



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Instituto do Coração Edson Saad

Programa de pós-Graduação em Cardiologia

Laboratório de Farmacologia Cardiovascular



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

Grazielle Fernandes da Silva

Tese de doutorado

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

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

Rio de Janeiro, RJ
Janeiro, 2021

Grazielle Fernandes da Silva

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

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

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

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

Rio de Janeiro, RJ
Janeiro, 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Grazielle Fernandes da Silva

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

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

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

Aprovada por:

AGRADECIMENTOS

RESUMO

Silva Fernandes Grazielle. “Novo inibidor de MAPK p38 α reduz disfunção ventricular induzida pela hipertensão arterial pulmonar em ratos”. Rio de Janeiro, 2020. Tese (Doutorado em Medicina). Faculdade de Medicina e Instituto do Coração Edson Saad da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introdução: A hipertensão arterial pulmonar (HAP) se apresenta com aumento da resistência vascular pulmonar e falência do ventrículo direito. O presente trabalho visa determinar os efeitos de um novo inibidor da p-38 α MAPK (LASSBio-1824) em modelo animal de HAP.

Metodo: Os experimentos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (sob o número 106/16). No modelo experimental de HAP induzida por monocrotalina (MCT), os animais receberam uma única injeção intraperitoneal de MCT (60 mg/kg). Após duas semanas de indução da doença, os animais foram tratados com veículo ou LASSBio-1824 durante 14 dias (n = 5 por grupo). No modelo de HAP induzida pela hipóxia + Su5416, os animais foram acondicionados numa câmara de hipóxia a 10% de oxigênio por 3 semanas com injeção intraperitoneal semanal de um inibidor do fator de crescimento endotelial vascular- Su5416 (20 mg/Kg i.p.). Após as 3 semanas de hipóxia, foi iniciado o tratamento com LASSBio-1824 por 14 dias mantendo os animais em ambiente de normóxia (n = 5 por grupo). Os seguintes parâmetros foram avaliados: 1. função e estrutura cardíaca através da ecocardiografia transtorácica; 2. pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD); 3. reatividade vascular de artérias pulmonares isoladas dos grupos experimentais; 4. expressão de proteínas de coração e pulmão.

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

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

Palavras-chave: inibidor da MAPK p-38 α , hipertensão arterial pulmonar, Su5416 / Hipóxia, proliferação celular, inflamação, hipertrofia do ventrículo direito.

ABSTRACT

Silva Fernandes Grazielle. "A novel p-38 alpha MAPK inhibitor (LASSBio-1824) reverses Su5416/Hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats.". Rio de Janeiro, 2020. Tese (Doctorate degree in Medicine). Faculty of Medicine and Edson Saad Heart Institute from Federal University of Rio de Janeiro.

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

Methods: The experiments were carried out with the approval of the Ethics and Animal Use Committee of the Federal University of Rio de Janeiro (# 106/16). In the experimental model of monocrotalin(MCT)-induced PAH, the animals received a single intraperitoneal injection of MCT (60 mg/kg). After two weeks of disease induction, the animals were treated with a vehicle or LASSBio-1824 for 14 days (n = 5 per group). In the hypoxia+Su5416-induced PAH model, the animals were kept in a chamber at 10% oxygen for 3 weeks with weekly intraperitoneal injection of a vascular endothelial growth factor inhibitor- Su5416 (20 mg/kg i.p.). After 3 weeks of hypoxia, treatment with LASSBio-1824 was started for 14 days keeping the animals in a regular environment (n = 5 per group). The following parameters were evaluated: 1. cardiac function and structure through transthoracic echocardiography; 2. systolic pressure of the right ventricle (RVSP); 3. vascular reactivity of isolated pulmonary arteries from experimental groups; 4. expression of proteins extracted from heart and lung.

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

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

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

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA 3

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1.0 INTRODUÇÃO

1.1.0 Hipertensão Pulmonar

1.1.1 Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Pulmonar

1.1.2 Alterações cardíacas na HAP

1.1.3 Terapêutica atual e suas limitações

1.1.4 P38 α MAPK e HAP

1.1.5 Planejamento e desenvolvimento de derivados *N*-acilidrazônicos

1.1.6 Justificativa

2.0 OBJETIVOS

2.1.0 Objetivo Geral

2.1.1 Objetivos específicos

3.0 MODELOS ANIMAIS DE HAP

3.1.0 Modelo de HP induzida por monocrotalina

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

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.0 Local da pesquisa

4.1.1 Comitê de ética

4.1.2 Substâncias Utilizadas

4.1.3 Animais e desenho experimental Monocrotalina (MCT)

4.1.4 Animais e desenho experimental hipóxia SU5416

4.1.5 Ecocardiografia transtorácica

4.1.6 Medidas hemodinâmicas

4.1.7 Retirada e acondicionamento de tecidos

4.1.8 Análise imunohistopatológica pulmão e VD

4.1.9 Avaliação da reatividade vascular de artérias pulmonares (PA)

4.2.0 Preparação de membrana e análise de Western Blot

4.2.1 Dados e análises estatísticas

5.0 RESULTADOS

6.0 DISCUSSÃO

7.0 CONCLUSÕES

8.0 REFERÊNCIAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática evolutiva das alterações vasculares na HAP

Figura 2: Representação esquemática da formação de lesões plexiformes

Figura 3: Representação esquemática evolutiva das alterações cardíacas na HAP

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

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

Figura 6: Algoritmo de tratamento da HAP

Figura 7: Esquema representativo da estratégia de simplificação molecular

Figura 8: Fármacos inibidores de tirosina cinases

Figura 9: Representação esquemática do desenvolvimento de novos novos derivados *N*-acilidrazônicos.

Figura 10: Estrutura de (*E*)-*N*-(4-(piridin-2-il) benzilideno)-2-nafto-hidrazida (LASSBio-1824).

Figura 11: Via de p38 MAPK, adaptado de Cuadrado et al, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figure 22: Efeitos da terapia com LASSBio-1824 na fração de colágeno e expressão de C-fos no coração de animais normoxia e SuHx

Figura 23: Curva de sobrevivência Kaplan-Meier de ratos com HAP induzidos por SuHx e normoxia tratados com veículo ou LASSBio-1824

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação clínica de hipertensão pulmonar (HP) de acordo com etiologia. Simmoneau et al, 2019.

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

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

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ARE-1	Antagonistas dos receptores da entotelina-1
AP	Artéria pulmonar
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância unidirecional
ATP	Trifosfato de adenosina
Akt	Proteína quinase B
α SMA	anti-alfa-actina do músculo liso
AP-1	Proteína ativadora 1
BAS	Bolsa de ar subcutânea
BBC	Bloqueadores de canais de cálcio
CE	Célula endotelial
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CMLVP	Células musculares lisas vasculares pulmonares
c-NOS	Sintase do óxido nítrico constitutiva, do inglês constitutive nitric oxide synthase
DCVD	Débito cardíaco do ventrículo direito
DCVE	Débito cardíaco do ventrículo esquerdo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECG	Eletrocardiografia
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial, do inglês, endothelial nitric oxide synthase -
EROs	Espécies reativas de oxigênio

ERK	Proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares, do inglês <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
ET-1	Endotelina-1
ET _A	Receptores de endotelina tipo A
ET _B	Receptores de endotelina tipo B
ETT	Ecocardiograma transtorácico
FRS	Fator de resposta sérica
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
H&E	Hematoxilina e eosina
HP	Hipertensão pulmonar
HRP	Peroxidase de rábano silvestre
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1, do inglês <i>intercellular adhesion molecule</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IP	Receptores de prostaciclina
IFN- γ	Interferon gamma
IKK 2	kappa B cinase
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
i-NOS	Sintase do óxido nítrico induzível, do inglês <i>inductible nitric oxide synthase</i>
i.p.	Intraperitoneal
JNK	do inglês, <i>c-Jun amino-terminal kinase</i>
LASSBio	Laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos, do inglês mitogen-activated protein kinase
MCT	Monocrotalina
NAH	<i>N</i> -acilidrazona
NO	Óxido nítrico
n-NOS	Sintase do óxido nítrico neuronal, do inglês neuronal nitric oxide synthase
NF-kB	Fator nuclear kappa b
PAD	Pressão arterial diastólica
PAPm	Pressão arterial pulmonar média
PDE5	Fosfodiastesase-5
PGI2	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinase, do inglês phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PMO	Proteína morfogênica óssea
ROS	Do inglês, reactive oxygen species
Phe	Fenilefrina
PSR	Picro-Sirius red
RNA	Ácido ribonucleico]
RPMO-2	Receptor de proteína morfogenética óssea-2
RVP	Resistência vascular pulmonar
RTK	Receptores de tirosina cinase de superfície
SERCA2a	Do inglês, Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase
SuHx	hipóxia

