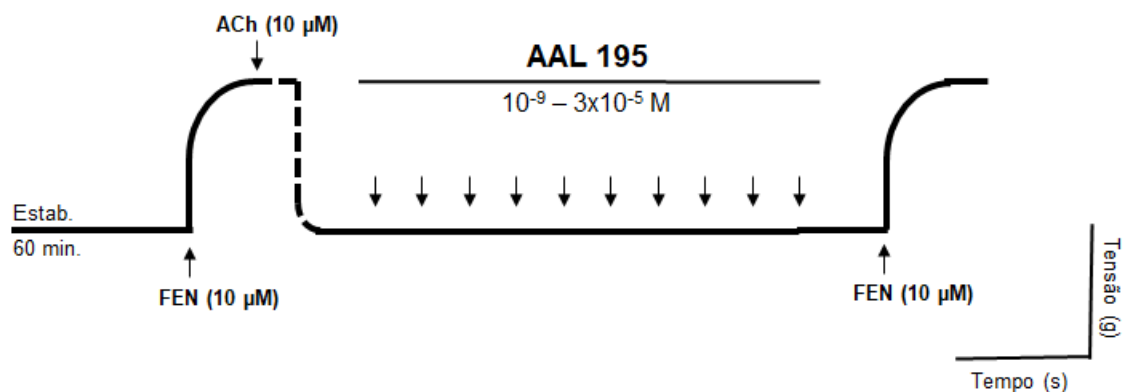
Após a verificação da integridade do endotélio funcional, como descrito no item 5.2.1, as preparações foram lavadas com solução Tyrode até atingirem o tônus basal. A partir desse ponto, concentrações crescentes de AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) foram adicionadas às preparações sobre o tônus basal com a finalidade de avaliar o efeito de AAL 195 sobre o tônus muscular espontâneo (Figura 19). Em seguida, avaliou-se um possível dano tecidual, como descrito anteriormente, para demonstrar a completa recuperação do órgão.

Figura 18 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contraindidos com FEN, com endotélio (A) ou sem endotélio (B) vascular.



Fonte: AUTORA, 2022

Figura 19 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, no tônus muscular espontâneo e posteriormente à recuperação do órgão.

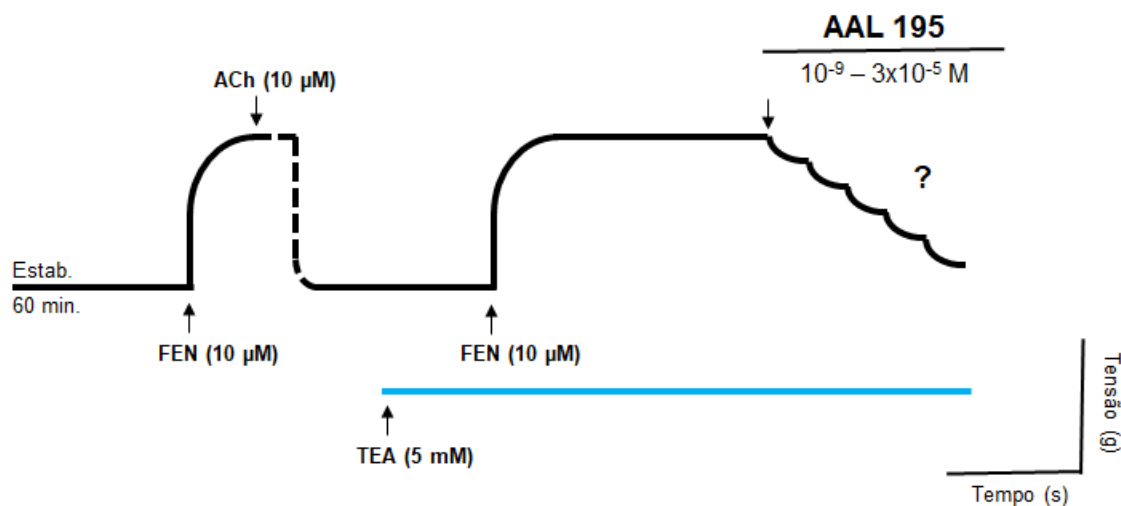


Fonte: AUTORA, 2022

5.2.2.3 Avaliação da participação de canais para K⁺ no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Após a verificação da ausência do endotélio, como descrito no item 5.2.1, as preparações foram incubadas com 5 mM de TEA, um bloqueador não seletivo de canais para K⁺. Após 30 minutos, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (10 µM) e, em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa para o AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) foi obtida (Figura 20).

Figura 20 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contraídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com TEA (5 mM).



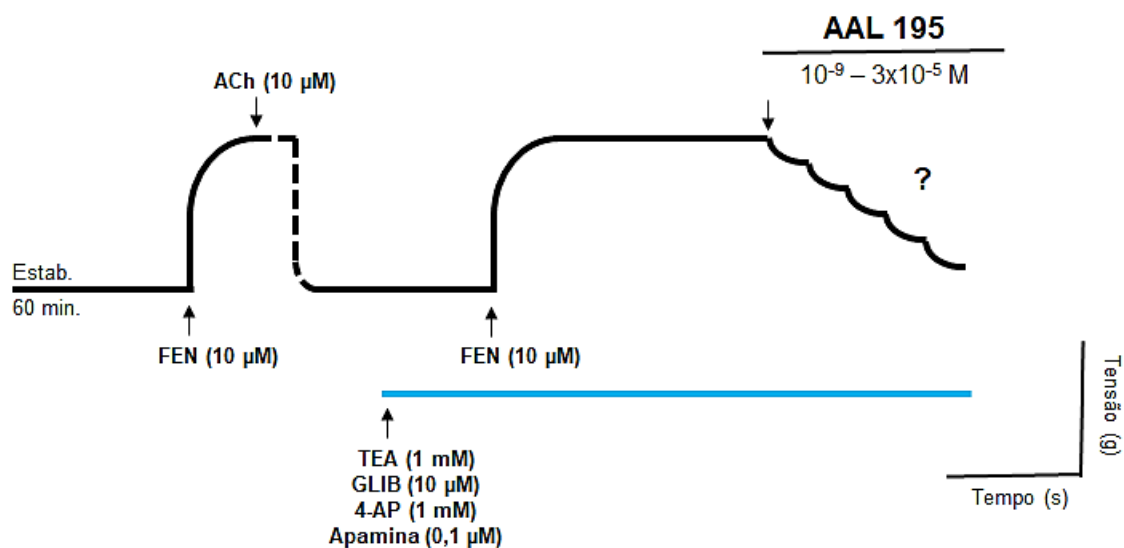
Fonte: AUTORA, 2022

5.2.2.4 Identificação dos canais para K⁺ envolvidos no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Após a verificação da ausência do endotélio, como descrito no item 5.2.1, as preparações foram incubadas separadamente com 1 mM de TEA, que nesta concentração é considerado um bloqueador de canais BK_{Ca} (GARCIA; KACZOROWSKI, 1992), com 10 µM de GLIB, um bloqueador seletivo de canais K_{ATP} (HUANG; KWOK, 1997; MOMBOULI; VANHOUTTE, 1997), com 1 mM de 4-AP, um bloqueador dos canais K_v (OKABE; KITAMURA; KURIYAMA, 1987) ou

com 0,1 μM de Apamina, um bloqueador seletivo de canais SK_{Ca} . Após 30 minutos, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (10 μM) e, em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa para o AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) foi obtida (Figura 21).

Figura 21 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contráidos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com TEA (1 mM), GLIB (10 μM), 4-AP (1 mM) ou Apamina (0,1 μM).

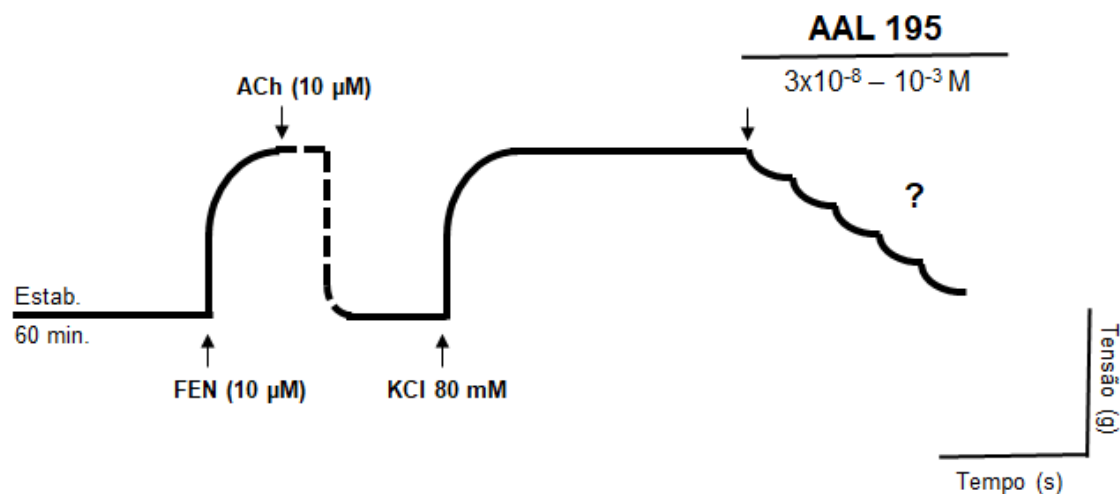


Fonte: AUTORA, 2022

5.2.2.5 Avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contráidos com solução Tyrode com KCl a 80 mM

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito no item 5.2.1, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado por uma solução Tyrode com KCl a 80 mM. Durante a fase tônica da contração foi obtida uma curva concentração-resposta cumulativa para o AAL 195 (3×10^{-8} – 10^{-3} M) (Figura 22).

Figura 22 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contráidos com solução despolarizante Tyrode (KCl 80 mM), sem endotélio vascular.

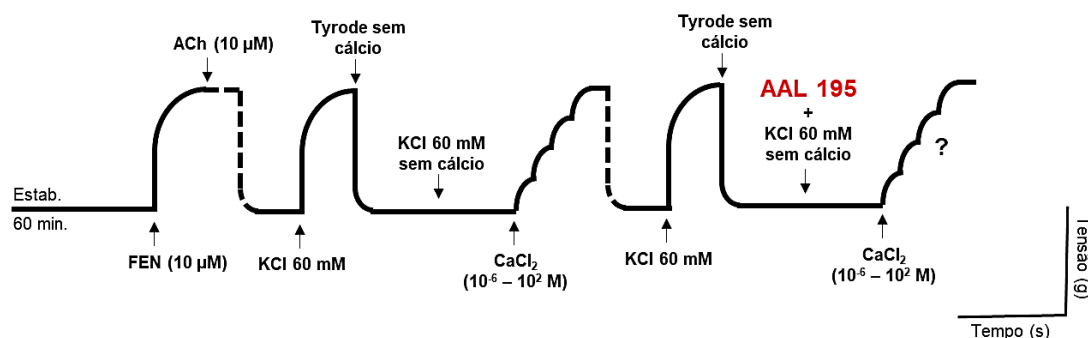


Fonte: AUTORA, 2022

5.2.2.6 Avaliação do efeito de AAL 195 sobre o influxo de cálcio extracelular

Em anéis sem endotélio funcional, o Tyrode foi substituído pela solução despolarizante com KCl a 60 mM (curva padrão). As preparações foram lavadas com solução Tyrode nominalmente sem Ca^{2+} e nela mantidas por 15 minutos. Em seguida, os anéis foram expostos a solução despolarizante de KCl 60 mM nominalmente sem Ca^{2+} por 15 minutos, e uma curva concentração-resposta foi obtida pela adição cumulativa de CaCl_2 (10^{-6} - 10^{-2} M) ao meio. AAL 195 (3×10^{-5} ; 10^{-4} e 10^{-3} M), em preparações individuais, foi incubado por 15 minutos. Logo após foi obtida uma nova curva cumulativa ao CaCl_2 (Figura 23). Os resultados foram analisados comparando-se os efeitos máximos ($E_{\text{máx}}$) das curvas com CaCl_2 na ausência (controle) e na presença das diferentes concentrações do AAL 195.

Figura 23 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar o efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sobre o influxo de cálcio extracelular.



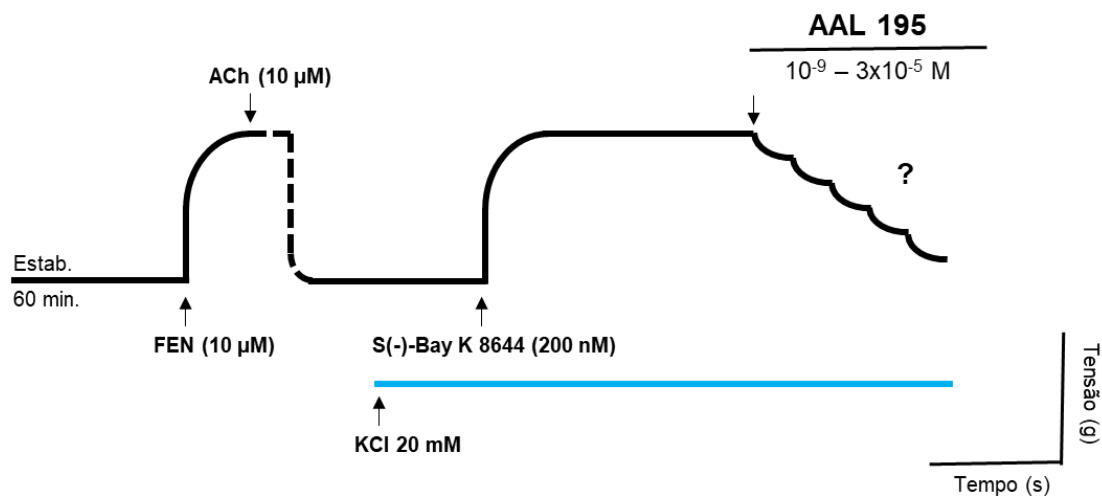
Fonte: AUTORA, 2022

5.2.2.7 Avaliação do efeito de AAL 195 sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644, um ativador dos canais para cálcio sensíveis a voltagem do tipo-L

Para avaliar o efeito de AAL 195 sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas do tipo-L, em anéis de artéria mesentérica superior de rato, sem o endotélio funcional, foi utilizado o S(-)-Bay K 8644, um ativador dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas (ADACHI-AKAHANER; CLEEMANN; MORAD, 1999). Devido uma despolarização parcial ser necessária para a obtenção da resposta ao S(-)-Bay K 8644, a resposta contrátil a esse agonista foi obtida em meio contendo KCl 20 mM (DAVIE; KUBO; STANDEN, 1998).

Após a verificação da ausência do endotélio, as preparações foram expostas a uma solução despolarizante de KCl 20 mM durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado o S(-)-Bay K 8644 (200 nM) e após a contração sustentada ter sido alcançada, concentrações crescentes do AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) foram adicionadas a cuba de maneira cumulativa (Figura 24).

Figura 24 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, sem endotélio funcional, pré-contráídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM).

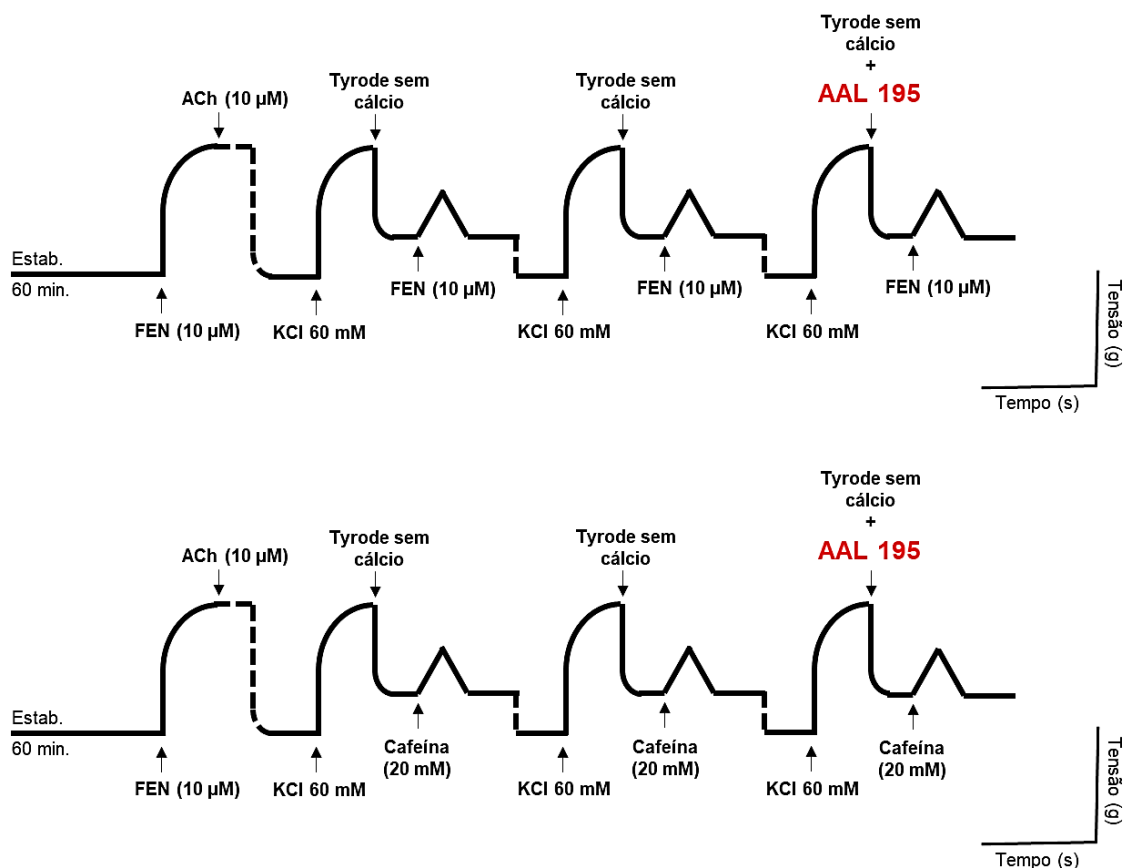


Fonte: AUTORA, 2022

5.2.2.8 Avaliação do efeito de AAL 195 sobre a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares

Este protocolo objetivou investigar os efeitos de AAL 195 sobre as contrações induzidas pela liberação de Ca^{2+} intracelular, utilizando anéis sem endotélio funcional. Após um período de estabilização de 30 minutos, os anéis mesentéricos foram expostos à solução Tyrode com KCl à 60 mM por 3 minutos. Estas preparações foram lavadas com solução Tyrode livre de Ca^{2+} por 2 minutos e em seguida 10 µM de FEN (banho à temperatura de 37 °C) ou 20 mM de cafeína (banho à temperatura de 21 °C) foram adicionados. Este procedimento foi repetido para a obtenção de duas contrações transientes similares ao agonista. AAL 195 foi então acrescentado ao meio e depois de 2 minutos, FEN (10 µM) ou cafeína (20 mM) foram adicionadas novamente (Figura 25).

Figura 25 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sobre a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares. Agonistas: (A) FEN e (B) cafeína.

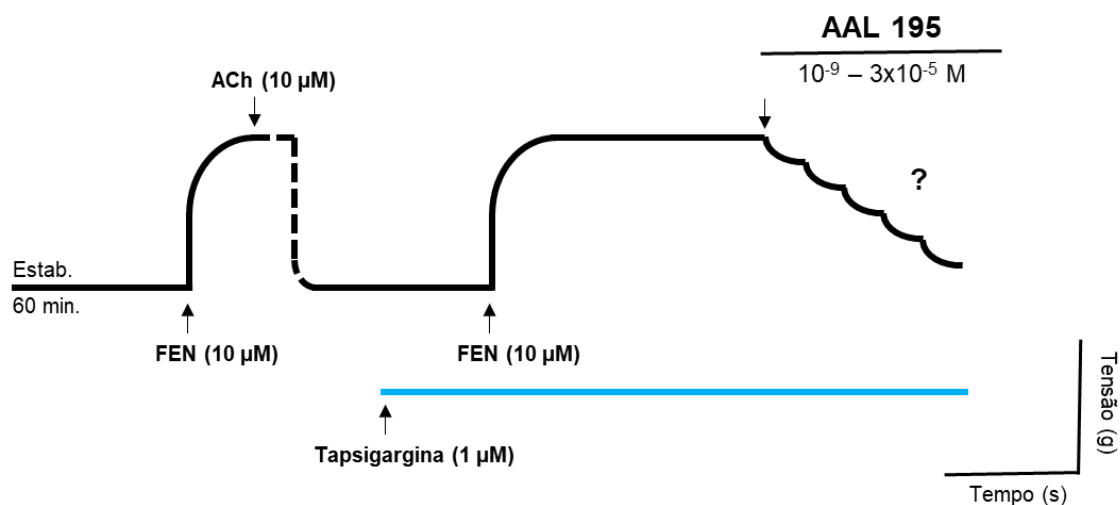


Fonte: AUTORA, 2022

5.2.2.9 Avaliação da participação da SERCA no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Após a verificação da ausência do endotélio, como descrito no item 5.2.1, as preparações foram incubadas com 1 µM de Tapsigargina, um inibidor da SERCA (CERON; BENDHACK, 1998). Após 30 minutos, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (10 µM) e, em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa para o AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) foi obtida (Figura 26).

Figura 26 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contráídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com Tapsigargina (1 μ M).

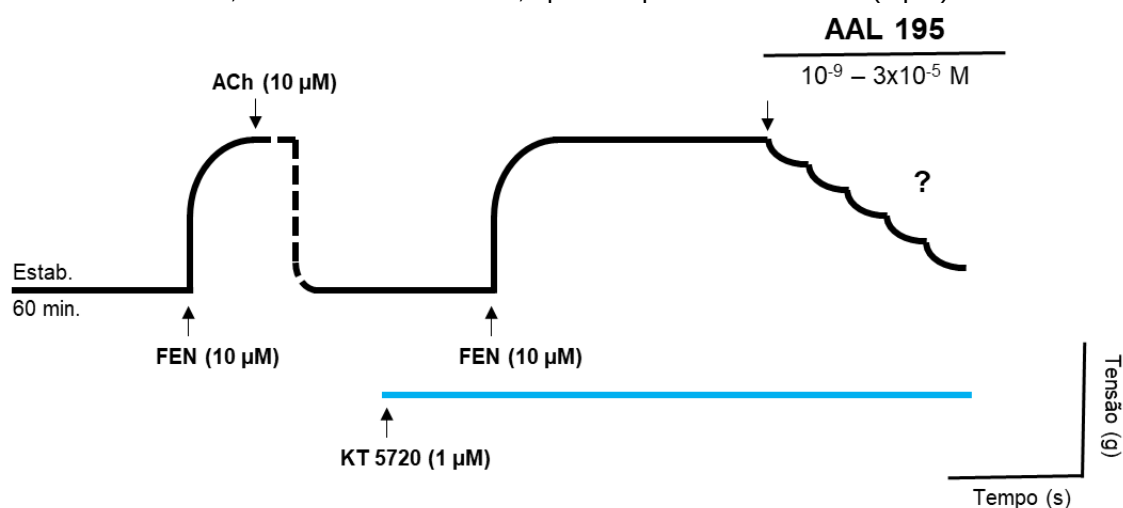


Fonte: AUTORA, 2022

5.2.2.10 Avaliação da participação da PKA no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Após a verificação da ausência do endotélio, como descrito no item 5.2.1, as preparações foram incubadas com 1 μ M de KT 5720, um inibidor da PKA (LIN et al, 2010). Após 30 minutos, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (10 μ M) e, em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa para o AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) foi obtida (Figura 27).

Figura 27 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, pré-contráídos com FEN, sem endotélio vascular, após bloqueio com KT 5720 (1 μ M).



Fonte: AUTORA, 2022

5.3 Análise Estatística

Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). Para avaliar a significância das diferenças entre as médias foram utilizados o teste *t* de *Student* ou análise de variância (ANOVA) “one way” para amostras não pareadas, seguida do pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Para estudar os efeitos hemodinâmicos agudos de AAL 195 foi calculada a DE_{50} através de uma curva de regressão não linear.

Para avaliar o efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 dois parâmetros farmacológicos foram analisados: o $E_{m\acute{a}x}$ (média percentual do efeito máximo induzido pela substância) e pD_2 (logaritmo negativo da concentração da droga que produz 50% do efeito máximo, $-\log CE_{50}$), que representam, respectivamente, a eficácia e a potência farmacológica.

A análise estatística e plotagem dos gráficos foram realizados no programa GraphPad Prism 5.02[®].

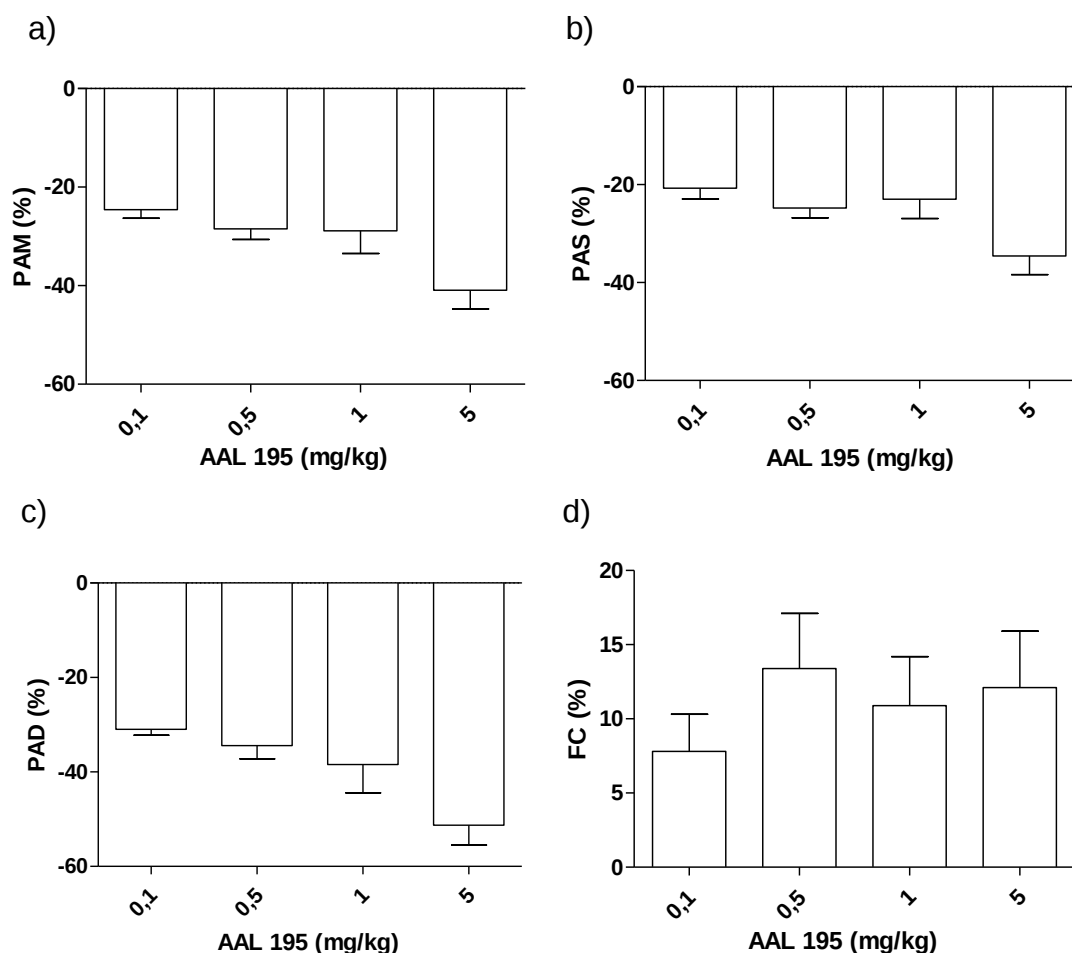
6 RESULTADOS

6.1 Estudos Farmacológicos com AAL 195 *in vivo*

6.1.1 Efeito do AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados

AAL 195 (0,1; 0,5; 1; 5 mg/Kg, i.v.) reduziu a PAM ($-24,6 \pm 1,7$ %; $-28,5 \pm 2,1$ %; $-28,9 \pm 4,6$ %; $-40,9 \pm 3,8$ %, respectivamente), PAS ($-20,7 \pm 2,2$ %; $-24,8 \pm 2,0$ %; $-23,0 \pm 3,9$ %; $-34,6 \pm 3,8$ %, respectivamente) e PAD ($-31,0 \pm 1,2$ %; $-34,4 \pm 2,8$ %; $-38,4 \pm 6,0$ %; $-51,3 \pm 4,2$ %, respectivamente), associada a taquicardia ($7,8 \pm 2,5$ %; $13,4 \pm 3,7$ %; $10,9 \pm 3,3$ %; $12,1 \pm 3,8$ %, respectivamente), de maneira independente de dose (Figura 28).

Figura 28 – Efeitos da administração aguda de doses crescentes de AAL 195 sobre a PAM (a), PAS (b), PAD (c) e FC (d) de ratos SHR não-anestesiados (n=5). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m.



6.1.2 Efeito da DE₅₀ do AAL 195 sobre a PAM e FC de ratos SHR não anestesiados

A DE₅₀ de AAL 195 (1,48 mg/Kg, i.v.) promoveu hipotensão (PAM = $-44,7 \pm 3,5$ %), e taquicardia ($34,5 \pm 5,7$ %) (Figura 30). O tempo de reestabelecimento dos parâmetros basais foi de aproximadamente 28,5 minutos.

Figura 29 - Registro original do efeito do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a pressão arterial de ratos SHR não-anestesiados.

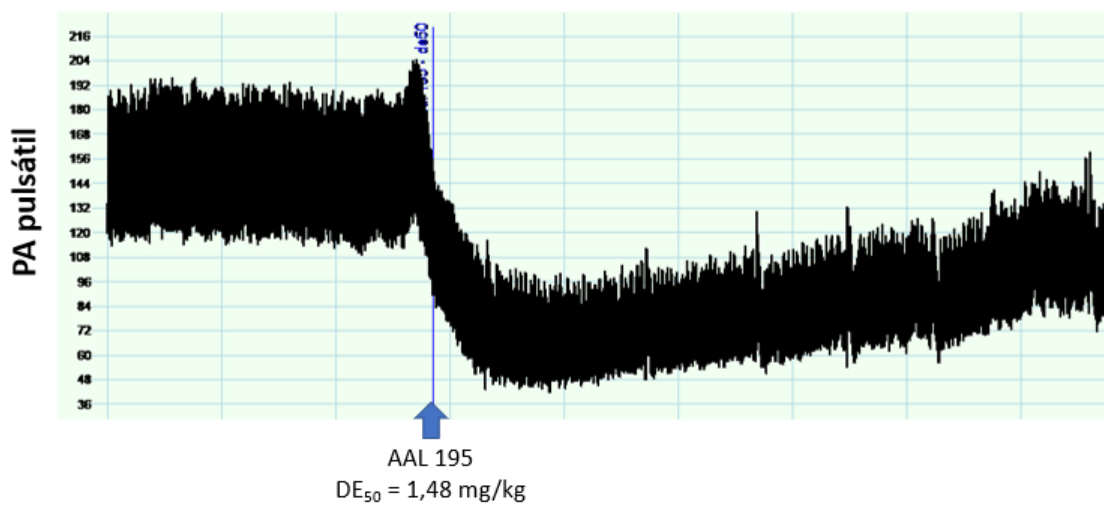
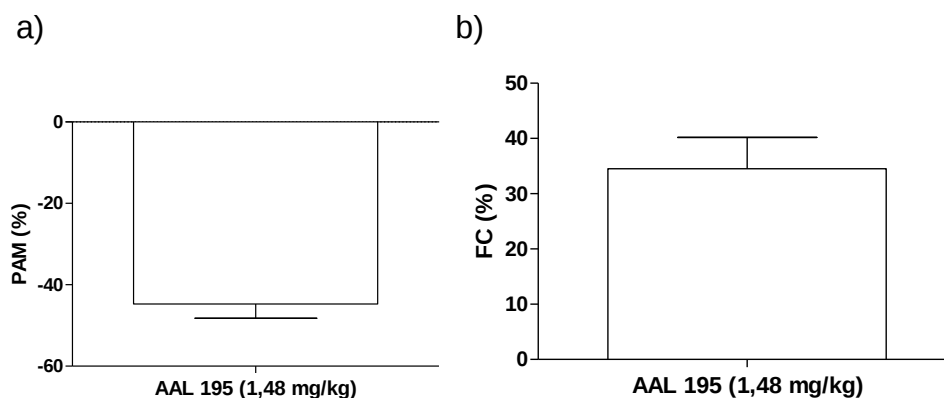


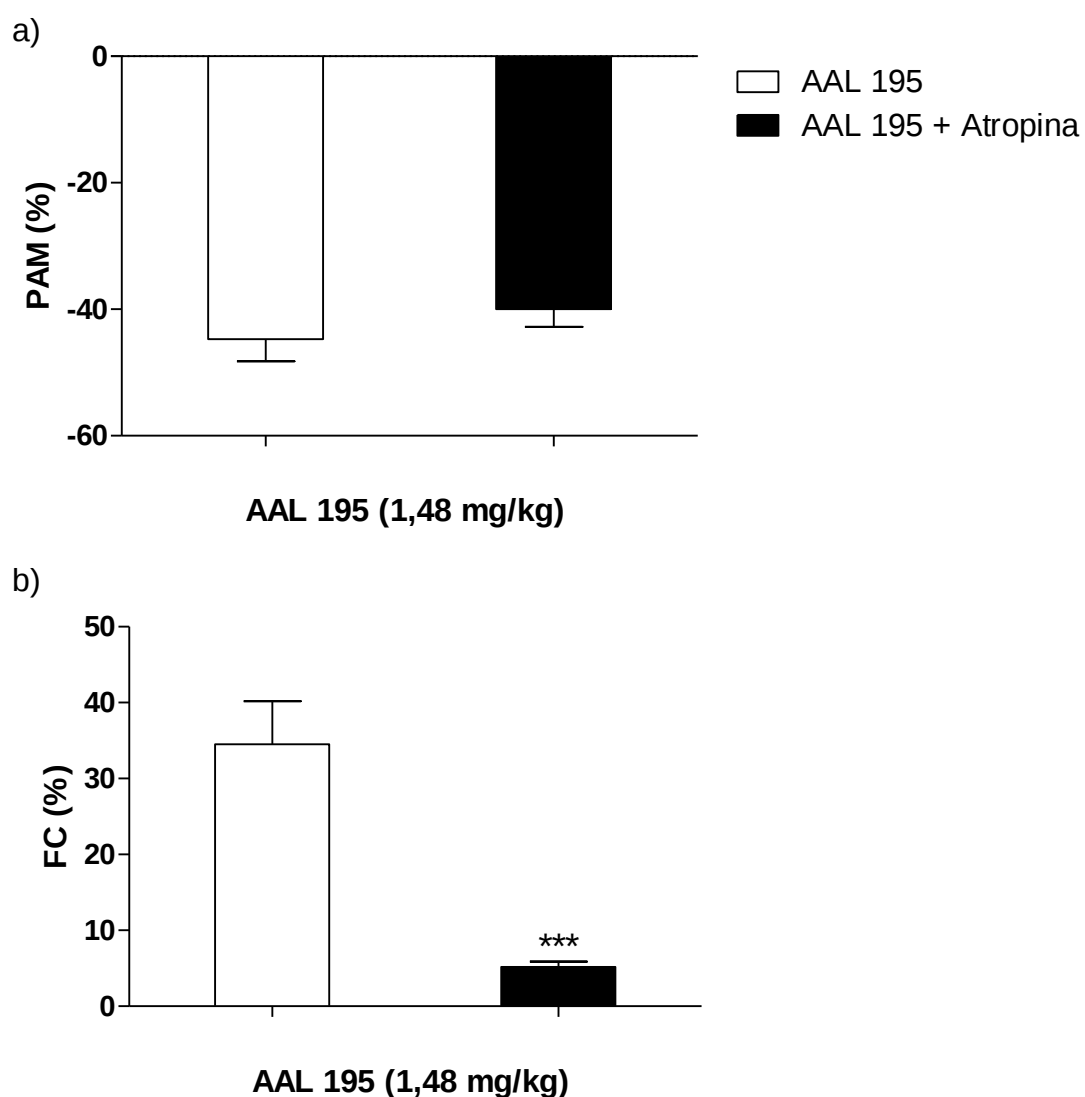
Figura 30 - Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m.



6.1.3 Participação dos receptores muscarínicos na resposta induzida por AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados

Após a administração da atropina (2 mg/Kg, i.v), não houve alteração na resposta hipotensora promovida por AAL 195 ($-40,0 \pm 2,8 \%$), no entanto o efeito taquicárdico foi atenuado de maneira significativa ($5,2 \pm 0,7 \%$) (Figura 31).

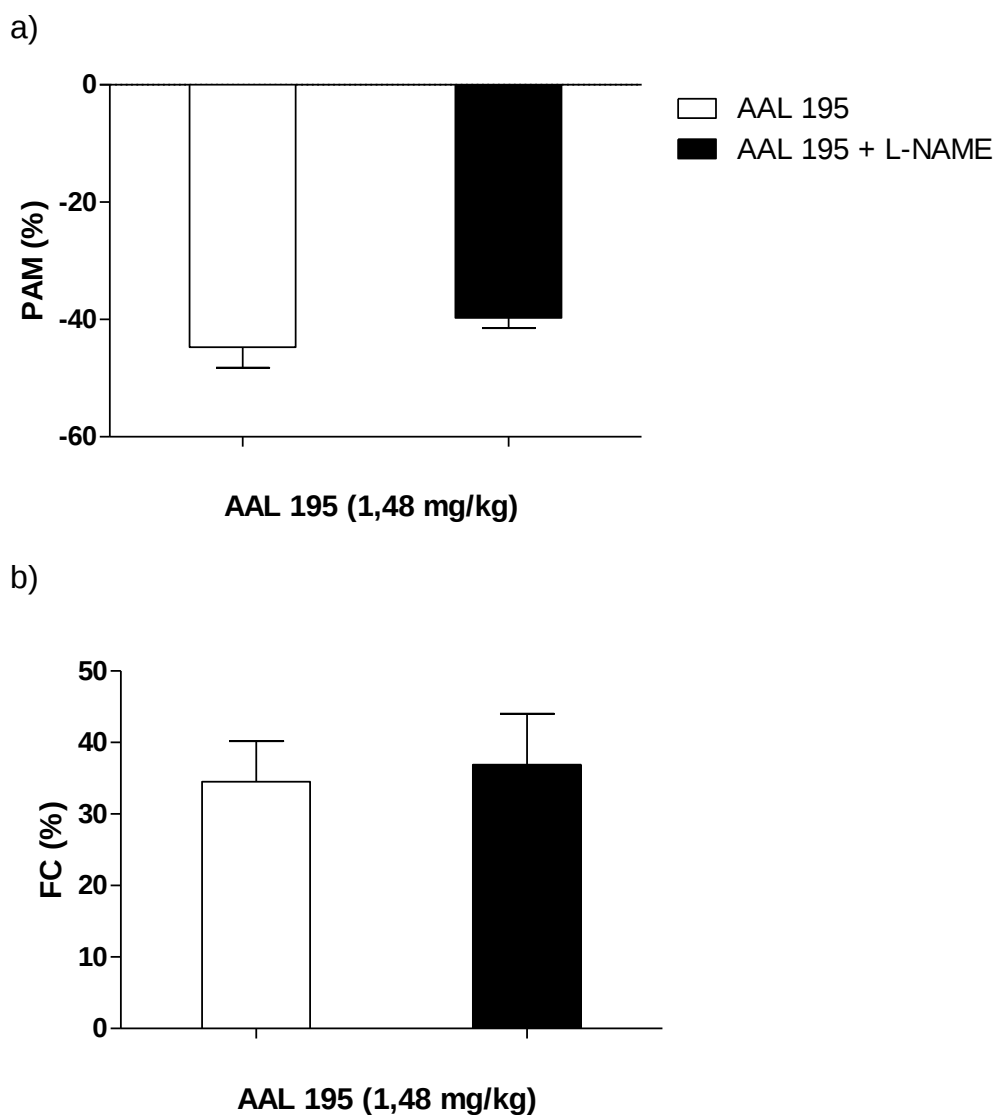
Figura 31 - Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5) antes e após o tratamento com atropina. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. ** $p < 0,01$ em relação a ausência do tratamento.



6.1.4 Participação do NO na resposta induzida por AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados

Após a administração do L-NAME (20 mg/Kg, i.v), o efeito hipotensor ($-39,7 \pm 1,8$ %) e taquicárdico ($36,9 \pm 7,1$ %) promovido por AAL 195 não foi alterado (Figura 32).