STAT	do ingles "signal transducer and activators of the transcription
TAP	Tempo de aceleração da artéria pulmonar
TET	Tempo de ejeção da artéria pulmonar
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VE + S	Ventrículo esquerdo + septo interventricular
VD/VE + S	Relação entre o peso do VD e o peso de VE+S
VO	Via oral
VD	Ventrículo direito
VSVE	Volume sistólico do ventrículo esquerdo
VSVD	Volume sistólico do ventrículo direito
WU	Do inglês, wood units

1.INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Pulmonar

A hipertensão pulmonar (HP) é definida hemodinamicamente por pressão arterial pulmonar média (PAPm) > 20 mmHg em repouso. É classificada clinicamente em cinco subgrupos (Tabela 1). A hipertensão arterial pulmonar (HAP), faz parte do subgrupo 1 considerado de maior gravidade. A HAP apresenta também pressão de oclusão da artéria pulmonar \leq 15 mmHg, configurando uma HP do tipo pré-capilar e resistência vascular pulmonar \geq 3 Wood units (WU) (Galiè *et al* 2019, Simonneau *et al* 2019).

Tabela 1: Classificação clínica de hipertensão pulmonar (HP) de acordo com etiologia. SIMMONEAU *et al*, 2019.

Classificação clínica hipertensão pulmonar (HP)
1 Hipertensão arterial pulmonar (HAP) <ul style="list-style-type: none">1.1 HAP idiopática1.2 HAP hereditária1.3 HAP induzida por fármacos e toxinas1.4 HAP associada com:<ul style="list-style-type: none">1.4.1 Doença do tecido conjuntivo1.4.2 Infecção por HIV1.4.3 Hipertensão porta1.4.4 Doença cardíaca congênita1.4.5 Esquistossomose1.5 HAP de longo prazo respondente a bloqueadores de canal de cálcio1.6 HAP com características ostensivas de envolvimento venoso/capilar (doença venooclusiva pulmonar/hemangiomatose capilar pulmonar)1.7 HP persistente do recém-nascido
2 HP devido a insuficiência ventricular esquerda <ul style="list-style-type: none">2.1 HP devido a insuficiência cardíaca com fração de ejeção de ventrículo esquerdo (FEVE) preservada2.2 HP devido a insuficiência cardíaca com FEVE reduzida2.3 Doença nas válvulas cardíacas2.4 Condições cardiovasculares congênitas/adquiridas levando a HP pós-capilar
3 HP devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia <ul style="list-style-type: none">3.1 Doença pulmonar obstrutiva3.2 Doença pulmonar restritiva3.3 Outra doença pulmonar com perfil misto restritivo/obstrutivo (traduzir)3.4 Hipóxia, sem doença pulmonar3.5 Doenças pulmonares congênitas
4 HP devido a obstruções arteriais pulmonares <ul style="list-style-type: none">4.1 HP tromboembólica crônica4.2 Outras obstruções arteriais pulmonares
5 HP com mecanismos incertos e/ou multifatoriais <ul style="list-style-type: none">5.1 Distúrbios hematológicos5.2 Transtornos sistêmicos e metabólicos5.3 Outros5.4 Doença cardíaca congênita complexa

HAP afeta indivíduos independente de idade, gênero ou raça e devido a ampla classificação e múltiplas etiologias, a estimativa precisa da prevalência

tem se mostrado um desafio. No entanto, HAP idiopática e hereditária apresentam uma prevalência estimada em 15-50 casos por milhão (Humbert et al 2006, Ling, Y. et al. 2012, McGoon, M. D. et al 2013). A HAP idiopática afeta indivíduos mais jovens, sendo relativamente incomum entre os mais idosos (Frost, A. E. et al 2011, Pugh, M. E. et al 2014). No passado, HAP estava associada a mulheres jovens em média com trinta anos, mas atualmente esta doença afeta homens e mulheres de meia-idade (Frost, A. E. et al 2011, McGoon, M. D. et al 2013).

Embora a esquistossomose seja considerada a causa mais comum de HAP em todo o mundo, em regiões não endêmicas, mais da metade dos casos diagnosticados são do tipo idiopática e até 10% são do tipo hereditária. Muitos casos estão relacionados a mutação no receptor de proteína morfogenética óssea-2 (RPMO-2), sugerindo que a HAP idiopática possa estar sendo subdiagnosticada em muitas dessas regiões (Newman, J. H. et al 2001, Humbert et al 2006, Badesch, D. B. et al 2010, Zhang, R. et al 2011). Dentre as outras etiologias associadas a HAP, as doenças do tecido conjuntivo e a cardiopatia congênita também são muito comuns, sendo essa última muito incidente principalmente na China (Zhang, R. et al 2011).

No Brasil, HAP de causa idiopática, doença do tecido conjuntivo e associada a esquistossomose apresentaram uma incidência de 28,7%, 25,8% e 19,7%, respectivamente. Enquanto, na América do Norte a prevalência da HAP também não é totalmente conhecida. Na Europa taxas apontam uma prevalência em torno de 5 a 52 por milhão/ano e incidência de 2.4 casos por milhão/ano (Galiè *et al*, 2016).

1.1.1 Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Pulmonar

A pressão arterial pulmonar média (PAPM) é determinada pela seguinte fórmula: $PAPM = \text{débito cardíaco do ventrículo direito (DCVD)} \times \text{resistência vascular pulmonar (RVP)} + \text{pressão de oclusão alveolar pulmonar}$. A principal causa da HAP é comumente o aumento da resistência vascular pulmonar (RVP). O aumento do DCVD isoladamente não causa HAP significativa, porque o leito vascular pulmonar mantém vasodilatação e recruta vasos em resposta ao aumento do fluxo. Assim como, o aumento da pressão venosa pulmonar

(representada pela pressão de oclusão alveolar) isolado não causa HAP. Entretanto, um aumento crônico do fluxo e/ou pressão venosa pulmonar podem aumentar a RVP. A consequência do aumento da RVP, e assim da PAPM é a sobrecarga do ventrículo direito (VD). O coração responde com hipertrofia, que, com a evolução da doença provoca a falência do VD, insuficiência cardíaca, e a morte prematura dos pacientes acometidos. (Humbert et al., 2019).

A patogênese da resistência aumentada nos pré-capilares pulmonares em pacientes com HAP é geralmente atribuída aos efeitos combinados entre o remodelamento das paredes das artérias pulmonares e vasoconstrição persistente (Humbert *et al.*, 2004; Rabinovitch, 2007; Chan e Loscalzo, 2008). As artérias pulmonares uma vez apresentando essas alterações, adquirem uma menor área de secção transversa e conseqüentemente um maior fluxo sanguíneo. A hipertrofia da parede dos vasos pulmonares na HAP é conseqüente ao remodelamento vascular caracterizado por um aumento de todos os componentes celulares da parede arterial (células musculares lisas, endotélio, fibroblastos, miofibroblastos, pericitos e infiltração perivascular exacerbada de células pró-inflamatórias - Figura 1) que ocorre nas três camadas da parede vascular (íntima, média, adventícia) das artérias pulmonares <50 microns, ou seja, localizadas nas pequenas arteríolas musculares pulmonares. (Humbert, et al, 2014, Humbert et al., 2019).