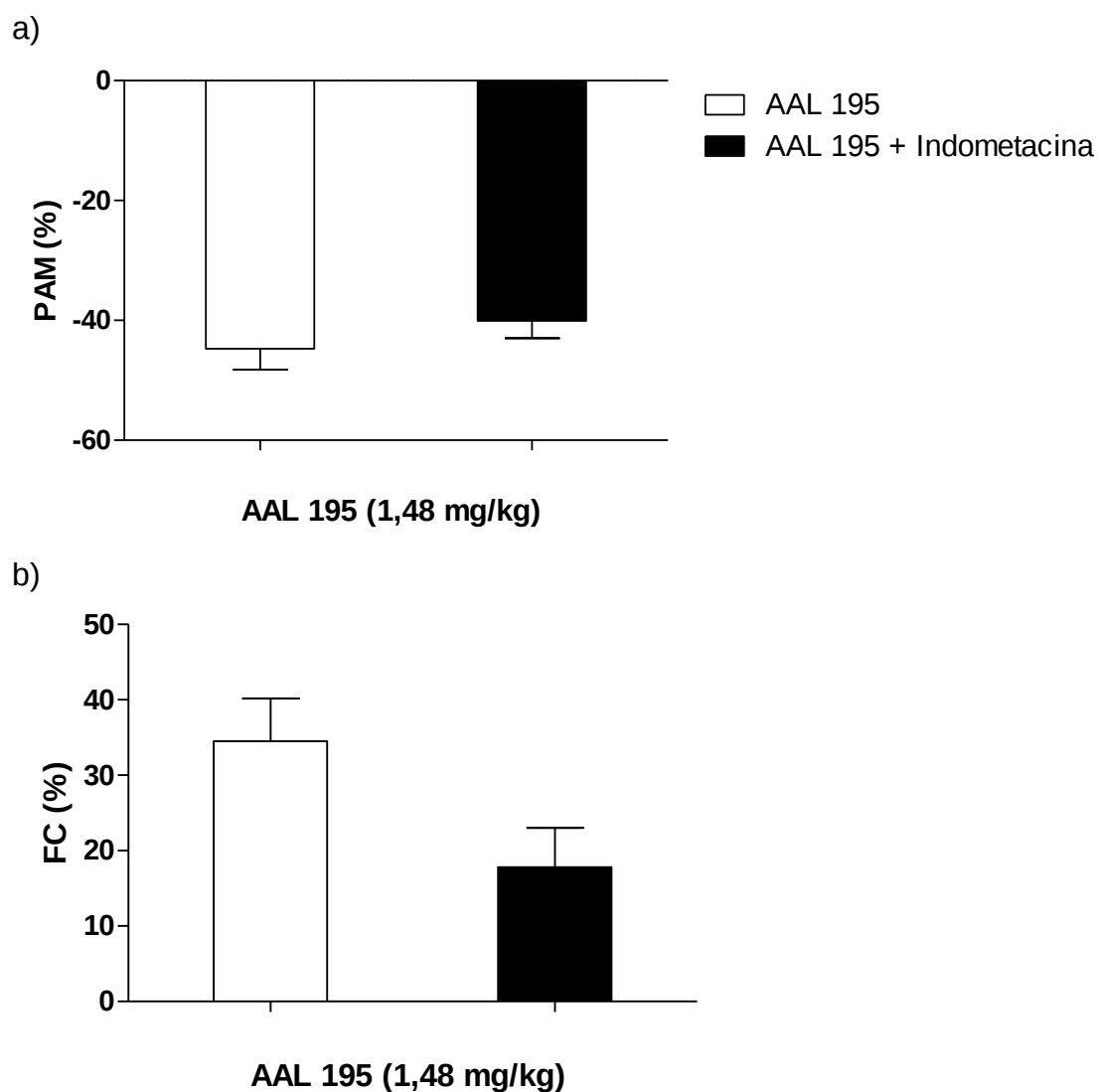
Figura 32 – Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5) antes e após o tratamento com L-NAME. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. ** $p < 0,01$ em relação a ausência do tratamento.



6.1.5 Participação das prostaciclinas na resposta induzida por AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados

Após a administração da indometacina (3 mg/Kg, i.v), o efeito hipotensor ($-40,1 \pm 2,9$ %) e taquicárdico ($17,8 \pm 5,2$ %) promovido por AAL 195 não foi alterado (Figura 33).

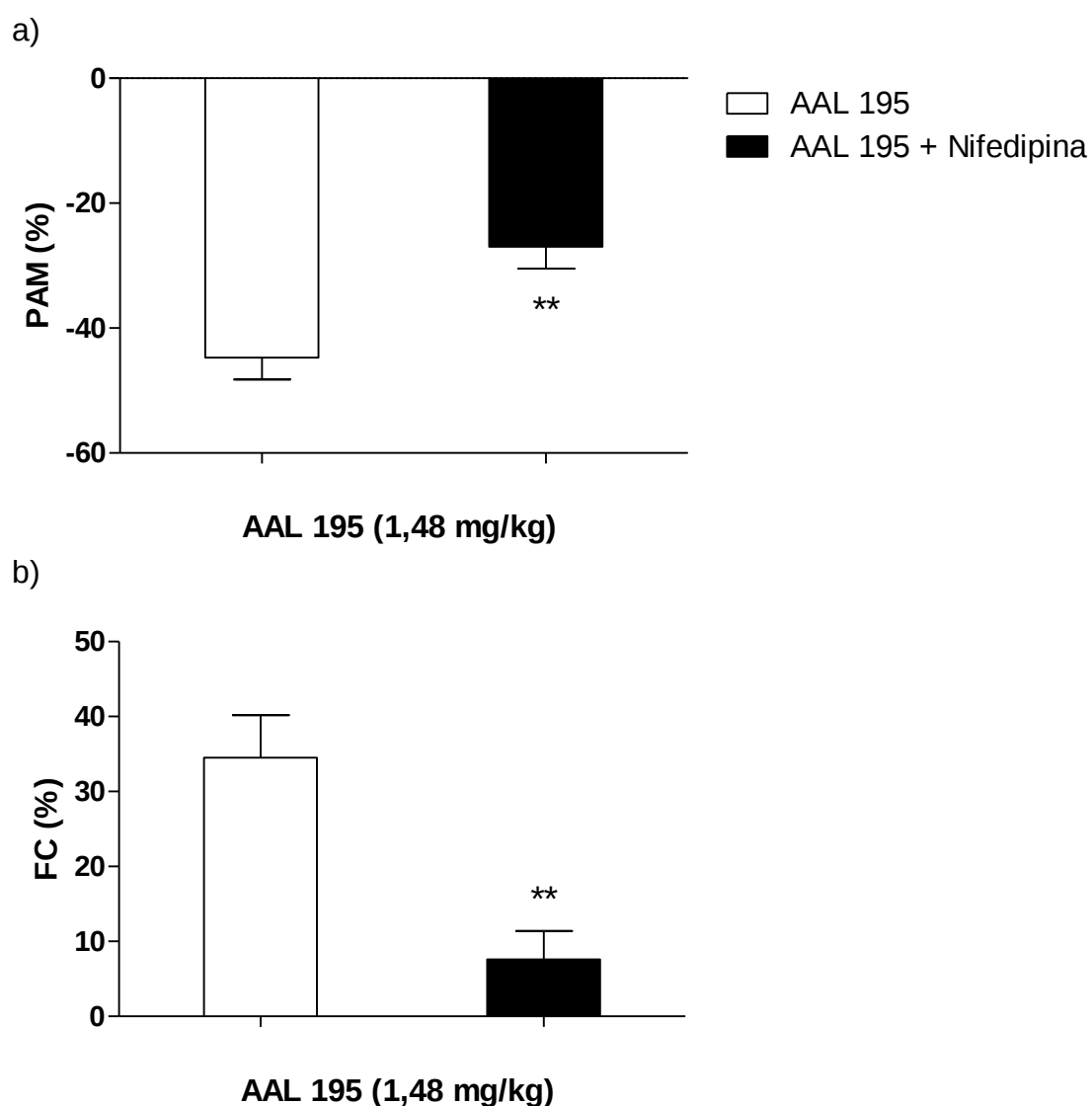
Figura 33 – Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5) antes e após o tratamento com indometacina. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m.



6.1.6 Participação dos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo-L na resposta induzida por AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados

A administração da nifedipina (1 mg/Kg, i.v) atenuou de maneira significativa o efeito hipotensor ($-27,0 \pm 3,5 \%$) e taquicárdico ($7,6 \pm 3,8 \%$) de AAL 195 (Figura 34).

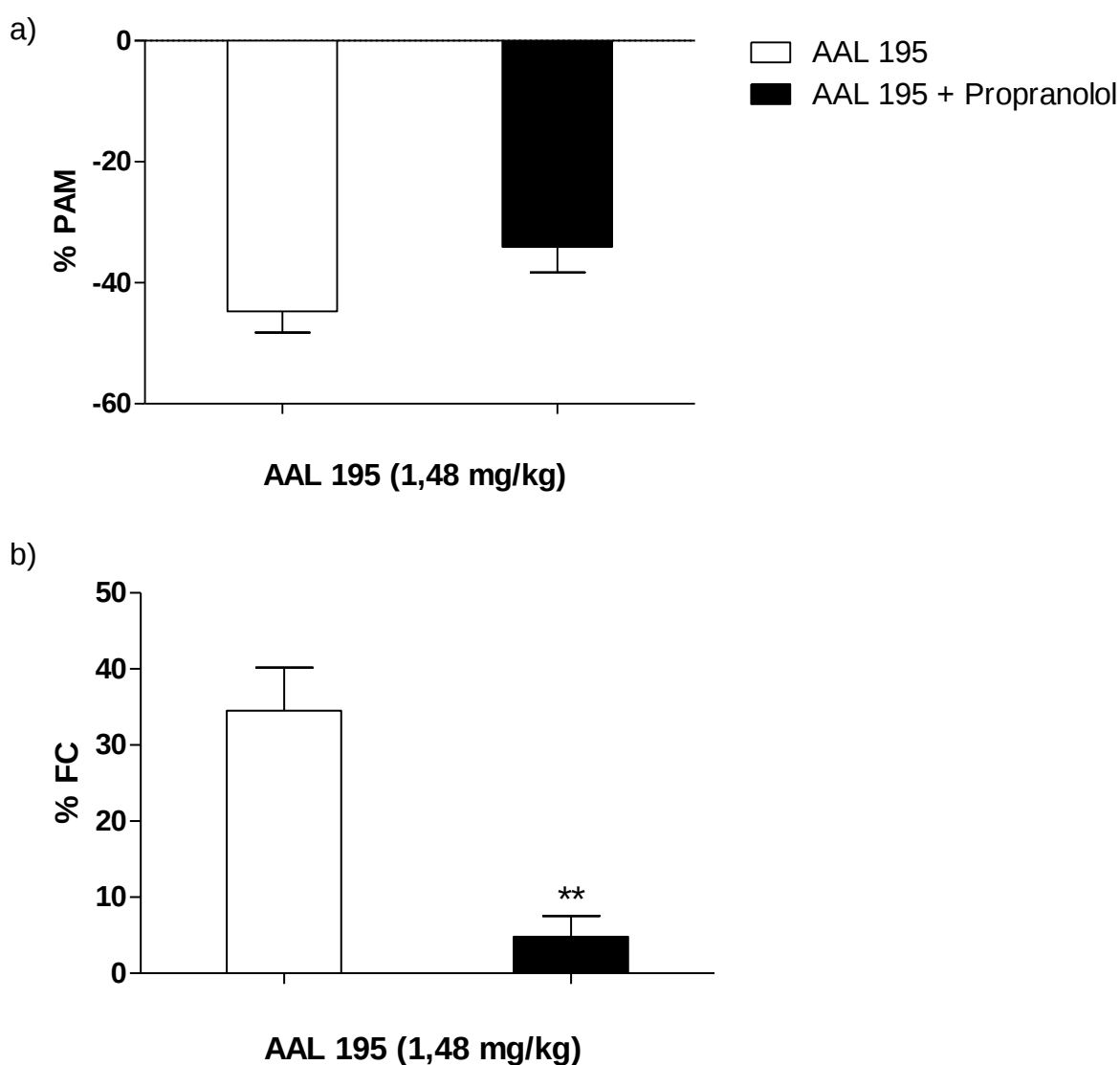
Figura 34 – Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5) antes e após o tratamento com nifedipina. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. ** $p < 0,01$ em relação a ausência do tratamento.



6.1.7 Participação dos receptores β -adrenérgicos na resposta induzida por AAL 195 sobre a PA e FC de ratos SHR não anestesiados

Após administração do propranolol (4 mg/Kg, i.v) não houve alteração na resposta hipotensora promovida por AAL 195 ($-34,1 \pm 4,2$ %), no entanto o efeito taquicárdico foi atenuado de maneira significativa ($4,8 \pm 2,7$ %) (Figura 35).

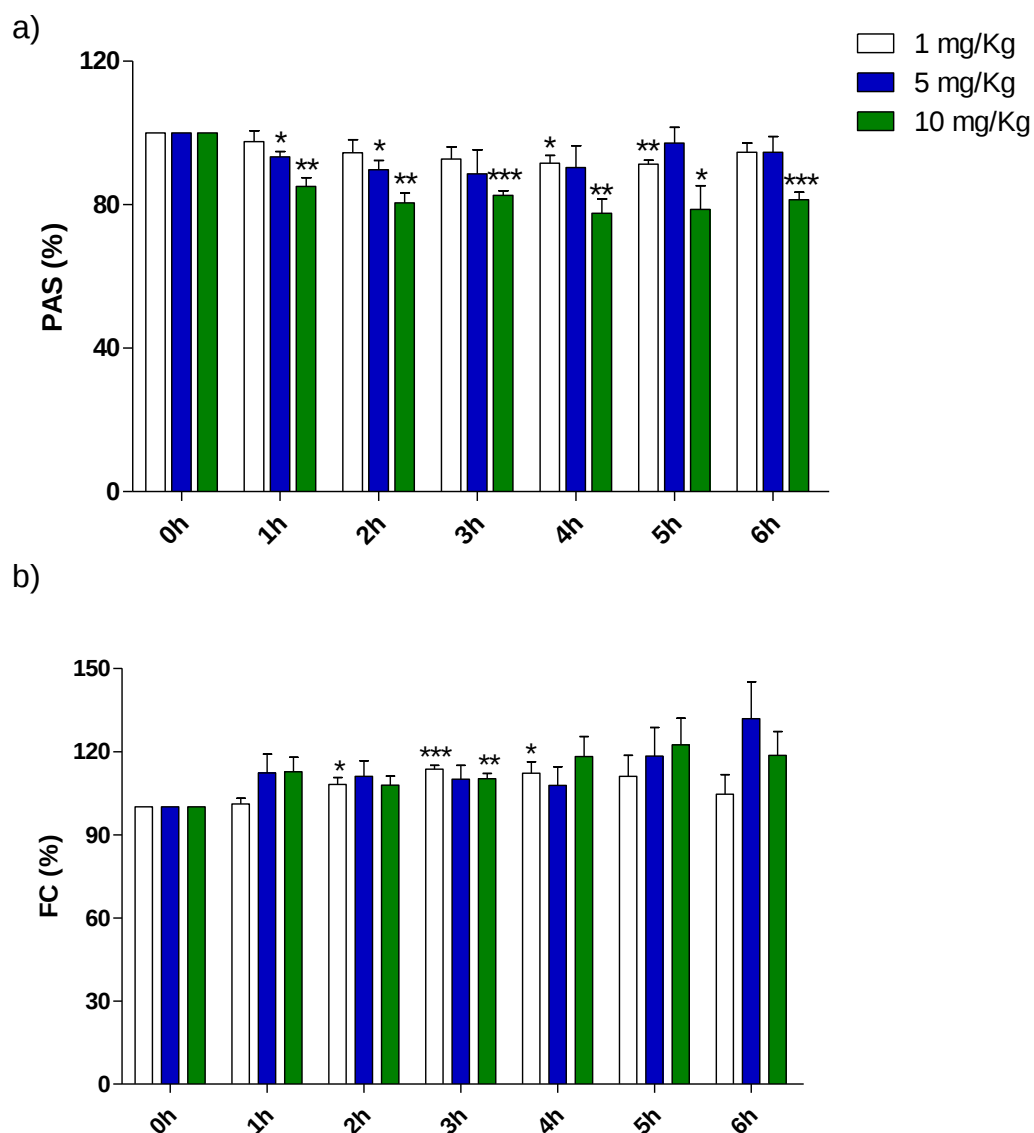
Figura 35 – Efeitos do AAL 195 (1,48 mg/kg) sobre a PAM (a) e FC (b) de ratos SHR não-anestesiados (n=5) antes e após o tratamento com propranolol. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. ** $p < 0,01$ em relação a ausência do tratamento.



6.1.7 Efeitos subagudos após administração oral de AAL 195 sobre a PAS e FC de ratos SHR não anestesiados

A administração de uma única dose orogástrica de 1, 5 ou 10 mg/kg de AAL 195 reduziu significativamente a PAS na quarta e na quinta hora para a dose de 1 mg/kg, na primeira e segunda hora para a dose de 5 mg/kg e da primeira até a sexta hora na dose de 10 mg/kg. Em relação à FC, AAL 195 promoveu efeito taquicárdico significativo na segunda, terceira e quarta hora na dose de 1 mg/kg e na terceira hora na dose de 10 mg/kg (Figura 36).

Figura 36 – Efeitos subagudos sobre a PAS (a) e FC (b) após administração oral de AAL 195 (1, 5 ou 10 mg/kg) em ratos SHR não-anestesiados (n=5). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao tempo de 0h.



6.2 Estudos Farmacológicos com AAL 195 *in vitro*

6.2.1 Efeito do AAL 195 sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto, pré-contráídos com FEN, concentrações crescentes de AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) foram capazes de promover vasorrelaxamento de maneira dependente de concentração ($E_{\text{máx}} = 100,0 \pm 5,15$ %, $pD_2 = 6,65 \pm 0,08$ M). Após a remoção do endotélio, a curva concentração-resposta de AAL 195 foi deslocada para a direita ($pD_2 = 6,25 \pm 0,05$ M), sem alteração do efeito máximo ($E_{\text{máx}} = 95,50 \pm 1,54$ %) (Figura 37).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração de AAL 195 foi de aproximadamente 5 minutos. Ao final dos experimentos, a reversão do relaxamento produzido por AAL 195 foi conseguida após 30 minutos de sua remoção das cubas, através da troca da solução tyrode e verificação da resposta tecidual à FEN ($10 \mu\text{M}$). Desta forma, observou-se uma total reversão da contração induzida pela FEN e, portanto, uma completa recuperação do órgão (Figura 38).

Figura 37 – Efeito do AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR com endotélio intacto (●) ou sem endotélio (○), pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. ** $p < 0,01$ em relação aos anéis com endotélio.

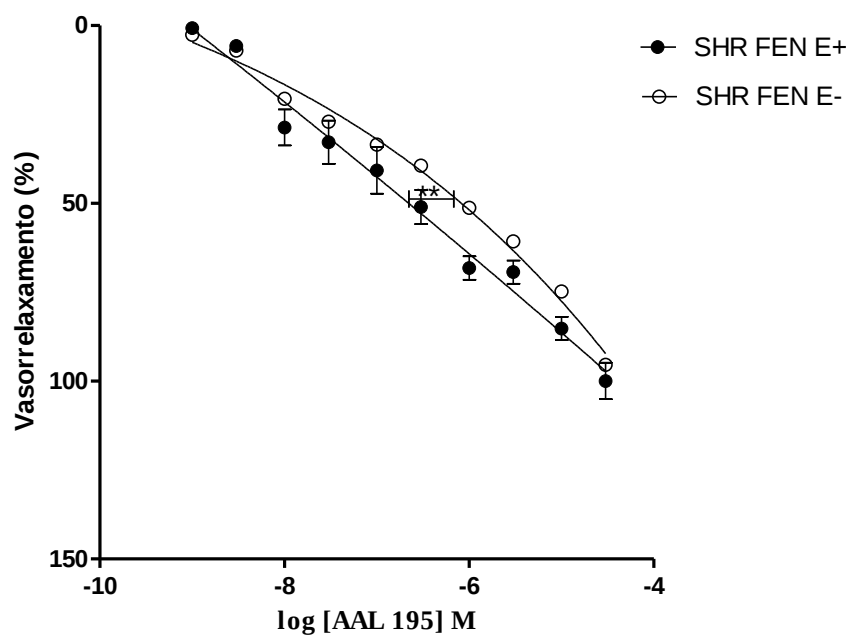
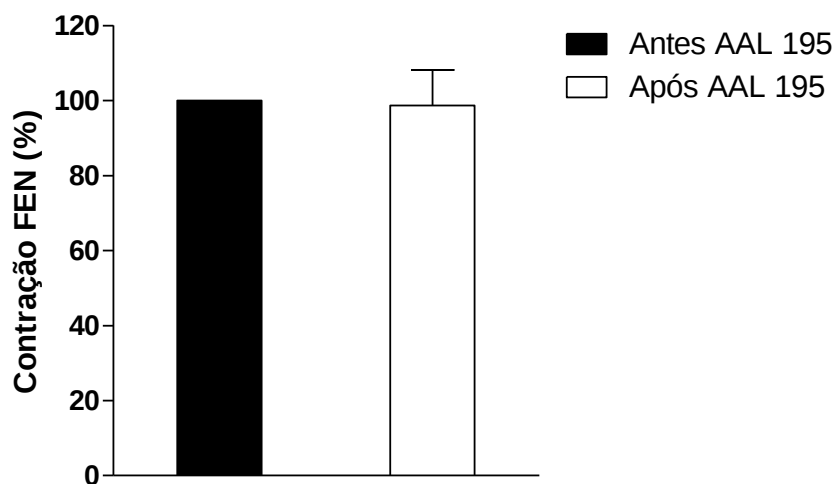


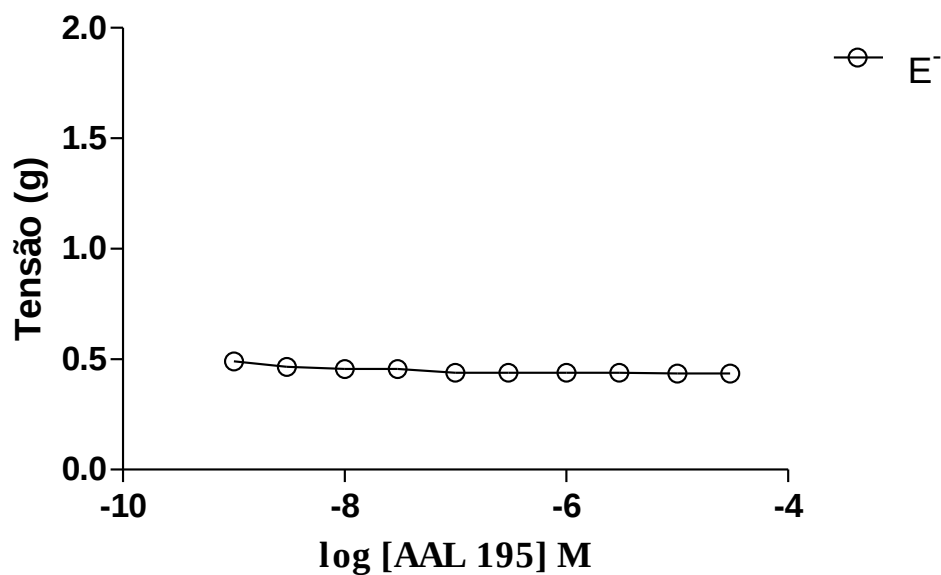
Figura 38 – Porcentagem de contração com FEN e recuperação do órgão nos anéis de artéria mesentérica superior de ratos SHR sem endotélio funcional.



6.2.2 Efeito do AAL 195 sobre o tônus intrínseco de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

A administração cumulativa de AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) nas preparações de anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio não promoveu efeito sobre o tônus muscular espontâneo (Figura 39).

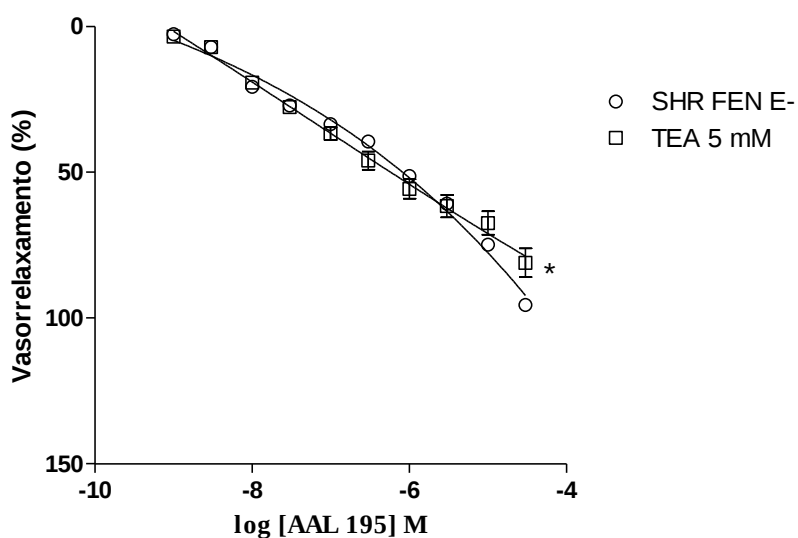
Figura 39 – Efeito do AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) sobre o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio ($\circ$). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m.



6.2.3 Participação dos canais para K^+ no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional, pré-contráídos com FEN, na presença de TEA (5 mM), que nesta concentração é um inibidor não seletivo de canais para K^+ , concentrações crescentes de AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) foram capazes de reduzir significativamente o vasorrelaxamento promovido por AAL 195 ($E_{\text{máx}} = 81,05 \pm 4,91$ %) ($p < 0,05$), com redução da potência farmacológica ($pD_2 = 6,65 \pm 0,06$ M) ($p < 0,001$) (Figura 40) (Tabela 5).

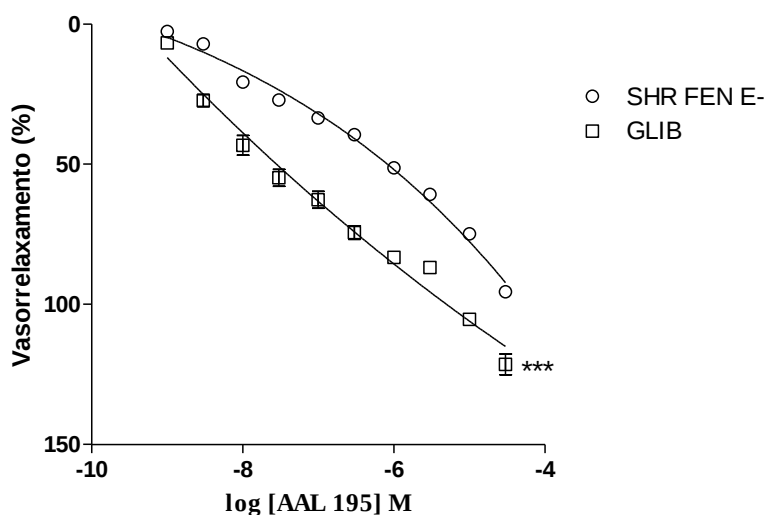
Figura 40 – Influência do TEA (5 mM) no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195. Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio ($\circ$), pré-contráídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), ou após bloqueio com TEA (5 mM). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ vs SHR FEN E^- .



6.2.4 Participação dos canais para K⁺ sensíveis ao ATP no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Em anéis sem endotélio, pré-contraídos com FEN, após o bloqueio com GLIB (10 μ M), o efeito vasorrelaxante de AAL 195 foi potencializado ($E_{\text{máx}}$ = $121,45 \pm 3,70$ %) ($p < 0,001$), com um aumento significativo da potência farmacológica ($pD_2 = 7,19 \pm 0,06$ M) ($p < 0,001$) (Figura 41) (Tabela 5).

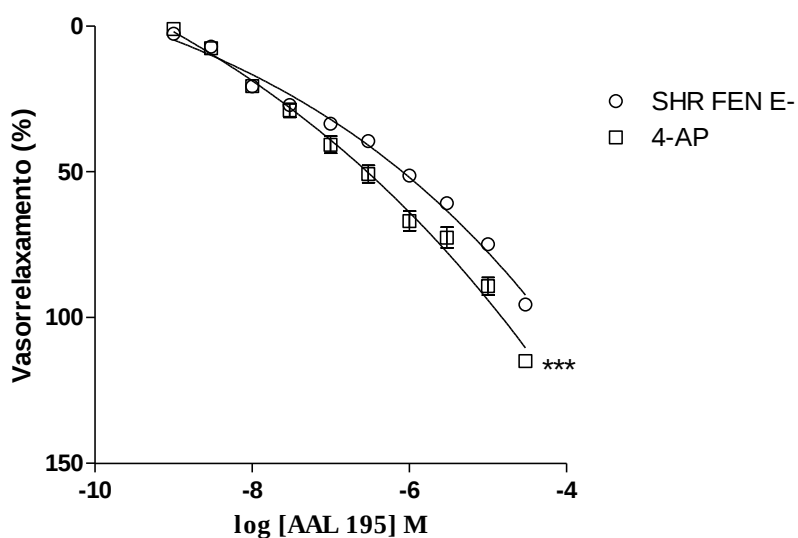
Figura 41 – Influência da glibenclamida no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195. Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio ($\circ$), pré-contraídos com FEN (10 μ M), ou após bloqueio com GLIB (10 μ M). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *** $p < 0,001$ vs SHR FEN E⁻.



6.2.5 Participação dos canais para K^+ sensíveis à voltagem no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Em anéis sem endotélio, pré-contraídos com FEN, o bloqueio com 4-AP (1 mM) potencializou o efeito vasorrelaxante promovido por AAL 195 ($E_{\text{máx}} = 114,95 \pm 1,85 \%$) ($p < 0,001$), além de aumentar a sua potência farmacológica ($pD_2 = 6,47 \pm 0,06 \text{ M}$) ($p < 0,05$) (Figura 42) (Tabela 5).

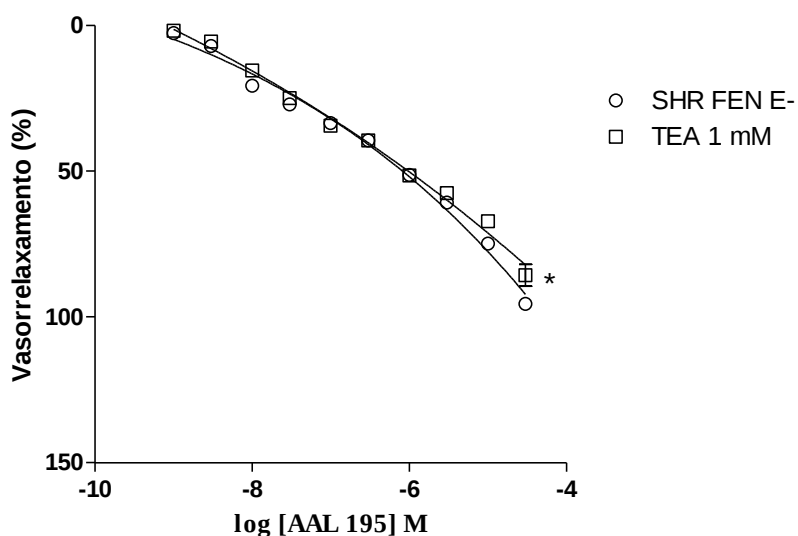
Figura 42 – Influência da 4-aminopiridina no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195. Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – $3 \times 10^{-5} \text{ M}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio ($\circ$), pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), ou após bloqueio com 4-AP (1 mM). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *** $p < 0,001$ vs SHR FEN E $^-$.



6.2.6 Participação dos canais para K^+ de grande condutância no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Em anéis sem endotélio, pré-contraídos com FEN, o bloqueio com TEA (1 mM), que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos canais BK_{Ca} , atenuou o vasorrelaxamento induzido por AAL 195 ($E_{máx} = 85,71 \pm 3,73 \%$) ($p < 0,05$), sem alterar a potência farmacológica ($pD_2 = 6,40 \pm 0,05 \text{ M}$) (Figura 43) (Tabela 5).

Figura 43 – Influência do TEA (1 mM) no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195. Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – $3 \times 10^{-5} \text{ M}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio ($\circ$), pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), ou após bloqueio com TEA (1 mM). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ vs SHR FEN E $^-$.



6.2.7 Participação dos canais para K^+ de pequena condutância no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Em anéis sem endotélio, pré-contraídos com FEN, o bloqueio com Apamina ($0,1 \mu\text{M}$), um bloqueador seletivo dos canais SK_{Ca} , não alterou o efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 ($E_{\text{máx}} = 97,37 \pm 1,04 \%$, $pD_2 = 6,23 \pm 0,04$ M) (Figura 44) (Tabela 5).

Figura 44 – Influência da apamina no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195. Curva concentração-resposta para AAL 195 ($10^{-9} - 3 \times 10^{-5}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio ($\circ$), pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$), ou após bloqueio com Apamina ($0,1 \mu\text{M}$). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m.

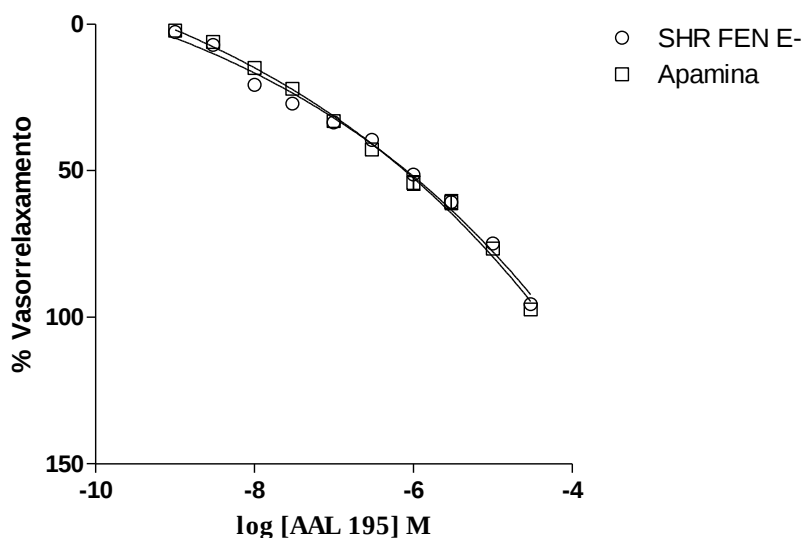


Tabela 5 – Comparação dos valores de $E_{\text{máx}}$ e pD_2 de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, sem endotélio funcional, após bloqueios para avaliar a participação dos canais K^+ .

Condições Experimentais	$E_{\text{máx}}$ (% relaxamento)	pD_2 (M)	n
FEN (10 μM)	95,50 $\pm$ 1,54	6,25 $\pm$ 0,05	5
TEA (5 mM)	81,05 $\pm$ 4,91*	6,65 $\pm$ 0,06***	5
TEA (1 mM)	85,71 $\pm$ 3,73*	6,40 $\pm$ 0,05	5
4-AP (1 mM)	114,95 $\pm$ 1,85***	6,47 $\pm$ 0,06*	5
GLIB (10 μM)	121,45 $\pm$ 3,70***	7,19 $\pm$ 0,06***	5
Apamina (0,1 μM)	97,37 $\pm$ 1,04	6,23 $\pm$ 0,04	5

Os valores estão expressos com média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs FEN E^- .

6.2.8 Efeito do AAL 195 sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução Tyrode despolarizante com KCl 80 mM, AAL 195 ($3 \times 10^{-8} - 10^{-3}$ M) promoveu efeito vasorrelaxante, de maneira dependente de concentração ($E_{\text{máx}} = 101,62 \pm 1,04$ % e $pD_2 = 4,32 \pm 0,05$ M) (Figura 45). Além disso, observa-se em anéis sem endotélio, após pré-contracção com FEN ou KCl 80 mM, uma redução significativa da potência nos anéis pré-contraídos com KCl 80 mM ($p < 0,001$), quando comparados aos pré-contraídos com FEN, sem alteração no efeito máximo (Tabela 6).

Figura 45 – Efeito do AAL 195 nas contrações induzidas por KCl 80 mM. Curva concentração-resposta para AAL 195 ($3 \times 10^{-8} - 10^{-3}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio ($\circ$), pré-contraídos com KCl 80 mM ($n=5$). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m.

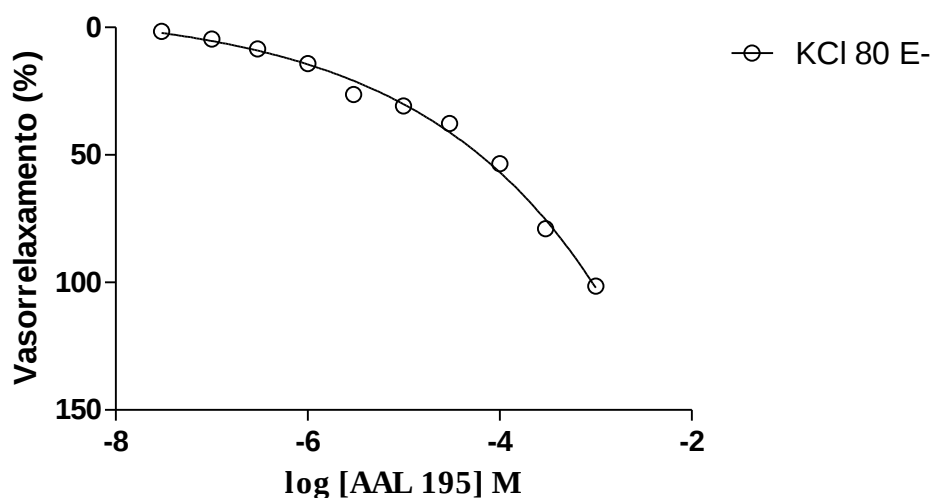


Tabela 6 – Comparação dos valores de $E_{\text{máx}}$ e pD_2 de AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, sem endotélio funcional.

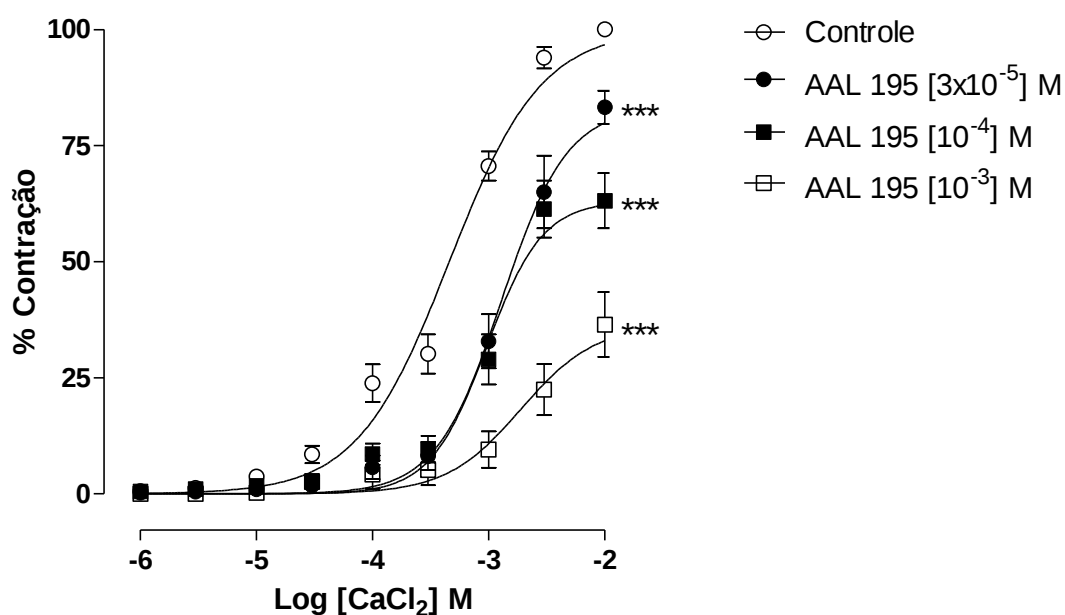
Condições Experimentais	$E_{\text{máx}}$ (% relaxamento)	pD_2 (M)	n
FEN (10 μ M)	95,50 $\pm$ 1,54	6,25 $\pm$ 0,05	5
KCl 80 mM	101,62 $\pm$ 1,04	4,32 $\pm$ 0,05***	5

Os valores estão expressos com média $\pm$ e.p.m. *** $p < 0,001$ vs FEN E $^-$.

6.2.9 Efeito do AAL 195 sobre o influxo de Ca^{2+} em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

A administração cumulativa de CaCl_2 (10^{-6} – 10^{-2} M) promoveu contração, dependente de concentração, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-incubados com solução despolarizante de KCl a 60 mM e nominalmente sem Ca^{2+} (curva controle). Após a incubação com AAL 195 (3×10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} M, separadamente) as curvas concentração-resposta para o CaCl_2 foram significativamente atenuadas ($p < 0,001$) ($E_{\text{máx}} = 83,25 \pm 1,60$; $63,11 \pm 2,43$ e $36,45 \pm 3,10$ %, respectivamente, $n = 5$), quando comparada ao controle ($E_{\text{máx}} = 100,0 \pm 0,0$ %) (Figura 46).

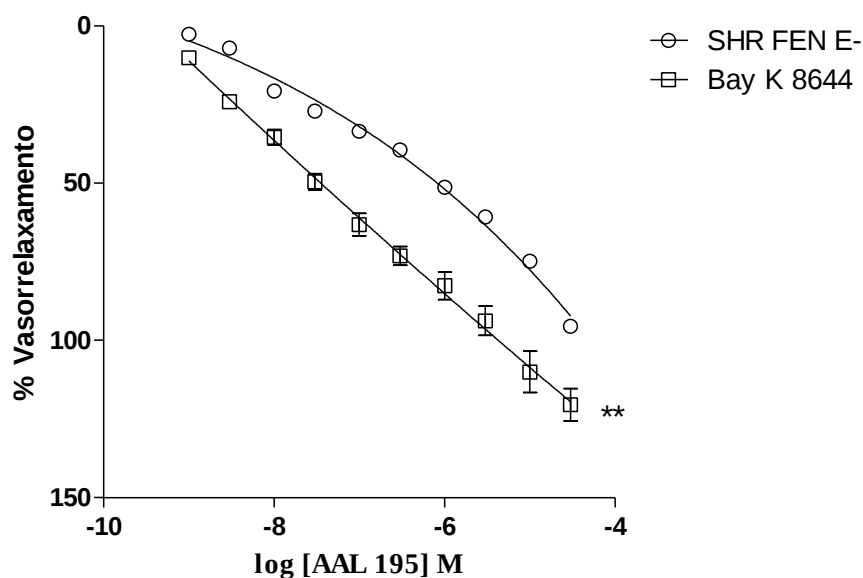
Figura 46 – Efeito do AAL 195 sobre o influxo de Ca^{2+} . Curva concentração-resposta para CaCl_2 (10^{-6} – 10^{-2} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio ($\circ$), pré-incubadas com [AAL 195] M ($n=5$). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni. *** $p < 0,001$ vs Controle.