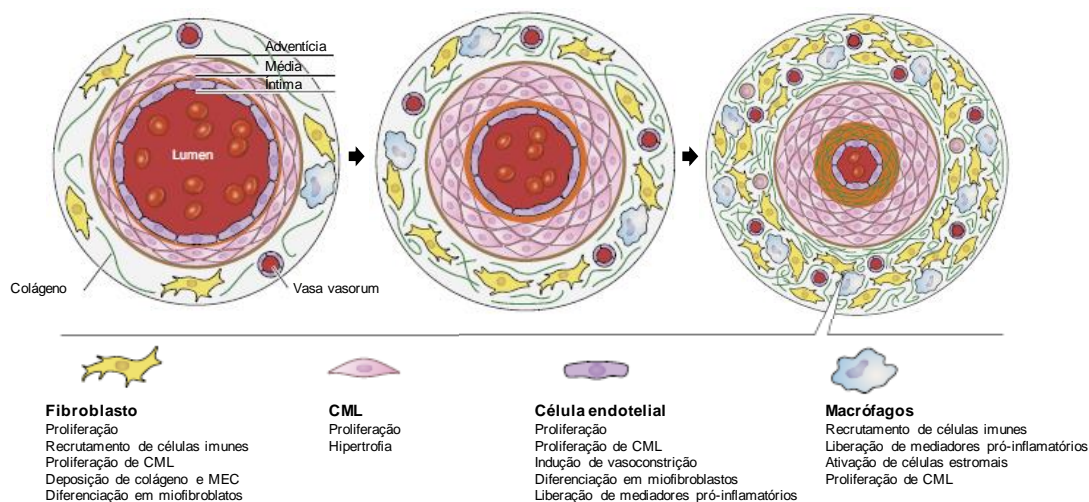


Figura 1: Representação esquemática evolutiva das alterações vasculares na HAP. CML, Células musculares lisas. Adaptado de Pugliese et al, 2015.

A distinção entre HAP de outras formas de HP é a gravidade da arteriopatia. Embora todas as formas de HP apresentem alterações que incluem aumento da espessura nas paredes de pequenas artérias pulmonares, é, indiscutível, a perda do volume intravascular, a principal característica que define o subgrupo HAP, a chamada arteriopatia plexogênica, uma alteração vascular que dá origem a lesões plexiformes (Stenmark *et al.*, 2009). Os estágios iniciais da HAP são histologicamente não específicos, com hipertrofia da camada média, espessamento da adventícia e aparência muscular em paredes normalmente não-musculares. O avanço da fisiopatologia envolve a formação de lesões plexiformes e fibróticas complexas na camada íntima (Figura 2), que obstruem as médias e pequenas arteríolas pulmonares, limitando significativamente o fluxo sanguíneo nesses vasos (Chazova *et al.*, 1995; Meyrick, 2001; Tuder *et al.*, 2007; Stenmark *et al.*, 2009).

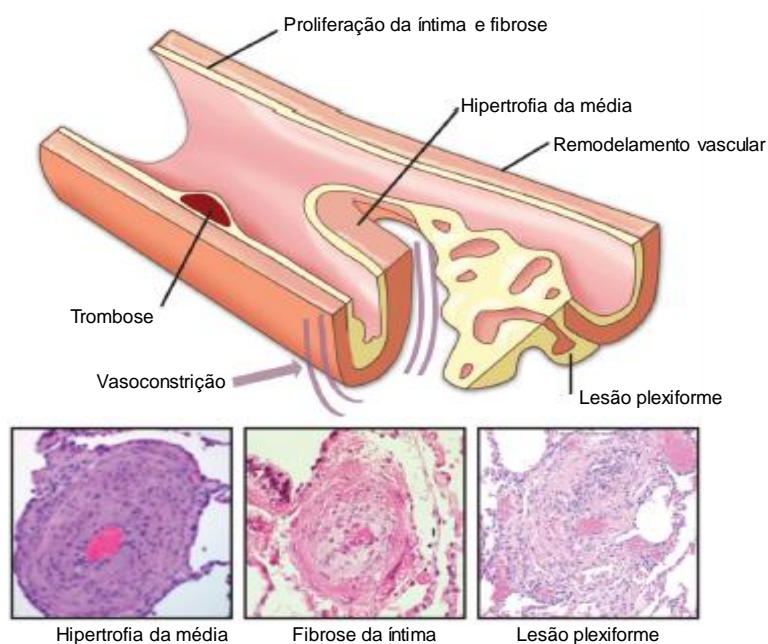


Figura 2: Representação esquemática da formação de lesões plexiformes. Adaptado de Dasgupta, A. et al, 2015.

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

- Grau I e II: são caracterizadas pela muscularização das pequenas arteríolas pulmonares, seguida por hipertrofia medial e hiperplasia da íntima.

- Grau III: são caracterizadas pela substituição colágena das células da íntima, levando a uma aparência de "casca de cebola".

- Grau IV a V, incluem lesões plexiformes sem ou com necrose fibrinóide, respectivamente.

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

Inicialmente, ocorre alteração da célula endotelial (CE), que influencia diretamente o comportamento celular nas paredes das artérias. A comunicação entre as células é regulada através do contato e liberação de fatores bioativos tais como fatores parácrinos produzidos pela CE, que influenciam a proliferação de células como as musculares lisas vasculares pulmonares (CMLVP) e fibroblastos (Sakao et al., 2009; Amabile et al., 2013). As células endoteliais alteradas liberam também fatores que atraem células inflamatórias para os vasos tais como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, estimulando um comportamento celular alterado associado a processos de proliferação, apoptose, diferenciação e migração celular (Sakao et al., 2009, Schermuly et al., 2011). A formação e maturação dos vasos sanguíneos pulmonares também é dependente da CE, da mesma forma, a produção e liberação de fatores de crescimento recruta e estabiliza as células vasculares (Hanahan, 1997). Durante a evolução da HAP, ocorre uma desregulação deste processo, a comunicação entre CEs e as células vasculares se altera, ocorre liberação excessiva de fatores de crescimento pelas CEs, que em conjunto irão contribuir gradativamente para o desenvolvimento da HAP (Eddahibi et al., 2006; Xu e Mao, 2011; Guignabert e Dorfmuller, 2013; Guignabert et al., 2015; Corre et al, 2017).

A sobrevivência da CE é regulada, dentre outros fatores pela proteína morfogênica óssea (PMO). Contudo, existe uma mutação no receptor da proteína morfogenética óssea-2 (RPMO-2) das CEs nos pacientes com HAP. Essa mutação tem como consequência, o aumento da apoptose em resposta a estresse ambiental, lesões principalmente nas artérias pulmonares (APs) distais e conseqüentemente disfunção endotelial (Teichert-Kuliszewska et al.,

2006). Com o início desse processo apoptótico, ocorre obliteração de vasos em consequência à degeneração da estrutura das CEs, podendo ser esse um mecanismo inicial da HAP (Zhao et al., 2005). Além disso, numa fase posterior ocorre a proliferação excessiva levando a formação de lesões plexiformes devido a resistência de CEs a apoptose (Cool et al., 1999; Voelkel et al., 2002; Dasgupta, A. et al, 2015; St Croix e Steinhorn, 2016). Não se conhece o indutor da alteração das CEs, mas sabe-se que alguns eventos como estresse de cisalhamento, inflamação local, predisposição genética, toxinas e espécies reativas de oxigênio, possam ser importantes fatores deflagadores da disfunção endotelial (Amabile et al., 2013).

Os fibroblastos também são muito importantes para a patogênese da HAP, uma vez que respondem a liberação de fatores quimioatrativos liberados pelas células endoteliais alteradas. Essas células migram da adventícia para o interior dos vasos e entram em intenso processo de proliferação e produção de mitógenos, que também recrutam células adjacentes a proliferar (Sakao et al., 2009). Isso leva à formação da camada neointima e transformação dos fibroblastos em outros tipos celulares, incluindo miofibroblastos, um tipo de CMLVP anormal que contribui para a muscularização dos vasos distais (Sisbarro et al., 2005; Sakao et al., 2009; Church et al, 2015).

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

O processo inflamatório também é importante durante a evolução da HAP (Schermuly et al., 2011) porque um infiltrado inflamatório composto por

linfócitos T e B, mastócitos, células dendríticas e macrófagos, se dirigem para os vasos. Ocorre aumento nos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucinas e interferon-gama, assim como de outros marcadores da inflamação (Schermuly et al., 2011). Logo, a reversão das lesões vasculares na HAP deve basear-se não somente no efeito antiproliferativo, vasodilatador assim como anti-inflamatório (Schermuly et al., 2011).

Por fim, a ação dos fatores de crescimento, mitógenos e quimioatraentes ocorre a partir da ligação aos receptores de tirosina quinases (RTKs), resultando em multifosforilação de resíduos de tirosina (Lemmon e Schlessinger, 2010). Em sequência, pode surgir a ativação de algumas vias de sinalização como do fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K), proteína quinase C (PKC), proteína quinase B (Akt), Janus quinase (JAK), sinal transdutor e ativador da transcrição (STAT) e em especial as proteínas quinases activadas por mitogénio (Ras/Raf, MAPK p38, ERK) (Koledova e Khalil, 2006; Lemmon e Schlessinger, 2010). Um vez activadas essas vias iniciarão a produção de proteínas que serão fundamentais na patogénese da HAP.

1.1.2 Alterações cardíacas na HAP

A obliteração do lúmen vascular devido à vasoconstrição e proliferação celular leva ao aumento da RVP e assim da pós-carga do VD (Figura 3). O aumento da pós-carga causa estresse sobre a parede do VD, que passa a ejetar o sangue para ser oxigenado contra uma resistência maior. Com isso o músculo cardíaco inicia um complexo processo de adaptação e hipertrofia, que dependerá não somente da gravidade da doença pulmonar, mas também de interação neuro-humoral, da perfusão coronariana, determinantes genéticos e metabolismo cardíaco (Bogaard, H. J., 2009, Nagendran, J., 2009).

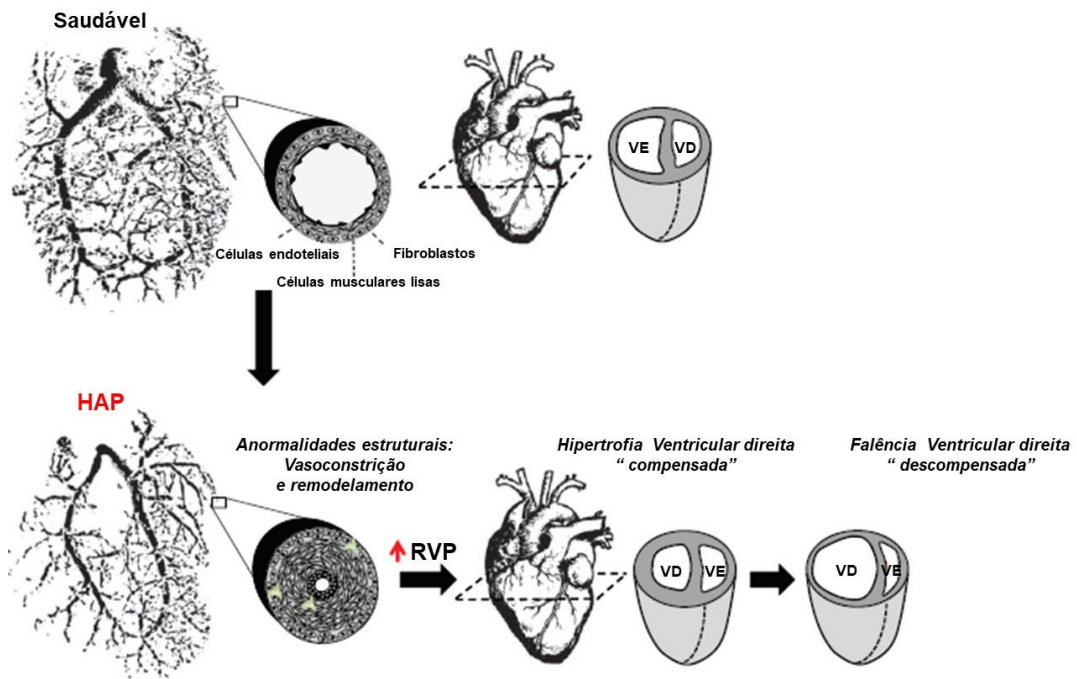


Figura 3: Representação esquemática evolutiva das alterações cardíacas na HAP. A obliteração do lúmen vascular devido a vasoconstrição e proliferação de células vasculares aumentam a RVP, resultando em adaptação do VD. A compensação inicial é seguida por uma dilatação progressiva e irreversível do VD,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

O remodelamento miocárdico envolve, não somente hipertrofia de fibras miocárdicas, mas também remodelamento da matrix e alterações de contratilidade. Uma vez iniciado o estresse sobre a parede do VD, dois padrões de remodelamento ventricular podem ocorrer; o adaptativo caracterizado por hipertrofia mais concêntrica com função sistólica e diastólica preservadas e o mal adaptativo associado a hipertrofia excêntrica e pior função sistólica e diastólica (Chung, L., 2010, Campo, A., 2010). Também contribui para o remodelamento mal adaptativo, o aumento de espécies reativas de oxigênio, ativação de vias apoptóticas, inflamação com recrutamento de fibroblastos, linfócitos, macrófagos e ativação neuro-humoral de vias adrenérgicas e angiotensina para o tecido cardíaco (Figura 4) (Wrigley et al, 2011).

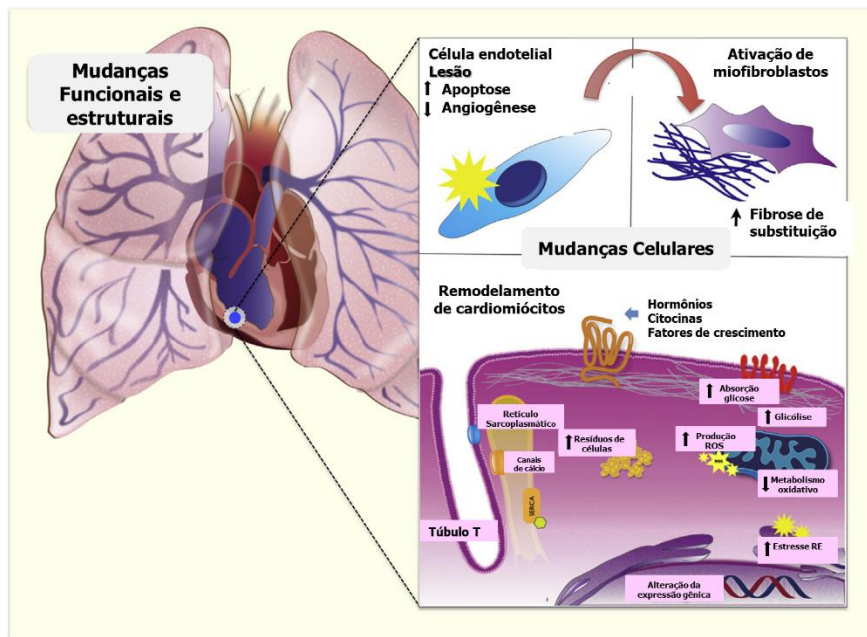


Figura 4: Vias moleculares envolvidas no remodelamento do VD na HAP. Ocorre aumento da produção de espécies pró-inflamatórias tais como; TNF-alfa, citocinas, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), diminuição do metabolismo oxidativo, além de maior estresse sobre o retículo endotelial,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

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

Embora todas as formas de HP possam contribuir para a alta morbidade e mortalidade entre os pacientes, a HAP é a forma da doença particularmente mais severa, progressiva e com maiores chances de levar à insuficiência ventricular direita (Chin et al, 2005; Hemnes et al, 2008; Humbert, 2009). Assim, quando um paciente é diagnosticado com HAP, a sua avaliação deve incluir uma série de parâmetros clínicos definidos; tais como hipertensão pré-capilar pulmonar, arteriopatía pulmonar hipertensiva (usualmente com lesões endoteliais plexiformes), e evolução clínica lenta (Stenmark et al, 2009).