6.2.10 Efeito do AAL 195 sobre o influxo de Ca^{2+} por canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem do Tipo-L

Ao ser administrado cumulativamente na fase tônica da contração induzida por S(-)-Bay K 8644 (200 nM), AAL 195 (3×10^{-8} – 10^{-3} M) induziu um vasorrelaxamento dependente de concentração, com um aumento significativo nos valores de Emáx ($120,40 \pm 5,14$ %) ($p < 0,01$) (Figura 47).

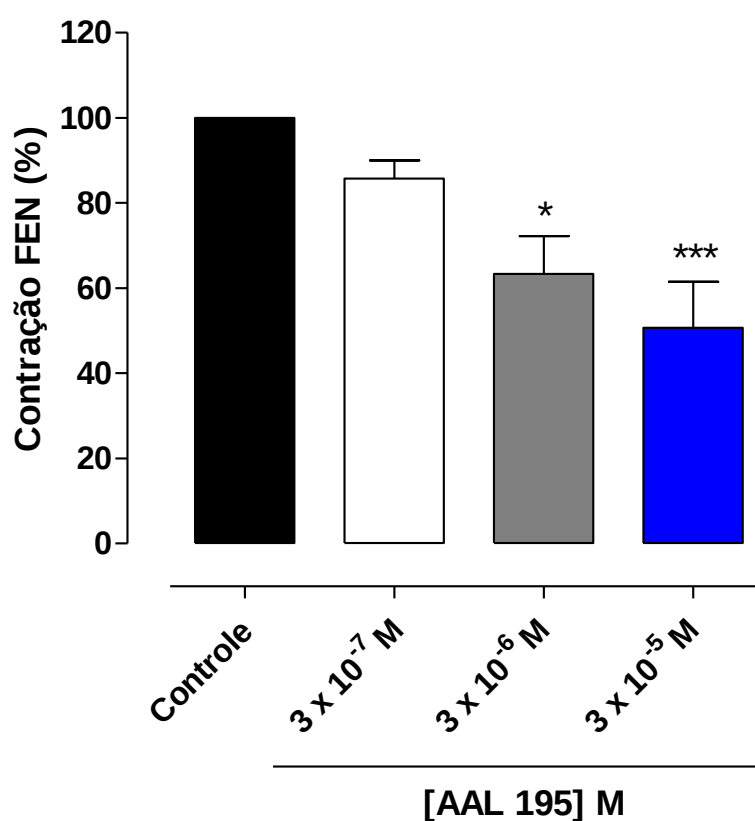
Figura 47 – Efeito do AAL 195 nas contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644. Curva concentração-resposta para AAL 195 (3×10^{-8} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio, pré-contraídos com FEN ($\circ$) ou com S(-)-Bay K 8644 ($\square$) ($n=5$). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. ** $p < 0,01$ vs SHR FEN E.



6.2.11 Efeito do AAL 195 sobre a mobilização de Ca^{2+} pelos receptores de IP_3 dos estoques intracelulares

Em meio livre de cálcio, as concentrações de 3×10^{-6} e 3×10^{-5} M de AAL 195 foram capazes de atenuar, de maneira significativa, as contrações transientes induzidas por 10 μM de FEN (Figura 48).

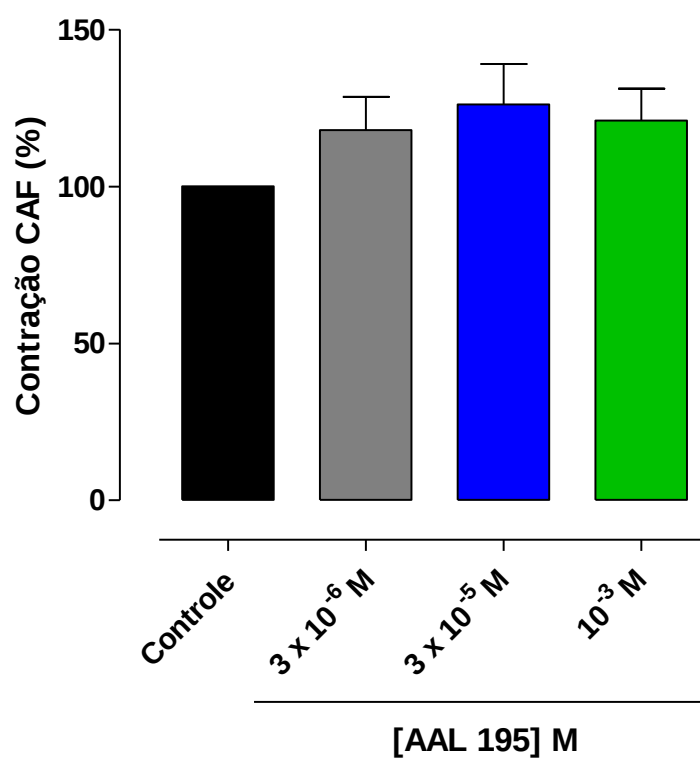
Figura 48 – Efeito de AAL 195 na contração induzida por FEN, em anéis de artéria mesentérica exposta a solução livre de Ca^{2+} , sem endotélio funcional (n= 5). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni. * p < 0,05 e *** p < 0,001 vs Controle.



6.2.12 Efeito do AAL 195 sobre a mobilização de Ca^{2+} pelos receptores de rianodina dos estoques intracelulares

A pré-incubação com AAL 195 (3×10^{-6} ; 3×10^{-5} ; 10^{-3} M), em meio livre de cálcio, não alterou as contrações transientes induzidas por 20 mM de cafeína. (Figura 49).

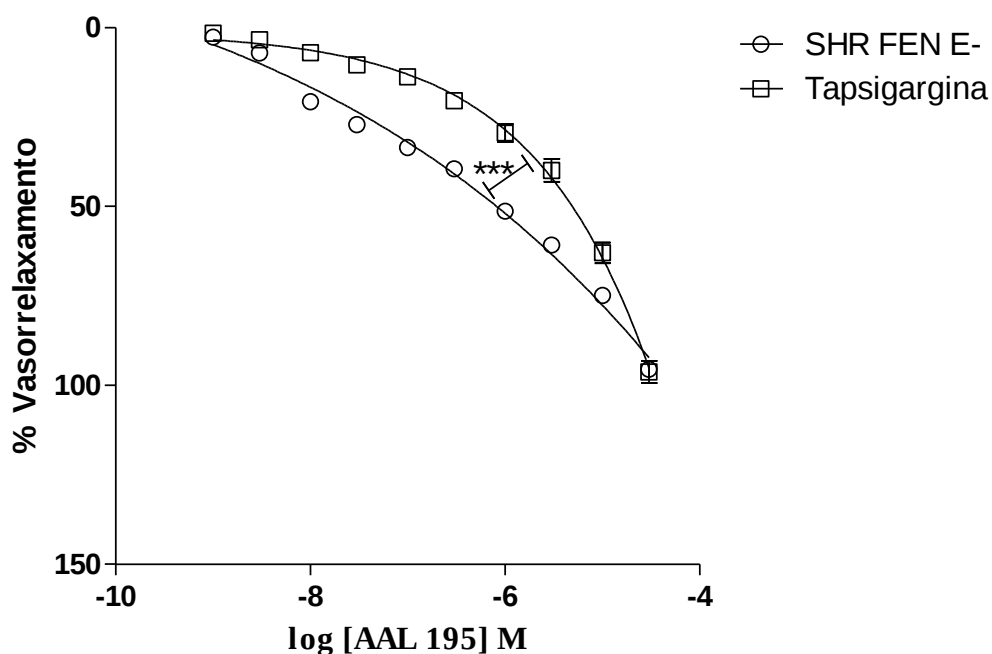
Figura 49 – Efeito de AAL 195 na contração induzida por cafeína, em anéis de artéria mesentérica exposta a solução livre de Ca^{2+} , sem endotélio funcional (n= 5). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m.



6.2.13 Participação da SERCA no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Em anéis sem endotélio, pré-contraídos com FEN, o bloqueio com Tapsigargina (1 μ M) foi capaz de deslocar significativamente a curva concentração-resposta para a direita ($pD_2 = 5,50 \pm 0,05$ M) ($p < 0,001$), sem alteração do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 96,25 \pm 3,10$ %) (Figura 50).

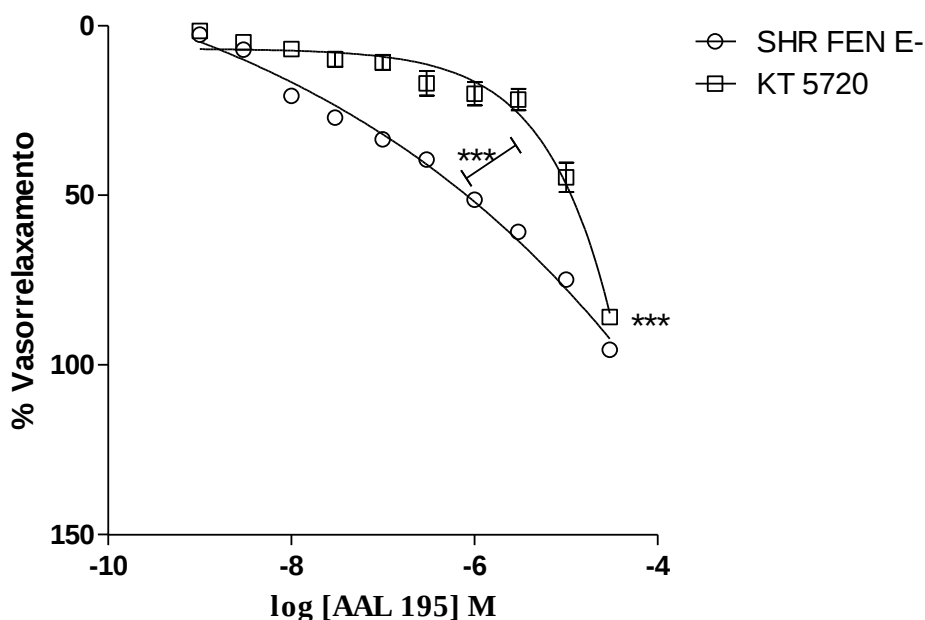
Figura 50 – Influência da tapsigargina no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195. Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio ($\circ$), pré-contraídos com FEN (10 μ M), ou após bloqueio com Tapsigargina (1 μ M). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *** $p < 0,001$ vs SHR FEN E $^-$.



6.2.14 Participação da PKA no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

Em anéis sem endotélio, pré-contraídos com FEN, o bloqueio com KT 5720 (1 μ M) atenuou, de maneira significativa, o efeito vasorrelaxante promovido por AAL 195 ($E_{\text{máx}} = 85,87 \pm 1,10$ %) ($p < 0,001$), e foi capaz de deslocar a curva para a direita, reduzindo a potência farmacológica ($pD_2 = 5,33 \pm 0,08$ M) ($p < 0,001$) (Figura 51).

Figura 51 – Influência do KT 5720 no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195. Curva concentração-resposta para AAL 195 (10^{-9} – 3×10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio ($\circ$), pré-contraídos com FEN (10 μ M), ou após bloqueio com KT 5720 (1 μ M). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *** $p < 0,001$ vs SHR FEN E-.



7 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos de AAL 195, um inibidor de PDE4, sobre o sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos, bem como tentar elucidar os possíveis mecanismos que envolvem esses efeitos. Para isto, foram realizados experimentos *in vivo* com a finalidade de avaliar os efeitos de AAL 195 sobre a PA e FC de ratos hipertensos não anestesiados, e experimentos *in vitro* para analisar o efeito vasorrelaxante do composto em anéis de artéria mesentérica superior de ratos hipertensos.

O principal achado do trabalho foi de que AAL 195 promoveu efeito hipotensor e anti-hipertensivo, possivelmente devido à diminuição da resistência vascular periférica total, e efeito vasorrelaxante em artéria mesentérica superior de ratos SHR. Esse efeito se mostrou inespecífico e parece estar relacionado à estimulação de canais BK_{Ca} , à redução do influxo de Ca^{2+} por meio da inibição dos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo-L, pela inibição da liberação de Ca^{2+} pelos receptores de IP_3 e aumento da recaptação de Ca^{2+} pela SERCA nos estoques intracelulares, bem como à ativação da PKA. Além disso, AAL 195 promoveu efeito taquicárdico, provavelmente em virtude à inibição da PDE4 nos cardiomiócitos.

As fosfodiesterases, em especial a PDE4, são enzimas expressas de forma ubíqua, sendo encontradas em diversos tecidos, incluindo o miocárdio e as células do músculo liso vascular. Desta forma, as PDEs estão envolvidas em importantes patologias relacionadas ao sistema cardiovascular (KLUSSMANN, 2016; PREEDY, 2020). Aliás, vários inibidores de PDE têm sido utilizados na prática clínica ou em estudos pré-clínicos para o tratamento de doenças cardíacas ou vasculares (MILLER; YAN, 2010). Em estudo prévio, AAL 195 promoveu efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar (normotensos) (SILVA, 2017). Diante disso, decidiu-se investigar os efeitos de AAL 195 sobre o sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos, através da medida direta da pressão arterial e da frequência cardíaca.

Ratos SHR tornaram-se referência nas pesquisas em hipertensão experimental devido a semelhança com a fisiopatologia da hipertensão essencial

humana (CONCEIÇÃO-VERTAMATTI et al, 2017; FAZAN et al, 2006), portanto, essa linhagem foi escolhida para os ensaios farmacológicos realizados nesse estudo. Foram utilizados animais não-anestesiados, visto que a anestesia é capaz de produzir diversos efeitos sobre o sistema cardiovascular, tais como indução de sinapses do sistema nervoso central e alterações das respostas autonômicas. Tais efeitos afetam diretamente a regulação da pressão arterial (DORWARD et al, 1985; FLUCKIGER et al, 1985).

Sendo assim, em ratos SHR não anestesiados, a administração aguda (i.v – *in bolus*) e randômica de AAL 195 (0,1; 0,5, 1 e 5 mg/Kg) induziu uma resposta transiente de maneira independente de dose, caracterizada por hipotensão associada a taquicardia (Figura 28). Após o cálculo e estabelecimento da DE₅₀ de AAL 195 (1,48 mg/Kg, i.v.) a partir dos dados de pressão artéria média, os experimentos foram repetidos e novamente constatou-se o efeito hipotensor e taquicárdico do composto (Figura 30). Em seguida, todos os protocolos *in vivo* foram feitos utilizando a DE₅₀.

Apesar da ausência de inervação colinérgica na maioria dos vasos sanguíneos, a ativação de receptores muscarínicos do tipo M₃, presentes nas células endoteliais, resulta em intensa vasodilatação, visto que a ativação desses receptores estimula a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (BRUNNING et al, 1994; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Diante disso, decidiu-se avaliar se o efeito hipotensor de AAL 195 estaria ligado a uma possível estimulação de receptores M₃. Desta forma, foi utilizada a atropina, um antagonista não-seletivo de receptores muscarínicos (MITCHELSON, 1984). Nessas condições, o efeito hipotensor promovido por AAL 195 não foi alterado (Figura 31a), portanto não há a participação dos receptores M₃ nesse efeito. No entanto, houve uma atenuação significativa da taquicardia (Figura 31b). Mais estudos são necessários para melhor elucidar o efeito cardíaco promovido pelo bloqueio com atropina, mas esses dados sugerem que o efeito taquicárdico não desempenha qualquer papel no efeito hipotensor de AAL 195, portanto são efeitos independentes.

O endotélio, camada celular que reveste o interior dos vasos sanguíneos, libera substâncias que atuam diretamente na musculatura lisa vascular, promovendo contração ou relaxamento. Dentre as substâncias vasodilatadoras estão o NO e as PGI₂ (STANKEVIČIUS et al, 2003).

O óxido nítrico é um gás relativamente estável, sintetizado a partir da L-arginina pela enzima NOS nas células endoteliais. O NO apresenta a capacidade de se difundir facilmente através da membrana celular e no MLV, ativa a guanilil ciclase solúvel, que por sua vez aumenta os níveis de GMPc. Níveis aumentados de GMPc resulta em diminuição do Ca^{2+} intracelular, com consequente relaxamento dessa musculatura. Já PGI_2 são substâncias sintetizadas pelas ciclooxigenases através do ácido araquidônico. A ativação de receptores de PGI_2 ativa a adenilato ciclase, aumentando os níveis intracelulares de AMPc, que também resulta no relaxamento do MLV (SU, 2015). Diante disso, decidiu-se avaliar se NO e PGI_2 estariam envolvidos nos efeitos cardiovasculares induzidos por AAL 195.

Para isso utilizou-se L-NAME, um inibidor competitivo não seletivo da NOS (MONCADA; HIGGS, 1993), ou indometacina, um inibidor da ciclooxigenase (CLARK; FUCHS, 1997). Após a administração desses bloqueadores, não houve alteração nas respostas hipotensoras e taquicárdicas (Figuras 32 e 33), sugerindo que os fatores relaxantes derivados do endotélio não influenciam nos efeitos cardiovasculares induzidos por AAL 195.

No músculo liso vascular, o aumento da concentração de Ca^{2+} é responsável pela contratilidade dessa musculatura. Após um estímulo contrátil, a membrana celular sofre despolarização, ativando os canais para Ca^{2+} operados por voltagem. Dessa forma, ocorre um aumento do influxo de Ca^{2+} intracelular, levando à vasoconstrição (CLAPHAM, 2007; THORNELOE; NELSON, 2005). Portanto, a inibição desses canais pode resultar em diminuição da resistência vascular periférica total, levando à redução dos níveis de PA (BROZOVICH et al, 2016). Ademais, sabe-se que a inibição da PDE4 no MLV leva ao aumento do AMPc, que consequentemente, ativa a PKA. Um dos alvos da PKA é justamente a redução do influxo de Ca^{2+} extracelular (MORGADO et al, 2012).

Com base nessas informações, o efeito de AAL 195 sobre a pressão arterial média foi avaliado na presença da nifedipina, um bloqueador seletivo dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem tipo-L sensíveis a diidropiridinas (HAGIWARA; MITSUI; KARAKI, 1993). Nestas condições, o efeito hipotensor de AAL 195 foi atenuado de maneira significativa (Figura 34a), o que sugere a participação desses canais na hipotensão promovida pelo composto. Esse dado

corroborar com o efeito de AAL 195 observado em anéis mesentéricos de ratos normotensos, onde verificou-se que a inibição do influxo de Ca^{2+} contribui para o relaxamento desses vasos (SILVA, 2017).

Já é bem descrito a presença dos receptores β_2 -adrenérgicos na musculatura lisa vascular. A ativação desses receptores, que estão acoplados à proteína G_s , ativa uma adenilato ciclase, aumentando os níveis intracelulares de AMPc. A consequência do aumento intracelular desse segundo mensageiro é a vasodilatação, com consequente redução da pressão arterial (BORTOLOTO; CONSOLIM-COLOMBO, 2009). Desta forma, o efeito de AAL 195 sobre a pressão arterial média foi avaliado na presença do propranolol, um bloqueador não seletivo dos receptores β -adrenérgicos (HAGIWARA; MITSUI; KARAKI, 1993; TYKOCKI; BOERMAN; JACKSON, 2017). Nestas condições, o efeito hipotensor promovido por AAL 195 não foi alterado (Figura 35a), sugerindo que a ativação de receptores β -adrenérgicos no músculo liso vascular não influencia o efeito de AAL 195.

Nos miócitos cardíacos, a isoforma PDE4D3, juntamente com proteínas fosfatases, tem o objetivo de prevenir a hiperfosforilação dos canais RyR2 presentes no retículo sarcoplasmático. Portanto, a hiperfosforilação promovida pela inibição dessa enzima aumenta a probabilidade de liberação de Ca^{2+} por esses canais para o meio intracelular (RAO; XI, 2009). Além disso, a inibição da PDE4 também está envolvida no aumento do influxo de Ca^{2+} através de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo-L (DUNKERLY-EYRING; KASS, 2020). Juntos, esses eventos resultam em aumento da contratilidade e da frequência cardíaca. Diante dessas informações, observou-se que após a administração da nifedipina, o efeito taquicárdico de AAL 195 foi atenuado de maneira significativa (Figura 34b), sugerindo que esse composto promove um aumento do influxo de Ca^{2+} nas células cardíacas.