1.1.3 Terapêutica atual e suas limitações

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

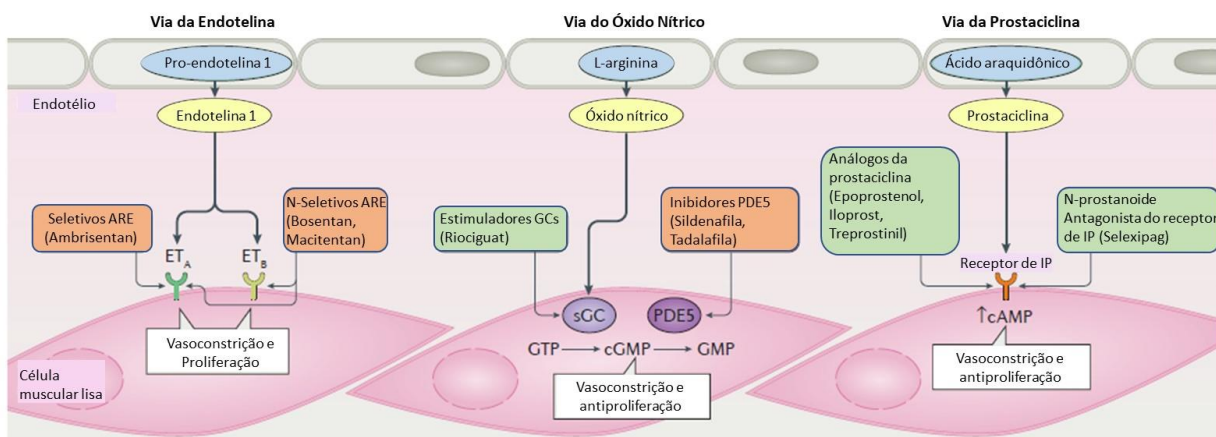


Figura 5: Principais alvos moleculares para tratamento da HAP aprovados atualmente. ARE (antagonista do receptor de endotelina); GCs (Guanilato ciclase); PDE5 (fosfodiesterase-5), ET_A (receptores de endotelina tipo A); ET_B (receptores de endotelina tipo B). IP (receptores de prostaciclina); Adaptado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

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

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

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

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

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

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

sistêmica (PAS) < 90 mmHg, baixo índice cardíaco <2 L/min/m², histórico de doença cardiovascular ou presença de sintomas graves (classe funcional IV). Os medicamentos comumente usados para o teste de vasorreatividade incluem NO inalado, epoprostenol, adenosina e iloprost inalado (Morales-Blanhir, J., 2004, Simonneau et al, 2018). E o teste é considerado positivo se houver uma redução de pelo menos 10 mmHg na PAPM (Mclaughlin et al., 2009).

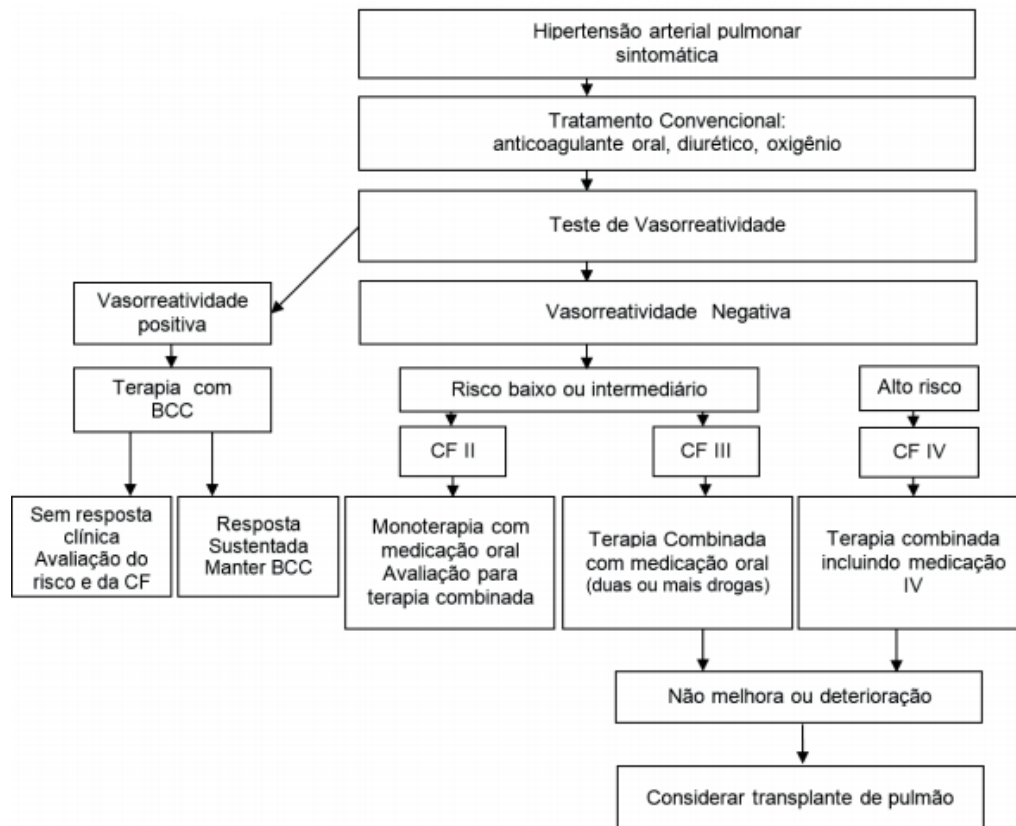


Figura 6: Algoritmo de tratamento da HAP. Adaptado de Rich S et al, 1998; Galiè et al, 2016

Somente pacientes com positividade nesse teste devem ser candidatos a terapia com BCC, uma vez que essa terapia pode levar a efeitos colaterais graves. O mecanismo de ação dos BCCs envolve a redução do influxo de cálcio, impedindo a ligação calcio-calmodulina, e assim a contração do músculo liso, causando a uma vasodilatação arteriolar. Contudo, a ausência de estudos randomizados comparando a terapia com BCC e placebo em pacientes vasoativos limita o conhecimento dessa classe em termos de sobrevida. Além disso, é comum efeitos adversos relacionados as propriedades

vasodilatadoras sistêmicas dos BCCs, como hipotensão arterial sistêmica, edema periférico (Palevsky, H. I., 1990, Melot, C. 1984), piora da função do VD devido ao seu efeito inotrópico negativo (Packer, M., 1984).

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

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

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

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

Outra classe também utilizada no tratamento da HAP são os análogos da prostaciclina (PGI₂). A PGI₂ pode ser sintetizada no endotélio da vasculatura pulmonar a partir do ácido araquidônico via prostaciclina sintase e atua através da ativação de um receptor específico (IPGI₂) acoplado a uma proteína G estimulatória, G_s (Olschewski, H. et al., 2008). Assim, haverá aumento nos níveis intracelulares de AMPc e consequente vasodilação. (Coleman, R. A., 1994). As prostaciclinas também tem ação antiproliferativa, antiplaquetária, e efeitos imunomoduladores (Olschewski, H. et al., 2008). Dentre os análogos da prostaciclina, o epoprostenol foi o primeiro aprovado para tratamento da HAP e é a única terapia da classe em que foi demonstrado melhora da sobrevivência em 12 semanas em pacientes com HAP grave (Barst, R. J. et al., 1996). Porém, esse medicamento só pode ser administrado via acesso venoso central com infusão contínua devido à sua meia-vida curta (aproximadamente 2-3 minutos) e propriedades farmacocinéticas. Sua terapia é complexa e requer treinamento do paciente, suporte de enfermagem e médico (Sitbon, O. et al., 2014). O treprostinil é outro análogo das PGI₂ que pode ser administrado por via intravenosa ou subcutânea, suas vantagens em relação ao epoprostenol seria a administração subcutânea e meia vida mais longa. Mas, assim como o epoprostenol apresenta efeitos adversos consideráveis como dor mandibular, diarreia, artralgias e outros graves efeitos relacionados ao modo de administração como trombose e infecção (Kitterman et al, 2012; Barnes et al, 2019). O iloprost inalado é outro análogo da prostaciclina, que apresenta vantagens teóricas por atingir especificamente a vasculatura

pulmonar e não requer administração intravenosa, mas sua principal desvantagem é a necessidade de administração frequente (seis a nove vezes por dia-Barnes et al, 2019).