Sabe-se que a ativação simpática leva à sinalização β -adrenérgica no miócito cardíaco. De um modo geral, quando o receptor é ativado, sua proteína G_s associada causa a ativação da adenilato ciclase, que por sua vez, catalisa a produção de AMPc a partir de ATP. O AMPc ativa várias proteínas efetoras como a PKA, que fosforila vários substratos importantes para o acoplamento excitação-contração cardíaca, levando a efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos (FERTING; BAILLIE, 2018). Desta forma, observou-se que após

bloqueio com propranolol o efeito taquicárdico do AAL 195 foi atenuado (Figura 35b), demonstrando que AAL 195 é capaz de modular respostas β -adrenérgicas.

Os resultados obtidos após bloqueio com nifedipina e propranolol ratificam a hipótese de que o efeito taquicárdico é independente do efeito hipotensor e é mediado pela inibição direta da PDE4 cardíaca.

Diante dos efeitos cardiovasculares observados acima, induzidos pela administração i.v. *in bolus* de AAL 195, decidiu-se investigar quais os efeitos subagudos após a administração oral do referido composto. Para isso, foi realizado um protocolo de medida direta dos parâmetros cardiovasculares em ratos SHR não anestesiados, onde PAS e FC foram avaliados antes e após o tratamento com AAL 195 (1, 5 e 10 mg/kg), durante um período de seis horas.

Nestas condições, AAL 195 reduziu a PAS na quarta e na quinta hora após a administração da dose de 1 mg/kg, na primeira e na segunda hora após a dose de 5 mg/kg e da primeira até a sexta hora após a administração da dose de 10 mg/kg (Figura 36a). Estudos sugerem que a redução da PAS, como observado nesse estudo, pode trazer diversos benefícios na redução do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e na mortalidade em geral de pacientes hipertensos (BUNDY et al, 2017; SERRANO; RENTE; TOMAZ, 2018). Em relação à FC, foi observado efeito taquicárdico na segunda, terceira e quarta hora após a administração oral do AAL 195 (Figura 36b), o que pode representar uma limitação no uso de AAL 195. Contudo, esses resultados mostram que AAL 195 apresenta atividade anti-hipertensiva.

Os dados obtidos com o AAL 195 disponíveis até o momento demonstram que ele promove efeito hipotensor e taquicárdico em ratos SHR e que esses efeitos são independentes. AAL 195 também apresenta efeito anti-hipertensivo, de acordo com a sua capacidade de reduzir a pressão arterial de maneira sustentada. Considerando que a pressão arterial média é um produto do débito cardíaco e da resistência vascular periférica total e que a alteração de qualquer um desses fatores repercute diretamente nos níveis de PA (BROZOVICH et al, 2016), para melhor compreender a natureza do efeito hipotensor decidiu-se avaliar a atuação de AAL 195 diretamente na resistência vascular.

O tônus vascular é considerado o maior regulador da resistência periférica e da pressão arterial (KHALIL, 2001). Ainda que todos os vasos promovam resistência ao fluxo sanguíneo, são as pequenas artérias e arteríolas que

controlam o fluxo e a pressão sanguínea (SIEGEL, 1996). Portanto, a artéria mesentérica superior, por ser um vaso de resistência, é um ótimo modelo experimental para o estudo de substâncias que promovem vasodilatação.

Neste sentido, o efeito vasorrelaxante de AAL 195 foi avaliado em anéis de artéria mesentérica superior de ratos SHR, pré-contraídos com fenilefrina. A FEN é um agonista seletivo dos receptores α_1 -adrenérgicos (DINIZ-FILHO et al, 2007). Estes receptores estão acoplados à proteína $G_{q/11}$. Após ativação desses receptores, a subunidade α da proteína $G_{q/11}$ ativa a PLC, que por sua vez, catalisa a hidrólise do PIP_2 em IP_3 e DAG. O IP_3 promove a liberação do Ca^{2+} do RS, aumentando os níveis desse íon no meio intracelular, enquanto o DAG, juntamente com o Ca^{2+} , ativa a PKC, o que promove a fosforilação de enzimas envolvidas no processo de contração. Todas essas ações resultam na contração muscular e na manutenção desta contração (MORGADO et al, 2012; THORNEOLE; NELSON, 2005).

Com o objetivo de avaliar se AAL 195 é capaz de induzir vasorrelaxamento após contração induzida por FEN, obteve-se uma curva concentração-resposta para o AAL 195 durante a fase tônica da contração de anéis mesentéricos pré-contraídos com FEN e observou-se que o composto foi capaz de promover efeito vasorrelaxante, de maneira dependente de concentração (Figura 37). Esses dados corroboram com o efeito vasorrelaxante de AAL 195 em anéis mesentéricos de ratos normotensos (SILVA, 2017). No entanto, interessante em ratos normotensos, o vasorrelaxamento máximo foi obtido numa concentração menor (10^{-5} M), comparado aos ratos hipertensos (3×10^{-5} M). A necessidade de uma concentração maior de AAL 195 para promover o mesmo efeito vasorrelaxante em ratos SHR pode ser explicada pelo fato de que artérias de resistência sofrem extensa adaptação biológica e estrutural em resposta à pressão de perfusão intraluminal elevada que ocorre durante a hipertensão crônica, levando ao desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos subjacentes. A repercussão dessas mudanças adaptativas são respostas vasoconstritoras aumentadas e respostas vasodilatadoras atenuadas a vários estímulos fisiológicos, resultando em tônus vascular elevado nas artérias e arteríolas que são expostas a hipertensão arterial persistente (JOSEPH et al, 2013).

O relaxamento da musculatura lisa vascular pode ocorrer através de substâncias que atuam diretamente no músculo ou indiretamente, ao estimular a liberação de fatores do endotélio vascular (GURNEY, 1994). Como já mencionado, o endotélio desempenha um importante papel na regulação e manutenção da homeostase, principalmente no que se refere ao controle do tônus vascular (BUSSE et al., 2002; STANKEVICIUS et al, 2003).

Para avaliar a participação do endotélio no vasorrelaxamento induzido por AAL 195, uma nova curva concentração-resposta foi obtida em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional. Após remoção mecânica do endotélio, não houve alteração no efeito vasorrelaxante de AAL 195, porém a potência farmacológica foi significativamente menor (Figura 37).

Erikly e Lugnier (1994) avaliaram o efeito de inibidores seletivos de PDE4 sobre o conteúdo de nucleotídeos cíclicos e suas interações com o endotélio vascular. Para isso, aortas de ratos foram estudadas na presença de L-NAME e indometacina. Nessas condições, os pesquisadores concluíram que a presença do endotélio pode aumentar o conteúdo de AMPc independente da produção de NO e PGI₂ (ECKLY; LUGNIER, 1994). Esses achados reforçam os resultados encontrados através dos experimentos *in vivo*, em que não houve participação desses fatores relaxantes derivados do endotélio no efeito hipotensor. Como já é descrito que nas células endoteliais ocorre a expressão de PDE4 (KRAVIS; LUGNIER, 2012), provavelmente na presença do endotélio o aumento da potência farmacológica no efeito vasorrelaxante de AAL 195 em anéis mesentéricos de ratos SHR se deve à inibição direta da PDE4 endotelial e isso pode favorecer o efeito vasorrelaxante. No entanto, o mecanismo independente de endotélio apresentou-se majoritário, provavelmente devido a um efeito direto na musculatura lisa arterial. Ademais, essa diferença se deu unicamente em um ponto, que justamente correspondeu a CE₅₀ do efeito de AAL 195, o que provavelmente levou a essa diferença significativa nos valores de pD₂. Diante disso, decidiu-se investigar o mecanismo de ação independente do endotélio vascular no qual AAL 195 poderia induzir vasorrelaxamento diretamente por um efeito sobre o MLV.

Em seguida, para avaliar se o efeito induzido por AAL 195 é dependente de tônus arterial, foram realizados experimentos onde concentrações crescentes

de AAL 195 foram adicionadas ao tônus basal. Como resultado, o tônus basal não foi alterado (Figura 39).

Para descartar a hipótese de que o vasorrelaxamento induzido por AAL 195 ocorre devido a um possível dano tecidual, após a obtenção da curva concentração-resposta foram realizadas sucessivas lavagens para a remoção do AAL 195 das cubas e uma nova contração com FEN foi induzida. Em seguida, observou-se que houve uma total reversão da contração induzida pela FEN, sugerindo que AAL 195 não promove dano à maquinaria contrátil do MLV (Figura 38).

Os canais para K^+ estão intrinsicamente envolvidos nas alterações que envolvem a contratilidade do MLV e o potencial de membrana, bem como na regulação da pressão sanguínea (JACKSON, 2000; LEDOUX et al., 2006). Fisiologicamente, a concentração intracelular de K^+ é elevada em relação ao meio extracelular, portanto a abertura de canais para K^+ permite o efluxo desse íon, induzindo uma alteração no potencial de membrana para valores mais negativos, o que torna a célula hiperpolarizada e como consequência, o relaxamento do MLV (THORNELOE; NELSON, 2005). Em contrapartida, a diminuição da expressão ou inibição da atividade desses canais promove diminuição do efluxo de K^+ , resultando na elevação e despolarização do potencial de repouso celular (HAYABUCHI, 2017).

Devido à importância que os canais para K^+ tem na regulação do tônus vascular, decidiu-se investigar a participação destes canais no efeito vasorrelaxante promovido por AAL 195. Para isso, foi realizada uma curva concentração resposta para o AAL 195, na presença de 5 mM de TEA. Em altas concentrações, o TEA promove o bloqueio, de maneira não seletiva, de canais para K^+ (KO et al, 2008). Sob estas condições, observou-se que o vasorrelaxamento de AAL 195 foi atenuado (Figura 40), o que indica que parte do efeito promovido pelo composto se dá através da ativação de canais para K^+ . De maneira similar, em anéis mesentéricos de ratos normotensos, AAL 195 também demonstrou que os canais para K^+ parecem participar do seu efeito vasorrelaxante.

O mecanismo de ação que envolve canais para K^+ também foi observado no efeito vasorrelaxante de outros inibidores de PDE. Exemplo disso está nos achados de Lo e colaboradores (2005), onde um inibidor de PDE derivado da

teofilina promoveu vasorrelaxamento em aorta de ratos, dentre outras vias, através da ativação de canais para K^+ .

No músculo liso vascular são expressas diferentes classes de canais para K^+ , dentre elas estão os K_{ATP} , os K_v e os K_{Ca} (KO et al, 2008). Todos esses subtipos de canais podem ser ativados pela PKA, enquanto que a PKG ativa apenas os K_{Ca} e os K_{ATP} (LO et al, 2008). Levando em consideração o fato de que a inibição da PDE4 promove, indiretamente, a ativação da PKA (MORGADO et al, 2012), decidiu-se investigar se os canais para K^+ citados estariam envolvidos no efeito vasorrelaxante de AAL 195.

Os K_{ATP} tem como principal característica a redução do efluxo de K^+ na presença de uma alta concentração intracelular de ATP. Diversos estudos mostram que agonistas destes canais promovem a dilatação de arteríolas, isto fornece a evidência de que canais K_{ATP} estão presentes nas células do músculo arteriolar (FOSTER; COETZEE, 2016).

Os canais K_v constituem uma classe expressa de forma ubíqua nas células do MLV. Esses canais são ativados pela despolarização da membrana celular. Fisiologicamente, em artéria mesentérica de ratos, os K_v contribuem para a restauração do potencial de membrana e do tônus vascular (JOSEPH et al, 2013). Substâncias vasodilatadoras que atuam pela via de sinalização do AMPc podem promover a abertura destes canais (JACKSON, 2000). Inclusive, um estudo recente demonstrou a ativação de algumas subclasses de K_v por uma metilxantina (um inibidor não seletivo de PDE), como sendo capaz de promover a elevação das correntes de K^+ (MANI et al, 2016).

Diante disso, foram realizadas curvas concentração-resposta para AAL 195 na presença de glibenclamida, um bloqueador seletivo de K_{ATP} (KO et al, 2008) ou na presença de 4-aminopiridina, um bloqueador seletivo de K_v (THORNELOE; NELSON, 2005). Sob estas condições, observou-se que o efeito vasorrelaxante de AAL 195 foi potencializado tanto na presença de glibenclamida (Figura 41), quanto na presença de 4-aminopiridina (Figura 42). Esses resultados sugerem que os K_{ATP} e os K_v não estão envolvidos nesse efeito vasorrelaxante. Pelo contrário, a atuação desses subtipos de canais parece, de alguma forma, prejudicar o vasorrelaxamento induzido por AAL 195 em condições controle. Quando comparados aos estudos em ratos normotensos, percebe-se que há uma controvérsia quanto à participação dos canais K_v no

efeito vasorrelaxante de AAL 195 (SILVA, 2017). Isso pode ser explicado a partir da constatação de que durante a hipertensão persistente, os canais iônicos na membrana plasmática das células do músculo liso vascular sofrem “remodelação elétrica” de modo que as artérias mantenham um tônus elevado (JOSEPH et al, 2013). Cox e Petrou (1999) realizaram experimentos usando a técnica de patch clamp em células do MLV de artérias mesentéricas de ratos SHR e propuseram que níveis elevados de Ca^{2+} em ratos hipertensos pode inativar os canais K_v , resultando em despolarização da membrana e vasoconstrição arterial.

Os K_{Ca} são subdivididos de acordo com sua condutância em canais para K^+ de grande condutância ativados pelo Ca^{2+} (BK_{Ca}) e canais para K^+ de pequena condutância ativados pelo Ca^{2+} (SK_{Ca}) (WEI et al, 2005). Os BK_{Ca} são canais ativados pelo cálcio e por voltagem e são expressos nas células do MLV, modulando o tônus vascular e o relaxamento dessa musculatura (CLEMENTS; TARENTYEV; SELLKE, 2015). Já os SK_{Ca} são insensíveis à voltagem e são exclusivamente ativados pela baixa concentração de Ca^{2+} intracelular (WEI et al, 2005).

Para investigar a participação dos BK_{Ca} e SK_{Ca} no efeito vasorrelaxante promovido por AAL 195, curvas concentração-resposta para o AAL 195 foram obtidas na presença de 1 mM de TEA, que nessa concentração é um inibidor de BK_{Ca} , ou na presença de apamina, um inibidor de SK_{Ca} (KO et al, 2008). Nestas circunstâncias, o vasorrelaxamento induzido por AAL 195 foi atenuado na presença de 1 mM de TEA (Figura 43), no entanto não houve diferença após bloqueio com apamina (Figura 44). Esses dados sugerem que apenas o BK_{Ca} parece estar participando do efeito vasorrelaxante de AAL 195.

Como já mencionado, a contração do MLV está intimamente relacionada à elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} (WEBB, 2003) decorrente de diferentes mecanismos (THORNELOE; NELSON, 2005). A contração desencadeada após a interação de agonistas específicos com um determinado receptor, como é o caso da FEN, é denominado acoplamento farmacomecânico, onde o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular ocorre através dos ROCs. Em contrapartida, a contração iniciada pelo aumento do cálcio promovido pelos VOCs, por depender da despolarização do potencial de repouso da membrana, é conhecida por acoplamento eletromecânico (SOMLYO; SOMLYO, 1968).

Nesse sentido, para avaliar a resposta de AAL 195 frente às concentrações mediadas por diferentes estímulos, realizou-se uma curva concentração-resposta sobre pré-contracção com a solução despolarizante de KCl 80 mM. Isso porque o aumento na concentração de 4 mM de K^+ para 80 mM promove a despolarização da membrana plasmática, gerando a ativação dos VOCs, e consequentemente, promovendo a contracção (REMBOLD, 1996). Desta forma, observou-se que AAL 195 foi capaz de promover vasorrelaxamento em anéis mesentéricos sem endotélio funcional, pré-contráídos com KCl a 80 mM (Figura 45). Desta forma é possível perceber a inespecificidade do efeito vasorrelaxante de AAL 195, visto que há relaxamento tanto em contracções induzidas pelo acoplamento farmacomecânico (FEN), como pelo acoplamento eletromecânico (KCl 80 mM). Esses resultados também sugerem a participação de canais para Ca^{2+} nesse efeito. Possivelmente AAL 195 promove a diminuição do influxo desse íon, pois em ambas as situações, o resultado do acoplamento é a elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular.

Para comprovar a hipótese de que AAL 195 estaria reduzindo o influxo de Ca^{2+} pela membrana celular, o efeito do composto foi avaliado frente a curvas concentração-resposta ao $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . Nestas condições, a contracção é quase que exclusivamente devido ao influxo de Ca^{2+} pelos VOCs que foram ativados pela elevação do K^+ externo (GODFRAIND; MILLER; WIBO, 1986; SOMLYO; SOMLYO, 1994). Diante disto, constatou-se que concentrações de AAL 195 atenuaram as curvas cumulativas ao $CaCl_2$ (Figura 46). Esse dado sugere que AAL 195 está interferindo no influxo de Ca^{2+} através dos VOCs em artéria mesentérica superior de rato. Esse achado corrobora com o efeito vasorrelaxante de dois alcaloides isolados da planta *Peganum harmala* em aorta de rato em que ambos promoveram seus efeitos através da inibição de PDEs e bloqueio dos VOCs (BERROUGUE et al, 2006).

Com o objetivo de avaliar o subtipo de VOC envolvido no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195, foram induzidas contracções tônicas com S(-)-Bay K 8644, um ativador dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas (ADACHI-AKAHANER; CLEEMANN; MORAD, 1999) e uma nova curva concentração-resposta para AAL 195 foi obtida sob estas condições. Sendo assim, AAL 195 foi capaz de promover vasorrelaxamento em anéis mesentéricos pré-contráídos com S(-)-Bay K 8644 (Figura 47), sugerindo que os canais para

cálcio sensíveis à voltagem do tipo-L estão envolvidos no efeito de AAL 195. Esse dado reforça o resultado obtido através dos experimentos *in vivo* após o bloqueio da nifedipina.

Comparando os parâmetros farmacológicos obtidos em anéis mesentéricos pré-contraídos com FEN ou com KCl 80 mM, como é possível observar na tabela 6, o vasorrelaxamento induzido por AAL 195 mostrou-se mais potente em anéis pré-contraídos com FEN, o que indica uma maior capacidade de relaxamento desse composto em contrações induzidas por esse agonista.

Como mencionado anteriormente, a FEN, ao interagir com os receptores de membrana acoplados à proteína $G_{q/11}$, estimula a formação de IP_3 . Este se liga ao seu receptor na membrana no RS, o IP_3R , ocasionando a abertura desse canal e consequente liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Esse processo desencadeia uma contração fásica no vaso (GURNEY; ALLAM, 1995; HU, 2001).

Alguns achados na literatura demonstram a participação dos receptores presentes no RS no efeito induzido por inibidores de PDE, a exemplo do trabalho de Fujimoto e colaboradores (1998) em que a olprinona, um inibidor de PDE3, promoveu efeito vasorrelaxante em leitos mesentéricos de coelhos através da inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Além disso, Cuññas e colaboradores (2013) realizaram estudos em aorta de rato sem endotélio funcional e comprovaram que o vasorrelaxamento por AMPc é mediado, em parte, por depleção de Ca^{2+} dos estoques intracelulares e pela inibição da entrada capacitiva de cálcio. Ademais, esse estudo ainda demonstrou que a inibição da PDE4 potencializa o efeito vasodilatador por agentes que elevam o AMPc intracelular. Diante dessa informação, questionou-se a participação dos receptores dos estoques intracelulares no efeito vasorrelaxante de AAL 195.

Para avaliar o envolvimento dos IP_3R s nesse efeito, foram pré-incubadas várias concentrações de AAL 195, em meio livre de cálcio. Isso porque na ausência de Ca^{2+} extracelular são observadas apenas as contrações transientes, provenientes dos estoques intracelulares, visto que o influxo de cálcio é requerido para a manutenção da fase tônica da contração do MLV (WANG et al, 2002). Sob estas condições, as contrações transientes induzidas por FEN foram atenuadas de maneira significativa após a pré-incubação com AAL 195 (3×10^{-6} e 3×10^{-5} M) (Figura 48). Portanto, sugere-se que o efeito vasorrelaxante de AAL

195 envolve a inibição dos IP₃Rs. Esse resultado é semelhante ao efeito induzido por AAL 195 em ratos normotensos (SILVA, 2017). Esses resultados também corroboram com os achados de Bai e Sanderson (2006), que, ao investigar o aumento de AMPc em células do músculo liso pulmonar, constataram um efeito relaxante devido a redução da frequência de oscilação de Ca²⁺ por redução da liberação desse íon dos estoques intracelulares, através de receptores de IP₃.