Os estimuladores da gualinato ciclase são agentes que aprimoram a produção ou a função do óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador. A síntese do NO provém da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalizada pela enzima NO- sintase (NOS) (Humbert et al., 2004). As isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), NOS neuronal (n-NOS), NOS endotelial (e-NOS), que dependente de íons cálcio e de calmodulina, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. (Humbert et al., 2004).

A fosfodiesterase 5 (PDE5) atua na degradação do GMPc, logo, a inibição da PDE5 aumenta a disponibilidade de GMPc causando vasodilatação. O inibidor da PDE5, sildenafil, melhora a capacidade ao exercício, a classe funcional da OMS e a hemodinâmica pulmonar em pacientes com HAP do grupo 1 (Galie et al, 2005). No entanto, seu efeito sobre a mortalidade não foi adequadamente avaliado. Os estudos SUPER-1 e SUPER-2 descreveram melhora da hemodinâmica pulmonar, porém a taxa de sobrevivência estimada em três anos foi de 79% (Galie et al, 2005; Rubin et al, 2011). Os efeitos colaterais dessa classe incluem sintomas como cefaleia, distúrbios gastrointestinais, rubor, dores musculares e articulares.

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

Por fim, os agonistas dos receptores de prostaciclina de uso oral, como o selexipag, um agonista seletivo do receptor IP de prostaciclina não prostanóide que causa vasodilatação do leito vascular pulmonar e pode ajudar pacientes com HAP que possuem classe funcional II e III (Sitbon et al, 2015). Apresenta a vantagem do uso oral cuja tolerabilidade é melhor quando associado com alimentos. Além disso, o selexipag possui alta seletividade para o receptor IP em relação a outros receptores prostanóides, o que também o

diferencia dos demais fármacos dessa classe (Kuwano et al, 2008). Porém, o tratamento pode levar a reações adversas importantes em mais de 10% dos pacientes, como cefaleia, rubor, alterações dermatológicas, dor mandibular, mialgia, diarreia, náusea e vômito (Sitbon et al, 2015). Seu uso deve ser interrompido na presença de edema pulmonar e alterações hepáticas, e por isso os pacientes devem ter a função hepática monitorada continuamente (Galie et al, 2013; Kaufmann et al, 2015).

1.1.4 P38 α MAPK e HAP

As células desenvolvem ao longo da evolução, mecanismos para comunicar os meios intra- e extracelulares, permitindo dessa forma responder e reagir as alterações do ambiente e evoluir. Foram desenvolvidas vias de sinalização que dependem dentre outros mecanismos, da modificação de proteínas; seja por meio da transcrição, tradução e fosforilação dessas moléculas. Um dos mecanismos de sinalização celular envolvidos na fisiopatologia da HAP é a via de p38 α proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (Church et al, 2015; Shuangquan Yan et al, 2016; Zarubin et al , 2017).

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

As MAPKs são enzimas mediadoras de sinais em resposta a estímulos externos que controlam funções biológicas fundamentais como: ativação do sistema imune, inflamação, proteção contra o estresse oxidativo, replicação, controle do ciclo celular, transcrição gênica, rearranjos do citoesqueleto, apoptose, proliferação celular, e metabolismo energético (Hanks, Quinn et al. 1988; Seger and Krebs 1995). As vias de sinalização MAPK são evolutivamente conservadas entre eucariotos e, de acordo com a similaridade no nível da sequência primária de aminoácidos e o modo de ativação, membros da família MAPK são divididos em três subfamílias: ERK (do inglês,

extracellular-signal-regulated kinase); JNK (do inglês, *c-Jun amino-terminal kinase*) e p38 (Hanks and Hunter 1995; Bogoyevitch e Court, 2004).

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

Estímulos externos como fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, hipóxia, estresse ambiental e LPS, desencadeiam a fosforilação em cascata de moléculas envolvidas na ativação da sinalização p38 MAPK (Nebreda and Porras 2000). Evidências apontam que p38 MAPK quando ativada transloca-se do citoplasma para o núcleo e pode fosforilar cinase ativada por estresse e mitógenos (MSK 1/2) que ativa diretamente fatores de transcrição como CREB, ATF1, a isoforma NF- κ B, e STAT 1/3, mas também pode fosforilar as proteínas nucleossômicas histona H3 e HMG-14 (Soloaga et al, 2003; Arthur et al, 2008). p38 α MAPK também fosforila MK2 e MK3 que participam do controle da expressão gênica principalmente no nível pós-transcricional, fosforilando fatores de transcrição como o fator de resposta sérica (FRS), que constitui fator de transcrição para AP-1 responsável pela expressão de c-fos, que desempenha um papel importante na expressão de genes envolvidos no reparo do DNA, proliferação celular, parada do ciclo celular, morte por apoptose e remodelamento da matriz extracelular (Shi et al, 2002; Roux et al, 2004; Leskow et al, 2005) (Figura 7).

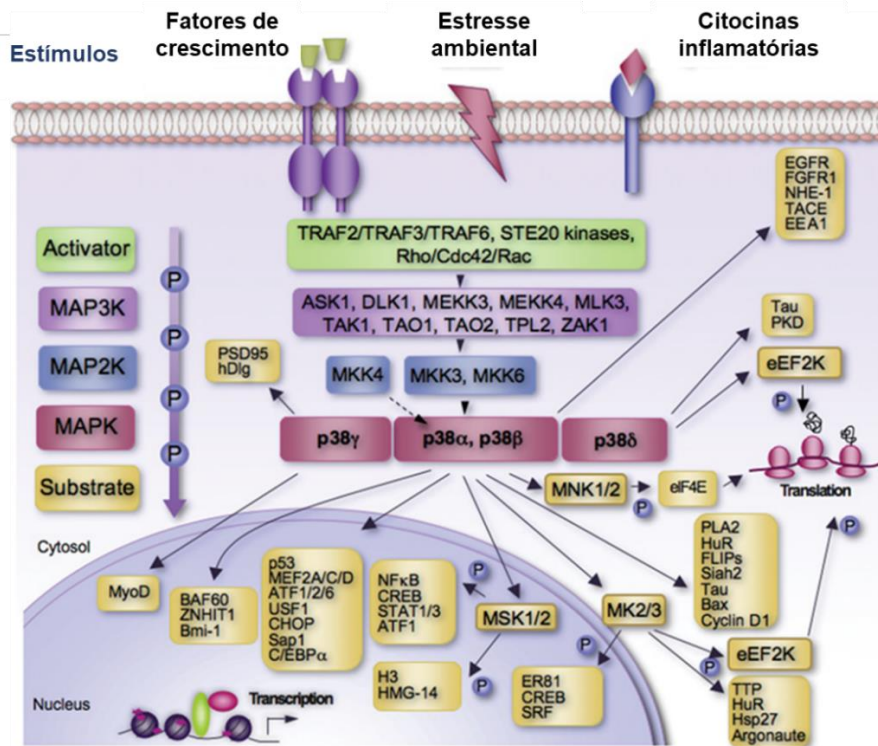


Figura 7: Via de p38 MAPK, adaptado de Cuadrado et al, 2010.

Existe relação entre a via p38 e a inflamação. Diversas doenças como artrite reumatoide, doença de Alzheimer e doença inflamatória intestinal, tem seus mecanismos inflamatórios descritos em parte pela via p38 α MAPK (Hollenbach et al, 2004). Essa via desempenha papéis essenciais na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6), além de controlar o remodelamento de tecidos em processos patológicos. p38 α MAPK atua na ativação do NF- κ B cujos produtos; INOS (um mediador do estresse oxidativo) e TNF (uma citocina inflamatória) estão diretamente relacionados ao processo inflamatório na HAP, a produção de COX-2, indução de VCAM-1 e outras proteínas aderentes, assim como atua na proliferação e diferenciação de células do sistema imune como GM-CSF, EPO, CSF e O CD-40 (Kummer et al, 1997; Guan et al, 1998; Badger et al, 1988, Craxton et al, 1998). Durante a chegada de macrófagos, neutrófilos e células T nos tecidos inflamados, p38 α MAPK está ativa nessas células e media as atividades de quimiotaxia, exocitose granular, aderência e apoptose em macrófagos e neutrófilos, assim como diferenciação e apoptose de células T, regulando produção de interferon gama e estabilização de mRNAs celulares específicos envolvidos no processo inflamatório.

Além disso, a ativação da via p38 α MAPK está implicada no processo de disfunção ventricular que ocorre na HAP, porque em cardiomiócitos hipertrofiados, p38 α e p38 β , tem seus níveis aumentados e ativam MKK3 e MKK6, levando há uma maior organização dos sarcômeros e aumento do peptídeo atrial natriurético (Shuangquan Yan et al , 2016). A nível nuclear p38 α fosforila fatores de transcrição relacionados diretamente ao processo hipertrófico p53 envolvido em processos de apoptose e os fatores de transcrição MEF2A, MEF2C e MEF2D relacionados com hipertrofia cardíaca na HAP. Portanto, p38 α MAPK está envolvida em diversos aspectos da patogênese da HAP, como a inflamação, a hipertrofia, a proliferação celular, sendo um alvo promissor para a HAP.

1.2 Modelos de animais de HAP

1.2.1 Modelo de HP induzida por monocrotalina (MCT)

A MCT é um alcalóide presente na *Crotalaria spectabilis*, que produz lesão endotelial nas artérias pulmonares (Thomas, 1998). Essa lesão leva a um remodelamento da parede dos vasos, maior resistência vascular pulmonar, e consequente HP com hipertrofia ventricular direita. A administração de MCT resulta no desenvolvimento progressivo de HP em várias espécies de animais e foi descrito primeiramente após a administração oral (Kay *et al.*, 1967). MCT provoca injúria vascular e portanto, a injeção parenteral desse alcaloide pode induzir HAP. Infelizmente, as respostas à MCT variam significativamente devido no seu metabolismo hepático pelo citocromo P450. O mecanismo pelo qual a MCT induz a HP ainda é duvidoso mas sugere-se que MCT cause injúria endotelial direta que desencadeia o surgimento e progressão de HP severa e eventualmente letal (Jasmin *et al.*, 2001). O aumento da pressão arterial pulmonar e remodelamento vascular são causados pelo acúmulo intenso de células inflamatórias na camada adventícia nos pequenos vasos (Wilson, D. W. *et al.*, 1989). Essas modificações ocorrem em artérias e veias e precedem as evidências de hipertrofia do músculo liso na camada média. Assim, a inflamação da adventícia, particularmente o acúmulo de macrófagos, é sugerido como responsável de efeitos importantes na patogênese da HP

(Stenmark *et al.*, 2009). Como fator negativo pode-se mencionar a injúria hepática e renal induzidas pelo MCT por produzir veno-oclusão hepática (Roth *et al.*, 1981; Chan *et al.*, 2008).

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

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

Outro modelo animal de HAP severa foi desenvolvido com a intenção de reproduzir de forma semelhante ao que ocorre em humanos associado a hiperproliferação das células endoteliais que caracterizam as lesões plexiformes (Taraseviciene-Stewart *et al.*, 2001). Baseado no fato de que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é importante para a manutenção e diferenciação das células endoteliais, o antagonista do receptor de VEGF, *Sugen 5416* (SU-5416), provocou leve HAP e remodelamento vascular pulmonar em ratos submetidos à normóxia. No entanto, a HAP severa e irreversível associada à proliferação predominantemente pré-capilar das células endoteliais foi observada em animais submetidos à hipóxia crônica. Desta forma, a administração de SU-5416 que bloqueia o receptor de VEGF causa apoptose de células endoteliais, e que em condição de hipóxia desencadeia a proliferação de células endoteliais no lúmen dos pequenos vasos, devido ao fato de que a hipóxia crônica, per si, e/ou a vasoconstricção excessiva estimulam a proliferação de uma linhagem de células endoteliais resistentes a apoptose.

Interessantemente, a hipóxia crônica, juntamente ao bloqueio do receptor VEGF, causam severa e persistente HAP, mesmo após os animais terem sido removidos do ambiente de hipóxia. A persistência e progressão da doença vascular pulmonar e da insuficiência ventricular direita é similar à observada em humanos (Stenmark *et al.*, 2009). Uma das vantagens mais importantes desse modelo, é que a injeção de SU-5416 afeta apenas os receptores presentes nas células endoteliais pulmonares e não em outros órgãos (Burke *et al.*, 2009). Neste modelo não há aparecimento de infiltrado perivascular de monócitos e macrófagos. Esse fato é importante de ser comparado com o que acontece no modelo de hipóxia crônica isolada, o qual mostrou claramente causar ambos os infiltrados e um influxo persistente de células mononucleares dentro das paredes de artérias pulmonares (Burke *et al.*, 2009). Devido à gravidade do modelo SU-5416, formação de lesões na camada íntima e a natureza progressiva da fisiopatologia da doença em roedores, essa técnica experimental tem sido atualmente a mais usada para o estudo de novas terapias para o tratamento da HAP (Stenmark *et al.*, 2009).

Por tanto, apesar de ainda existirem controvérsias acerca dos modelos experimentais de HP e HAP relacionadas à similaridade com o que ocorre em humanos, o que deve ser preconizado na avaliação de novos candidatos a fármacos para o tratamento dessas condições é a avaliação das substâncias em diferentes protocolos. De acordo com a viabilidade dos modelos SU-5416/hipóxia - por induzir lesões pulmonares e insuficiência cardíaca que melhor reproduzem o cenário clínico - e MCT - que apesar de promover hipertensão em vasos pulmonares, inflamação e ter efeitos sistêmicos tóxicos, ainda assim promove intensa insuficiência ventricular direita - ambos representam uma boa opção para comparação de potenciais farmacológicos de novos candidatos a fármacos.

1.3 Planejamento e desenvolvimento de derivados *N*-acilidrazônicos

A Química Medicinal atua na elaboração estrutural, invenção, identificação e síntese de substâncias terapeuticamente interessantes, além de abordar os mecanismos de ação, incluindo a compreensão dos fatores

envolvidos na absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade das substâncias (Duarte et al, 2017). O Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LASSBio/UFRJ) apresenta como missão o planejamento, a síntese e a avaliação das propriedades farmacológicas de novas substâncias com atividade biológica, dentre essas as *N*-acilidrazonas (NAH) (Barreiro, 2002).

O interesse do LASSBio pelo fragmento *N*-acilidrazona se iniciou em 2002, empregando-se a estratégia de simplificação molecular (Figura 7) sobre derivados diidro(2*H*)piridazinônicos representada pela simples ruptura da ligação carbono-carbono **a**, o que permitiu a síntese de inúmeros compostos *N*-acilidrazônicos com promissoras propriedades anti-inflamatória, antitrombótica e analgésica (Lima et al., 2000).

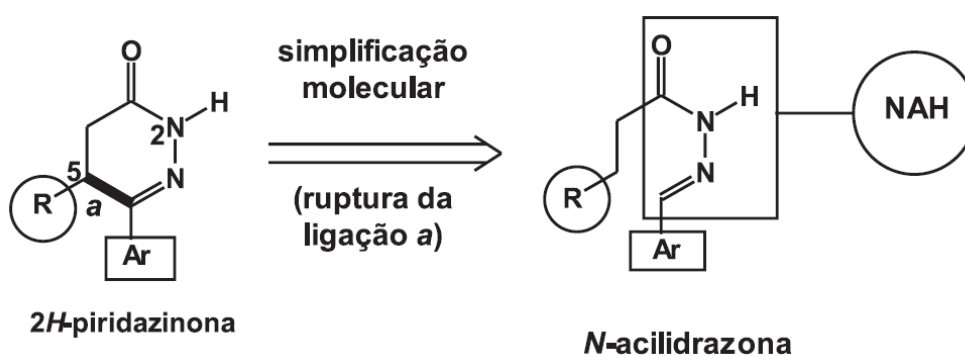


Figura 7: Esquema representativo da estratégia de simplificação molecular, utilizada para romper a ligação **a** dos derivados 2*H*-piridazinônicos obtendo-se como produto um derivado que apresentou a função NAH, antes mascarada. Adaptado de Barreiro (2002).