Já é bem descrito na literatura que os IP₃Rs também podem liberar Ca²⁺ induzido pelo Ca²⁺ proveniente do influxo destes pelos VOCs. De maneira similar, os RyRs também podem ser ativados pelo Ca²⁺ (ORALLO, 1996; PROLE; TAYLOR, 2016) ou pela aplicação exógena de cafeína (SEI; GALLAGHER; DALY, 2001), promovendo uma contração transitória no MLV (SANDERSON, 2008). Neste sentido, para avaliar a participação dos RyRs, AAL 195 foi incubado em meio livre de cálcio e observou-se que nenhuma concentração do composto foi capaz de alterar as contrações transientes induzidas pela cafeína (Figura 49), portanto, os receptores de rianodina parecem não estar envolvidos no efeito vasorrelaxante induzido por AAL 195 em anéis mesentéricos de ratos SHR.

Já é descrito na literatura que a PDE4 é uma das responsáveis por regular a função da Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA). A SERCA é um canal de cálcio na membrana reticular sarcoplasmática que funciona como recaptador de cálcio para o estoque intracelular. Sua atividade é inibida pela fosfolambam, que por sua vez pode ser fosforilada pela PKA, reduzindo sua influência inibitória, levando ao aumento da atividade da SERCA (FERTING; BAILLIE, 2018). Diante destas informações, decidiu-se avaliar a participação da SERCA no efeito vasorrelaxante de AAL 195. Para isso, foi obtida uma nova curva concentração-resposta para o composto na presença de tapsigargina, um inibidor da SERCA (CERON; BENDHACK, 1998). Sob estas condições, observou-se uma redução da potência farmacológica no efeito induzido por AAL 195 após bloqueio com tapsigargina (Figura 50). Isso sugere que a recaptção do cálcio para os estoques intracelulares através da ativação da SERCA influencia o efeito vasorrelaxante de AAL 195.

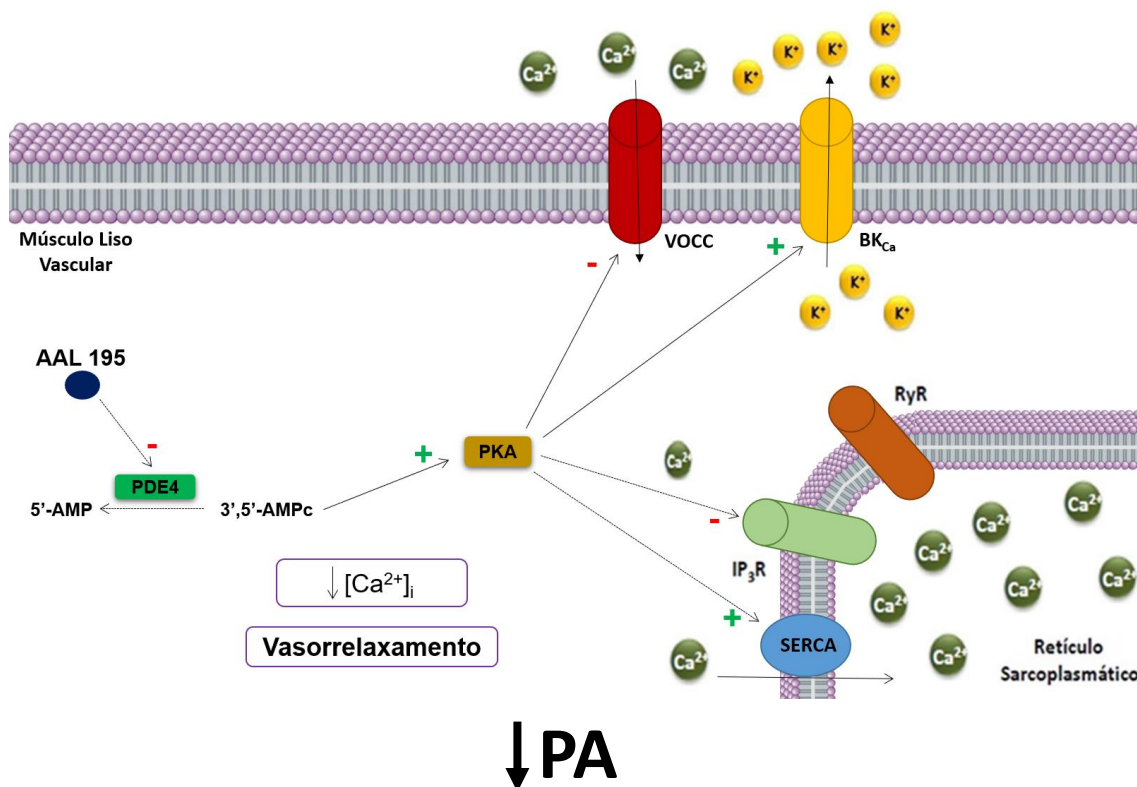
A inibição da PDE 4 promove o relaxamento da musculatura lisa através da elevação dos níveis de AMPc intracelular (LUGNIER, 2006). A concentração aumentada de AMPc, por sua vez, ativa a PKA para desempenhar suas funções

celulares (MORGADO et al, 2012). Com base nesse conhecimento, realizou-se uma nova curva concentração-resposta para o AAL na presença de KT 5720, um bloqueador seletivo da PKA (LIN et al, 2010). Sendo assim, observou-se que na presença desse bloqueador houve uma redução significativa da potência e da eficácia farmacológica no efeito induzido por AAL 195 (Figura 51). Portanto, sugere-se que a ativação da PKA está envolvida no efeito vasorrelaxante de AAL 195.

No MLV a ativação da PKA promove efeito vasorrelaxante através de mecanismos, como: redução do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular através de canais iônicos; aumento da receptação e diminuição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares; redução da sensibilidade dos filamentos contráteis ao Ca^{2+} e ativação de canais para K^{+} (CUÍÑAS et al, 2013; MORGADO et al, 2012). Portanto, os resultados até aqui demonstrados em artéria mesentérica superior de ratos SHR confirmam que o efeito vasorrelaxante de AAL 195 envolve os mecanismos mediados pelo aumento do AMPc intracelular, consequência da inibição da PDE4, no entanto são necessários mais estudos para melhor elucidar os mecanismos que envolvem esse efeito.

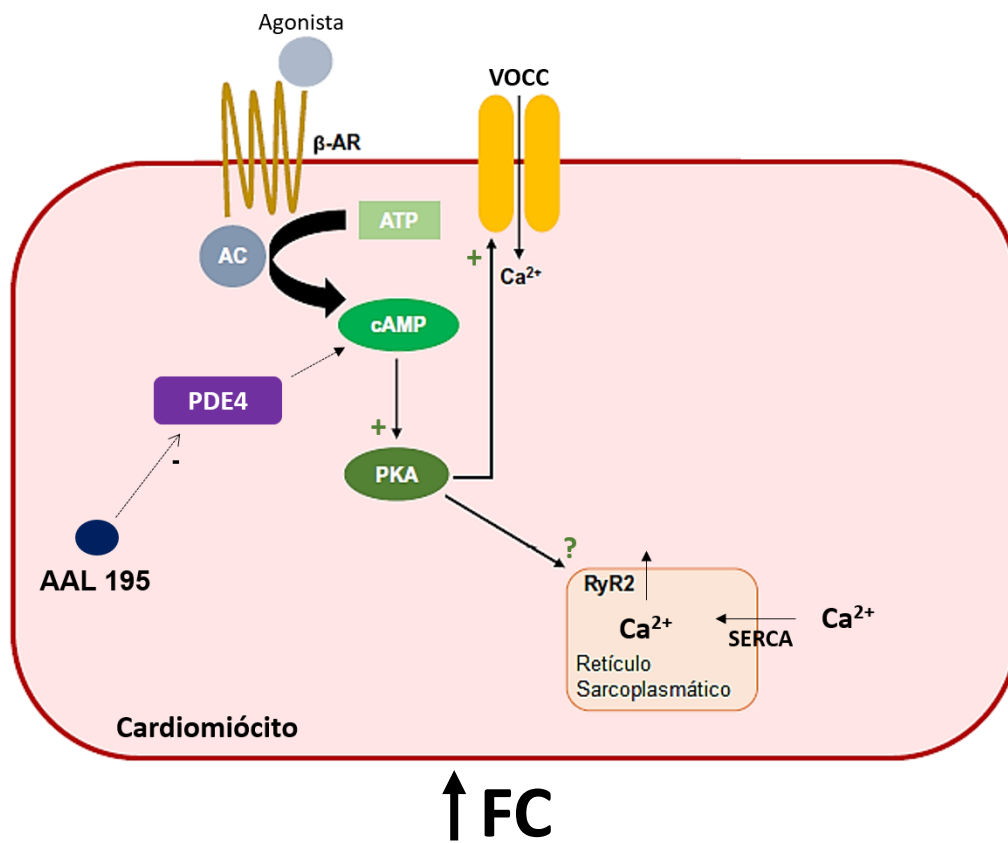
As figuras 52 e 53 correspondem, respectivamente, às representações esquemáticas dos mecanismos de ação à nível vascular e cardíaco até aqui apresentados por AAL 195 em ratos SHR.

Figura 52 – Representação esquemática da provável via de sinalização do efeito vasorrelaxante induzido AAL 195 em artéria mesentérica superior de ratos SHR que resulta na redução da pressão arterial.



No MLV, AAL 195 inibe a PDE4, promovendo o aumento dos níveis de AMPc intracelular. O AMPc ativa a PKA, que por sua vez promove a diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{2+} através da redução do influxo de Ca^{2+} pelos VOCCs, inibição da mobilização de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e ativação de canais para K^+ (Fonte: AUTOR, 2022).

Figura 53 – Representação esquemática da provável via de sinalização do efeito cardíaco induzido AAL 195 ratos SHR.



A ativação simpática leva à sinalização β -adrenérgica no miócito cardíaco. Quando o receptor β -adrenérgico (β -AR) é ativado, sua proteína G_s associada causa a ativação da adenilato ciclase (AC), que por sua vez, catalisa a produção de AMPc a partir do ATP. AAL 195 inibe a PDE4, contribuindo para a manutenção dos níveis elevados de AMPc intracelular. O AMPc ativa a PKA, que por sua vez promove aumento os níveis intracelulares de Ca^{2+} através da ativação dos VOCCs. Provavelmente a PKA também aumenta a hiperfosforilação dos receptores de rianodina (RyR), mas esse mecanismo não foi estudado (Fonte: AUTOR, 2022).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que o inibidor de PDE4 AAL 195 promove efeito hipotensor, provavelmente devido à diminuição da resistência vascular periférica total, bem como efeito vasorrelaxante. Esse efeito se mostrou inespecífico e parece estar relacionado à estimulação de canais BK_{Ca} , à redução do influxo de Ca^{2+} por meio da inibição dos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo-L, pela inibição da liberação de Ca^{2+} pelos receptores de IP_3 e aumento da recaptção de Ca^{2+} pela SERCA nos estoques intracelulares, bem como à ativação da PKA. AAL 195 também apresentou efeito anti-hipertensivo.

Por outro lado, AAL 195 promoveu efeito taquicárdico, provavelmente devido à inibição da PDE4 nos cardiomiócitos. Esse efeito se repete em outros inibidores específicos dessa isoforma de PDE, o que representa um desafio no manejo clínico desses fármacos.

Contudo, AAL 195 revela efeitos cardiovasculares significativos, caracterizando uma molécula com alto potencial para a redução da pressão arterial. Sendo necessários mais experimentos para melhor caracterizar seus efeitos cardiovasculares e colaterais, bem como a segurança no seu uso para fins terapêuticos. Além disso, AAL 195 representa uma importante ferramenta farmacológica para os estudos relacionados à inibição da PDE4.

9 PERSPECTIVAS

- Avaliar os efeitos cronotrópicos e inotrópicos de AAL 195 em preparações de átrios isolados de ratos SHR;
- Avaliar a inibição da PDE4 e suas isoformas por AAL 195 através de docking molecular;
- Avaliar efeito anti-hipertensivo do AAL 195 através de pletismografia de calda;
- Avaliar o perfil farmacocinético de AAL 195 em modelo *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADACHI-AKAHANE, S.; CLEEMANN, L.; MORAD, M. BAY K 8644 modifies Ca^{2+} cross signaling between DHP and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. **Am J Physiol**, v. 276, p. H1178-H1189, 1999.
- AHMAD, F. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase: important signaling modulators and therapeutics targets. **Oral Diseases**, v. 21, n. 1, p. 25-50, 2015.
- AKHTAR, W. et al. The therapeutic journey of pyridazinone. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 256-281, 2016.
- AL-KURASHY, H. M. et al. COVID-19 and phosphodiesterase enzyme type 5 inhibitors. **The Journal of Microscopy & Ultrastructure**, v. 8, n. 4, p. 141-145, 2020.
- AL-KURASHY, H. M. et al. Vinpocetine is the forthcoming adjuvant agent in the management of COVID-19. **Future Science OA**, v. 8, n. 5, p. 1-8, 2022.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970.
- ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. Structural optimization of 6-aryl pyridazin-3-ones as novel potent PDE4 inhibitors. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 744-751, 2015.
- AZEVEDO, L. L.; KÜMMERLE, A. E. Inibidores da PDE4: da descoberta e fracasso anunciado ao seu ressurgimento. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 465-494, 2015.
- AZEVEDO, M. F. et al. Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 2, p. 195-233, 2014.
- BAI, Y; SANDERSON, M. J. Airway smooth muscle relaxation results from a reduction in the frequency of Ca^{2+} oscillations induced by a cAMP-mediated inhibition of the IP3 receptor. **Respiratory Research**, v. 7, n. 34, p. 1-20, 2006.

BANOGLU, E. et al. Amine derivatives of [6-(5-Methyl-3-phenylpyrazole-1-yl)-3(2H)-pyridazinone-2-yl]acetic acids as potential analgesic and anti-inflammatory compounds. **Arch der Pharmazie**, v. 337, p. 7-14, 2004.

BARROSO, W. K. S. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 116, n. 3, p. 516-658, 2021.

BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiological reviews**, v. 75, n. 4, p. 725–748, 1995.

BEAVO, J. A.; REIFSNYDER, D. H. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 11, n. 4, p. 150–5, abr. 1990.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 488–520, set. 2006.

BERDEAUX, A.; GIUDICELLI, J. F. Antihypertensive drugs and baroreceptor reflex control of heart rate and blood pressure. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 1, n. 4, p. 257-282, 1987.

BERRIDGE, M. J. Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1742, p. 3-7, 2004.

BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signaling. **Journal of Physiology**, v. 499, n. 2, p. 291-306, 1997.

BILLINGTON, C. K. et al. cAMP regulation of airway smooth muscle function. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 112-120, 2013.

BOBIN, P. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: a therapeutic perspective. **Archives of Cardiovascular Disease**, v. 109, p. 431-443, 2016.

BORTOLOTTI, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. **Rev Bras Hipertens**, v. 16, n. 4, p. 215-220, 2009.

BOSWELL-SMITH, V.; SPINA, D.; PAGE, C. Phosphodiesterase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S252-S257, 2006.

BROWN, I. A. M. et al. Vascular smooth muscle remodeling in conductive and resistance arteries in hypertension: VSMC in hypertension. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 38, n. 9, p. 1969-1985, 2018.

BROWN, K. E. et al. Potential therapeutic role of phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension and chronic kidney disease. **Hypertension**, v. 63, n. 1, p. 5-11, 2014.

BROZOVICH, F. V. et al. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. **Pharmacol Rev**, v. 68, p. 476-532, 2016.

BRUNNING, T. A. et al. *In vivo* characterization of vasodilating muscarinic receptors in humans. **Cir Res**, v. 74, p. 912-919, 1994.

BUNDY, J. D. et al. Systolic blood pressure reduction and risk of cardiovascular disease and mortality: a systematic review and network meta-analysis. **JAMA Cardiol**, v. 2, n. 7, p. 775-781, 2017.

BUSSE, R. et al. EDHF: bringing the concepts together. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 374-380, 2002.

CHEN, C. H. et al. Effects of pimobendan and its active metabolite, UD-CG 212 Cl, on Ca²⁺-activated K⁺ channels in vascular smooth-muscle cells. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 30, n. 6, p. 739-743, 1997.

CHEN, S.; YAN, C. An update of cyclic nucleotide phosphodiesterase as a target for cardiac diseases. **Expert Opin Drug Discov**, v. 16, n. 2, p. 183-196, 2021.

CERON, P. I. B.; BENDHACK, L. M. Alterations of calcium uptake in renovascular hypertensive rat aorta: functional assessment with thapsigargin, **Gen. Pharmacol**, v. 31, n. 2, p. 265-270, 1998.

CHONG, J.; LEUNG, B.; POOLE, P. Phosphodiesterase 4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, 2013.

CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 131, p. 1047-1058, 2007.
CLARK, S.J; FUCHS, L.C. Role of nitric oxid and Ca^{2+} - dependent K^{+} channels in mediating heterogenous microvascular responses to acetylcholine in different vasculas beds. **J. Pharmacol Exper Ther**, v. 282, n. 3, p. 1473-1479, 1997.

CLEMENTS, R. T.; TERENCEV, D.; SELLKE, F. W. Ca^{2+} -activated K^{+} channels as therapeutic targets for myocardial and vascular protection. **Circulation Journal**, v. 79, p. 455-462, 2015.

CONCEIÇÃO-VERTAMATTI, A. G. et al. History of vascular reactivity models and their involvement in hypertension pathogenesis. **Vasa**, v. 46, n. 6, p. 431-439, 2017.

CONTI, M. et al. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 370-389, 1995.

CONTI, M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 14, n. 9, p. 1317–27, set. 2000.

CONTI, M.; BEAVO, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 481-511, 2007.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: Target of sildenafil. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 20, p. 13729–13732, 1999.

COX, R. H.; PETROU, S. Ca^{2+} influx inhibits voltage-dependent and augment Ca^{2+} -dependent K^{+} currents in arterial myocytes. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. C51-C63, 1999.

CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: multiple functions. **Cell Calcium**, v. 40, n. 20, p.221-230, 2006.

CUÍÑAS, A. et al. Cyclic AMP relaxation of rat aortic smooth muscle is mediated in part by decrease of depletion of intracellular Ca^{2+} stores and inhibition of capacitative calcium entry. **Vascular Pharmacology**, v. 58, n. 1-2, p. 98–104, 2013.

DALAMARA, M.; KARAMPELA, I.; MANTZOROS, C. S. Commentary: phosphodiesterase 4 inhibitors as potencial adjunct treatment targeting the cytokine storm in covid-19. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 109, p. 1-3, 2020.

DAVIE, C. S.; KUBO, M.; STANDEN, N. B. Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries. **Br J Pharmacol**, v. 125, n. 8, p. 1715-1725, 1998.

DINIZ-FILHO, A. et al. Efeitos cardiovasculares e midriáticos da fenilefrina tópica a 2,5 e a 10,0% em voluntários sadios. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 6, p. 961-966, 2007.

DOLPHIN, A. C. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. **J Physiol**, v. 594, n. 19, p. 5369-5390, 2016.

DORNAS, W. C; SILVA, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. **J Biosci**, v. 36, p. 731-737, 2011.

DORWARD, P. K. et al. The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. **Circ Res**, v. 57, p. 618-633, 1985.

DUBEY, S.; BHOSLE, P. A. Pyridazinone: an important element of pharmacophore possessing broad spectrum of activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 10, p. 3379-3598, 2015.

DUNKERLY-EYRING, B.; KASS, D. A. Myocardial phosphodiesterases and their role in cGMP regulation. **J Cardiovasc Pharmacol**. v. 75, n. 6, p. 483-493, 2020.

ECKLY, A.; LUGNIER, C. Role of phosphodiesterases III and IV in the modulation of vascular cyclic AMP content by the NO/cyclic GMP pathway. **Br J Pharmacol**. v. 113, p. 445-450, 1994.

EL TABAA, M. M.; EL TABAA, M. M. New putative insights into neprilysin (NEP)-dependent pharmacotherapeutic role of roflumilast in treating COVID-19. **European Journal of Pharmacology**, v. 889, p. 1-14, 2020.

ERCU, M. et al. Phosphodiesterase 3A and arterial hypertension. **Circulation**, v. 142, p. 133-149, 2020.

ESKANDARI, N. et al. A short review on structure and role of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase 4 as a treatment tool. **Journal of Research in Pharmacy Practice**, v. 4, p. 175-181, 2015.

EVORA, P. R. B. et al. Endotélio e óxido nítrico: história, fisiologia e as primeiras observações relacionadas com a hipertensão arterial. **Hiper. Ativo**, v. 2, n. 2, p. 1-20, 1995.

FAZAN, V. P. S. et al. Ratos espontaneamente hipertensos e neuropatias periféricas. **Medicina**, v. 39, n. 1, p. 39-50, 2006.

FERTING, B. A.; BAILLIE, G. S. PDE4-mediated cAMP signalling. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 5, p. 1-14, 2018.

FLUCKINGER, J. P. et al. Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **Eur J Pharmacol**, v. 109, p. 105-109, 1985.

FOSTER, M. N.; COETZEE, W. A. K_{ATP} Channels in the cardiovascular system. **Physiology Review**, v. 96, p. 177-252, 2016.

FRANCIS, S. H.; BLOUNT, M. A.; CORBIN, J. D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. **Physiological reviews**, v. 91, n. 2, p. 651-690, 2011.

FREIS, E. D. Hemodynamics of hypertension. **Physiol Ver.** v. 40, p. 27-54, 1960.

FUJIMOTO, S. et al. Vasorelaxant effect of olprinone, an inhibitor of phosphodiesterase 3, on mesenteric small artery and vein of rabbits. **European Journal of Pharmacology**, v. 353, p. 239-246, 1998.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GALICIA, J. V. et al. Antihypertensive and vasorelaxant activities of *Laelia autumnalis* are mainly through calcium channel blockade. **Vascular Pharmacology**, v.49, p. 26-31, 2008.

GARCIA, M. L.; KACZOROWSKI, G. J. High conductance calcium activate potassium channels: molecular pharmacology, purification and regulation. In: Weston, A. H., Hamilton, T. C. **Potassium Channel Modulators**. Blackwell, Oxford, 76-109, 1992.

GHEIBI, S. et al. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: implications in hypertension. **Biochem Pharmacol.** v. 149, p. 42-59, 2018.

GIEMBYCZ, M. A. Life after PDE4: overcoming adverse events with dual-specificity phosphodiesterase inhibitors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 238-244, 2005.

GIORGI, M. et al. Phosphodiesterase inhibitors: could they be beneficial for the treatment of COVID-19? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1-11, 2020.

GODFRAIND, T.; MILLER, R.; WIBO, M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. **Pharmacol**, v. 38, p. 321-416, 1986.

GRGIC, I. et al. Endothelial Ca⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses—relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 4, p. 509-526, 2009.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilatation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242-251, 1994.

GURNEY, A. M.; ALLAM, M. Inhibition of calcium release from the sarcoplasmic reticulum of rabbit aorta by hydralazine. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 238-244, 1995.

HAGIWARA, S.; MITSUI, M.; KARAKI, H. Effects of felodipine, nifedipine and verapamil on cytosolic Ca^{2+} and contraction in vascular smooth muscle. **Eur J Pharmacol**, v. 234, n. 1, p. 1-7, 1993.

HAYABUCHI, Y. The action of smooth muscle cell potassium channels in the pathology of pulmonary arterial hypertension. **Pediatric Cardiology**, v. 38, p. 1-14, 2017.

HIRANO, K. et al. Protein kinase network in the regulation of phosphosrylation and desphosphorylation of smooth muscle myosin light chain. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 248, p. 105-114, 2003.

HIRANO, K.; HIRANO, M.; KANAIDE, H. Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 40, n. 6, p. 219-236, 2004.

HOUSLAY, M. D.; SCHAFER, P.; ZHANG, K. Y. J. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 22, p. 1503–1519, 2005.

HOUSLAY, M. D; BAILLIE, G. S.; MAURICE, D. H. cAMP-specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalizes cAMP signaling. **Circulation Research**, v. 100, p. 950-966, 2007.

HU, C. M. et al. Mechanisms underlying the induction of vasorelaxation in rat thoracic aorta by sanguinarine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, p. 47-53, 2001.

HUANG, Y.; KWOK, K. H. Effects of putative K^+ channel blockers on beta-adrenoceptor-mediated vasorelaxation of rat mesenteric artery. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 515-519, 1997.

HUBERT, F. et al. Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 5361-5375, 2014.

HUYNH, D. T. N.; HEO, K. S. Therapeutic targets for endothelial dysfunction in vascular diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, p. 848-861, 2019.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, parte 2, p. 173-178, 2000.

JOHNSON, J. D.; SNYDER, C. H. Calcium regulation of smooth muscle contractile proteins. **Advances in Second Messenger Phosphoprotein Research**. Philadelphia, v. 30, p. 153-174, 1995.

JONES, D. W. et al. Management of stage 1 hypertension in adults with a low 10-year risk for cardiovascular disease: filling a guidance gap. **Hypertension**, v. 77, p. e58-e67, 2021.

JOSEPH, B. K. et al. Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: implications for novel therapeutic approaches. **Pharmacological Research**, v. 70, p. 126-138, 2013.

JUILFS, D. M., et al. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 135, p. 67-104, 1999.

KABMANN, M. et al. Role of ryanodine type 2 receptors in elementary Ca^{2+} signaling in arteries and vascular adaptive responses. **J Am Heart Assoc.**, v. 8, p. 1-20, 2019.

KHALIL, R. A. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction in hypertension. **High Blood Pressure Council Newsletter**, v. 2, n. 1, Spring, 2001.

KE, H. Implications of PDE4 structure on inhibitor selectivity across PDE families. **International journal of impotence research**, v. 16 Suppl 1, p. S24–S27, 2004.

KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, p. 1288-1305, 2012.

KLUSSMANN, E. Protein-protein interactions of PDE4 family members – functions, interactions and therapeutics value. **Cellular Signalling**. v. 28, p. 713-718, 2016.

- KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In: BÁRANY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego, Academic Press, p. 203-219, 1996.
- KO, E. A. et al. Pathophysiology of voltage-gated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells: Modulation by protein kinases. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 103, p. 95–101, 2010.
- KO, E. A. et al. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.
- KRIEGER, E. M.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, J. E. Fisiopatologia da hipertensão. **Revista da Sociedade de Cardiologia**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 1999.
- KRIER, M. et al. Design of small-sized libraries by combinatorial assembly of linkers and functional groups to a given scaffold: Application to the structure-based optimization of a phosphodiesterase 4 inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 3816–3822, 2005.
- KUKOVETZ, W. R.; PÖCH, G. Inhibition of cyclic-3',5'-nucleotide-phosphodiesterase as a possible mode of action of papaverine and similarly acting drugs. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 267, p. 189-194, 1970.
- LEDOUX, J. et al. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 69-78, 2006.
- LEE, J. S. et al. Efficacy and safety of roflumilast in Korean patients with COPD. **Yonsei Medical Journal**, v. 57, n. 4, p. 928-935, 2016.
- LEE, L. C. Y.; MAURICE, D. H.; BAILLIE, G. S. Targeting protein-protein interactions within the cyclic AMP signaling system as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 451-464, 2013.
- LERMAN, L. O. et al. Animal models of hypertension: a scientific statement from the American heart association. **Hypertension**, v. 73, n. 6, p. e87-e120, 2019.
- LI, Q. et al. Pharmacokinetics of roflumilast and its active metabolite roflumilast n-oxide in healthy Chinese subjects after single and multiple oral doses. **Europe**

Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, p. 1-11, 2016.

LIFTON, R. P.; GHARAVI, A. G.; GELLER, D. S. Molecular mechanisms of human hypertension. **Cell**. v. 104, p. 545-556, 2001.

LIN, Y. L. et al. Baicalin, a flavonoid from *Scutellaria baicalensis* Georgi, activates large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels via cyclic nucleotide-dependent protein kinases in mesenteric artery. **Phytomedicine**, v. 17, p. 760-770, 2010.

LIPWORTH, B. J. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**. v. 365, p. 167-175, 2005.

LO, Y. et al. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxation by a theophylline derivative MCPT: roles of cyclic nucleotides, potassium channel opening and phosphodiesterase inhibition. **Life Sciences**, v. 76, p. 931-944, 2005.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 109, n. 3, p. 366–398, 2006.

LUGNIER, C. PDE inhibitors: a new approach to treat metabolic syndrome? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, p. 698-706, 2011.

MACHADO, N. T. **Efeitos cardiovasculares de um novo doador de óxido nítrico, 12-nitrato-*cis*-9-octadecanoato de etila (NCOE), em ratos**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2013.

MAGDER, S. The meaning of blood pressure. **Magder Critical Care**. v. 22, n. 257, p. 1-10, 2018.

MANI, B. K. et al. $\text{K}_{\text{v}}7.5$ potassium channel subunits are the primary targets for PKA-dependent enhancement of vascular smooth muscle $\text{K}_{\text{v}}7$ currents. **Molecular Pharmacology**, v. 89, p. 323-334, 2016.

MAURICE, D. H. et al. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, p. 290-314,

2014.

MAZUREK, R. et al. Vascular cell in blood vessel wall development and disease. **Adv. Pharmacol.**, v. 78, p. 323-350, 2017.

MCFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British journal of pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 1–13, 2002.

McHALE, N. et al. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 570, p. 23-28, 2006.

MILLER, C. L.; YAN, C. Targeting cyclic nucleotide phosphodiesterase in heart: therapeutic implications. **J Cardiovasc Transl Res.** v. 3, n. 5, p. 507-515, 2010.

MERGIA, E.; STEGBAUER, J. Role of phosphodiesterase 5 and cyclic GMP in hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 18, n. 39, p. 1-8, 2016.

MITCHELSON, F. Heterogeneity in muscarinic receptors: evidence from pharmacological studies with antagonists. **Trends Pharmacol Sci**, (suppl. 5): 12–16, 1984.

MOMBOULI, J.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 252-256, 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine - nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, 29: 2002–2012, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONTAÑO, L. M. et al. Theophylline: old drug in a new light, application in COVID-19 through computational studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 1-18, 2022.

MORGADO, M. et al. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 247-266, 2012.

MOSTAFA-HEDEAB, G. et al. A raising dawn of pentoxifylline in management of inflammatory disorders in Covid-19. **Inflammopharmacology**, v. 30, p. 799-809, 2022.

MOTTA, N. A. V. et al. Could cilostazol be beneficial in COVID-19 treatment? Thinking about phosphodiesterase-3 as a therapeutic target. **International Immunopharmacology**, v. 92, p. 1-12, 2021.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, n. 1, p. 19-26, 1977

MUNZEL, T. et al. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by cyclic guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. **Circulation**, v. 108, p. 2172-2183, 2003.

NELSON, M. T. et al. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. **Nature**, v. 344, p. 770-773, 1990.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **The American Journal of Physiology**, v. 268, p. C799–C822, 1995.

NEVES, J. A.; NEVES, J. A.; OLIVEIRA, R.C.M. Biomarkers of endothelial function in cardiovascular diseases: hypertension. **J Vasc Bras**, v. 15, n. 3, p. 224-233, 2016.

NEWTON, R. P.; SMITH, C. J. Cyclic nucleotides. **Phytochemistry**, v. 65, n. 17, p. 2423–2437, 2004.

NGUYEN, H. O. et al. The PDE4 inhibitor tanimilast blunts proinflammatory dendritic cell activation by SARS-CoV-2 ssRNAs. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1-12, 2022.

NOBRE, F. et al. Hipertensão arterial sistêmica primária. **Medicina**, v. 46, n. 3, p. 256-272, 2013.

NURMINEN, M. L.; VAPAATALO, H. Effect of intracerebroventricular and intravenous administration of nitric oxide donors on blood pressure and heart rate in anaesthetized rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 1422-1426, 1996.

OGUT, O.; BROZOVICH, F. V. Regulation of force in vascular smooth muscle. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, n. 4, p. 347–355, 2003.

OKABE, K.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 409, p. 561-568, 1987.

OLIVEIRA, A. P. **Efeitos cardiovasculares do diterpeno Labdano-302 - estudo em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME)**. 2008. 160 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2008.

OMORI, K.; KOTERA, J. Overview of PDEs and their regulation. **Circulation Research**, v. 100, p. 309-327, 2007.

OPARIL, S. et al. Hypertension. **Nat Rev Dis Primers**. v. 4, n. 18014, 2018.

ORALLO, F. et al. Implication of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition in the vasorelaxant activity of the citrus-fruits flavonoid (+/-)-naringenin. **Planta medica**, v. 71, n. 2, p. 99–107, fev. 2005.

ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, p. 153-171, 1996.

OTERO, C. et al. Temporal and spatial regulation of cAMP signaling in disease: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, p. 593-607, 2014.

PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Mecanismos de contração do músculo liso vascular. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005.

PERRY, M. J.; HIGGS, G. A. Chemotherapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors. **Current opinion in chemical biology**, v. 2, n. 4, p. 472–81, 1998.

PILOWSKY, P. M.; GOODCHILD, A. K. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. **J Hypertension**, v. 20, p. 1675-1688, 2002.

PREEDY, M. E. J. Cardiac cyclic nucleotide phosphodiesterases: roles and therapeutic potential in heart failure. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 34, p. 401-417, 2020.

PROLE, D. L.; TAYLOR, C. W. Inositol 1,4,5-triphosphate receptors and their protein partners as signalling hubs. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 11, p. 2849-2866, 2016.

QUEIROZ, T. M. **Avaliação da atividade vasorrelaxante da alga marinha brasileira *Dictyota pulchella* Hörnig & Schnetter em ratos normotensos**. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2011.

RAHIMI, R. et al. A review of the herbal phosphodiesterase inhibitors; Future perspective of new drugs. **Cytokine**, v. 49, n. 2, p. 123–129, 2010.

RAO, Y. J.; XI, L. Pivotal effects of phosphodiesterase inhibitors on myocyte contractility and viability in normal and ischemic hearts. **Acta Pharmacol Sin**, v. 30, n. 1, p. 1-24, 2009.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BARANY, M. **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. Academic Press, p. 227-237, 1996.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**. v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.

ROGLIANI, P. e al. Drug safety evaluation of roflumilast for the treatment of COPD: a meta-analysis. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 20, p. 1-14, 2016.

ROMERO-MARTÍNEZ, B. S. et al. Possible beneficial actions of caffeine in SARS-CoV-2. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 22, n. 11, p. 1-12, 2021.

ROWAIYE, O. O.; JANKOWSKA, E. A.; PONIKOWSKA, B. Baroreceptor sensitivity and diabetes mellitus. **Cardiology Journal**, v. 20, n. 5, p. 453-463, 2013.

RUTH, P. Cyclic GMP-dependent protein kinases understanding in vivo functions by gene targeting. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, n. 2-3, p. 355–372, 1999.

RYBALKIN, S. D. et al. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. **Circulation Research**, v. 93, p. 280-291, 2003.

SAH, P.; FABER, E. S. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 345-353, 2002.

SANDERSON, M. J. et al. Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca²⁺ signaling and sensitivity. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 5, n. 1, p. 23–31, 2008.

SANJULIANI, A. F. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. **Revista SOCERJ**, v. XV, n. 4, p. 210-218, 2002.

SANTANIELLO, A.; VIGONE, B.; BERETTA, L. Letter to the editor: immunomodulations by phosphodiesterase-4 inhibitor in COVID-19 patients. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 110, p. 1-2, 2020.

SCHICK, M. A.; SCHLEGEL, N. Clinical implication of phosphodiesterase-4-inhibition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 1-19, 2022.

SEI, Y., GALLAGHER, K. L.; DALY, J. W. Multiple effects of caffeine on Ca²⁺ release and influx in human B lymphocytes. **Cell Calcium**, v. 29, n. 3, p. 149-160, 2001.

SERRANO, F.; RENTE, A.; TOMAZ, D. Benefício de objetivos mais exigentes de pressão arterial sistólica no tratamento da hipertensão: uma mudança de paradigma na prevenção de doença cardiovascular e de mortalidade. **Ver Port Med Geral Fam**, n. 34, p. 110-112, 2018.

SIEGEL, G. **Comprehensive Human Physiology**, v. 2. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

SILVA, F. V. et al. Identificação de pacientes com hipertensão resistente e pseudoresistente em uma unidade de saúde da família. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 29, p. 220-225, 2017.

SILVA, J.C.G. **Investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante de AAL 195, um inibidor de Fosfodiesterase 4, em artéria mesentérica superior de ratos**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2017.

SINGH, Y. et al. A European pharmacotherapeutic agent roflumilast exploring integrated preclinical and clinical evidence for SARS CoV-2 mediated inflammation to organ damage. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 88, n. 8, p. 3562-3565, 2022.

SIQUEIRA, A. S. E.; SIQUEIRA-FILHO, A. G.; LAND, M. G. P. Análise do impacto econômico das doenças cardiovasculares nos últimos cinco anos no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 01, 39-46, 2017.

SMITH, S. A.; NEWBY, A. C.; BOND, M. Ending restenosis: inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by cAMP. **Cells**, v. 8, p. 1-28, 2019.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231–6, 17 nov. 1994.

SOMLYO, A. V; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 159, n. 1, p. 129–45, jan. 1968.

STANKEVIČIUS, E. et al. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina**. v. 39, n. 4, p. 333-341, 2003.

STAUSS, H. M. Baroreceptor reflex function. **Am J Regulatory Integrative Comp Physiol**, v. 283, p. R284-R286, 2022.

STEVENS, B. et al. Os custos das doenças cardíacas no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 111, n. 1, p. 29-36, 2018.

SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World Journal of Cardiology**. v. 7, n. 11, p. 719-741, 2015.

SUGIN LAL JABARIS, S.; RANJU, V. Scope of adjuvant therapy using roflumilast, a PDE-4 inhibitor against COVID-19. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 66, p. 1-6, 2021.

TAKAHASHI, T.; OWYANG, C. Characterization of vagal pathways mediating gastric accommodation reflex in rats. *J Physiol*, 504 (2): 479-488, 1997.

TANAKA, T. et al. Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. **Pharmacology**. v. 36, n. 5, p. 313-320, 1988.

TANAKA, Y. et al. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1602-1608, 1999.

TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 572, p. 617-624, 2006.

THOMAS, G. D. Neural control of the circulation. **Adv Physiol Educ**, v. 35, n. 1, p. 28-32, 2011.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 215-242, 2005.

TOUYZ, R. M. et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular Research**. v. 114, p. 529-539, 2018.

TSAI, E. J.; KASS, D. A. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, p. 216-238, 2009.

TU, H.; ZHANG, D.; LI, Y. Cellular and molecular mechanisms underlying arterial baroreceptor remodeling in cardiovascular diseases and diabetes. **Neurosci. Bull.**, v. 35, n. 1, p. 98-112, 2019.

TYKOCKI, N. R.; BOERMAN, E. M.; JACKSON, W. F. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. **Comprehensive Physiology**, v. 7, p. 485-581, 2017.

VAN DER MEY, M. et al. Synthesis and structure-activity relationships of cis-tetrahydrophthalazinone/pyridazinone hybrids: a novel series of potent dual

PDE3/PDE4 inhibitory agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 2008-2016, 2003.

VIRANI, S. S. et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 143, n. 8, p. e254-e743, 2021.

WALDKIRCH, E. S. et al. Expression of Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Isoforms in Human Cavernous Arteries: Functional Significance and Relation to Phosphodiesterase Type 4. **The Journal of Sexual Medicine** v. 7, p. 2104-2111, 2010.

WANG, G. J. et al. Ca²⁺ channel blocking effect of iso-S-petasin in rat aortic smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 445, p. 239-245, 2002.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Edu**, v. 27, p. 201-206, 2003.

WEI, A. D. et al. International union of pharmacology. LII. Nomenclature and molecular Relationships of calcium-activated potassium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 463-472, 2005.

WRAY, S.; BURDYGA, T. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. **Physiological reviews**, v. 90, n. 1, p. 113–178, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults. Geneva: World Health Organization, 2021.

YUGAR-TOLEDO, J. C. et al. Posicionamento brasileiro sobre hipertensão arterial resistente – 2020. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 114, n. 3, p. 576-596, 2020.

ZACCHIA, M. et al. Potassium: From Physiology to clinical implications. **Kidney Diseases**. v. 2, p. 72-79, 2016.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. Vascular nitric oxide: beyond eNOS. **J Pharmacol Sci**. v. 129, n. 2, p. 83-94, 2015.

ZICHA, J. et al. The Interaction of calcium entry and calcium sensitization in the control of vascular tone and blood pressure of normotensive and hypertensive rats. **Physiol Res.** v. 63, p. S19-S27, 2014.

ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Utilização em Animais da UFAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

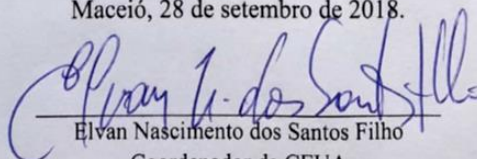


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Efeitos cardiovasculares de AAL 195, um inibidor de fosfodiesterase 4, em ratos espontaneamente hipertensos*”, registrada com o nº **15/2018**, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Dra. Êurica adélia Nogueira Ribeiro**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, 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), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 14 de setembro de 2018.

Vigência da autorização	01.10.2018 a 31.03.2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar Rato isogênico / SHR
Nº de animais	15 280
Peso/idade	200 a 250 g / 7-8 semanas (ambas as espécies)
Sexo	Machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério setorial do Laboratório de Farmacologia Vascular – Esenfar - Ufal
Colaboradores	Jessika Carolina Galvão da Silva

Maceió, 28 de setembro de 2018.


 Elvan Nascimento dos Santos Filho
 Coordenador da CEUA
 SIAPE 1756479