Inibidores de serina/treonina cinases, como a I κ B cinase β (IKK-2) e de MAPK tem sido foco de pesquisa ao longo dos anos devido ao potencial uso terapêutico desses inibidores no tratamento de doenças crônicas como câncer e artrite reumatóide (Hollenbach et al, 2004, Gupta et al, 2014, Tang et al, 2015). A exemplo do sucesso de alguns inibidores de tirosina quinase como vemurafenibe, palbociclibe, e trametinibe, (Figura 8) usados como opção terapeutica dessas doenças (Bollag et al; 2012; Turner et al, 2015; Finn et al, 2015; Lugowska et al, 2015; Wu et al, 2016).

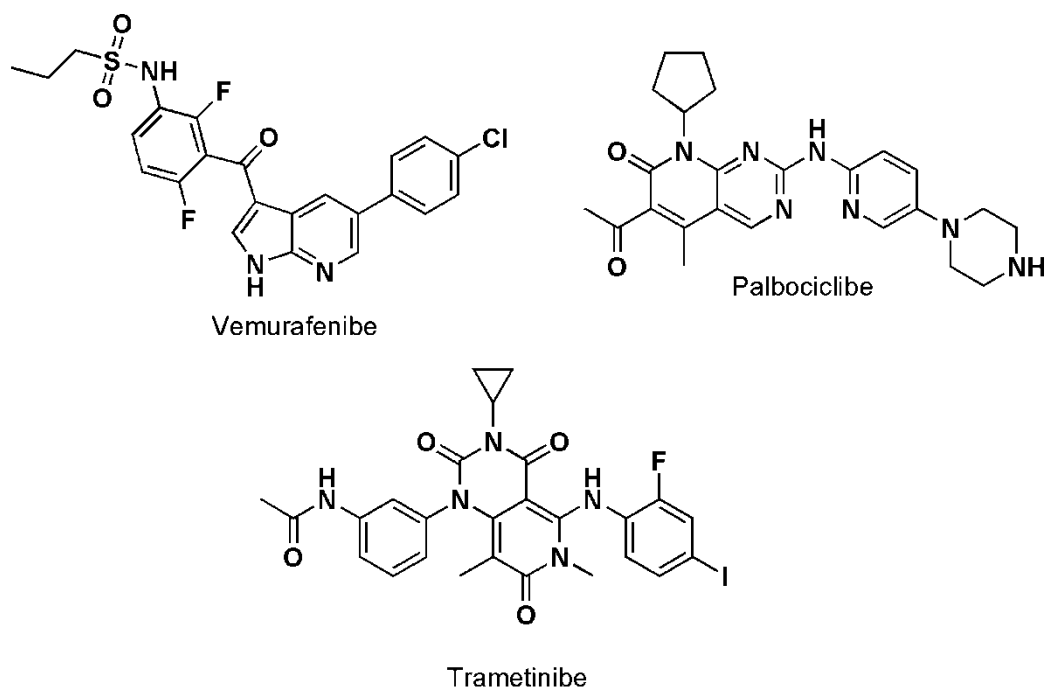


Figura 8: Fármacos inibidores de tirosina cinases.

A inibição de proteínas cinases constituem um alvo terapêutico atraente para o desenvolvimento de novos protótipos a fármacos (Noble et al, 2004; Wu et al, 2015). Na busca e desenvolvimento de novos protótipos inibidores de cinases realizada pelo LASSBio, cabe destacar a substância LASSBio-1524 (Figura 9) que foi planejada através de estudos de modelagem molecular e foi o primeiro inibidor de IKK2 ($CI_{50} = 20 \mu\text{M}$) contendo a subunidade *N*-acilidrazona (Duarte et al, 2007). A otimização estrutural de LASSBio-1524 direcionou a gênese e identificação de LASSBio-1829 (Figura 9) como um potente inibidor de IKK2 (Guedes et al, 2016). Além disso, essa substancia também apresentou importante atividade anti-inflamatória em modelos animais (Guedes et al, 2016). A partir da estrutura de LASSBio-1829 foram empregadas estratégias da Química Medicinal como a simplificação molecular e bioisosterismo para o desenvolvimento de 4 novos derivados *N*-acilidrazônicos (Barreiro et al, 2002; Lima et al, 2005; Freitas et al, 2017) LASSBio-1827, LASSBio-1824, LASSBio-1823 e LASSBio-1832 (Figura 9). Apesar de terem sido planejadas como inibidoras de IKK2, as moléculas não apresentaram atividade inibitória nessa enzima. Contudo, o perfil inibitório foi testado em outra cinase como a MAPK p38 α , demonstrando potencial atividade inibitória, com concentração inibitória média (CI_{50}) entre 4.45 a 50.9 μM .

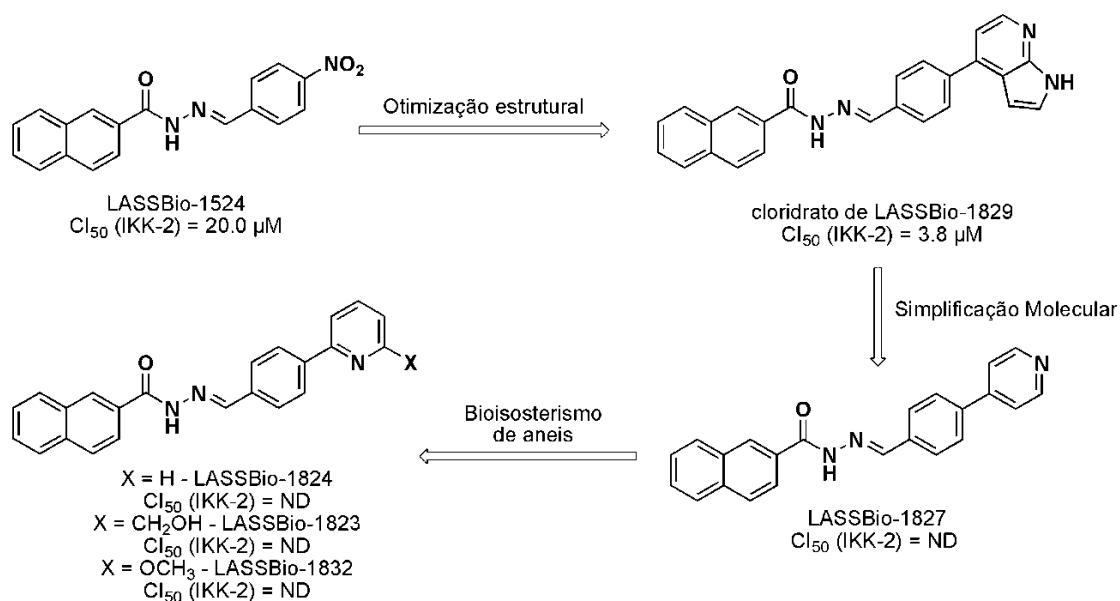


Figura 9: Representação esquemática do desenvolvimento de novos derivados N-acilidrazônicos.

Dentre a nova série de derivados, destacou-se LASSBio-1824 (Figura 10), um potente inibidor de MAPK p38 α com Cl₅₀ = 4.45 µM, ação inibitória verificada por meio de um ensaio de inibição de cinases (Goettert et al, 2010). A relevante ação inibitória de LASSBio-1824 na MAPK p38 α , uma cinase pró-inflamatória, foi também confirmada através da atividade anti-inflamatória *in vivo*. LASSBio-1824 apresentou uma promissora ação anti-inflamatória, além de diminuir significativamente a produção de TNF- α , corroborando seu potencial como protótipo anti-inflamatório. (Freitas et al, 2017).

A p38 α MAPK atua fosforilando seus alvos, ela usa o ATP para transferir fosfato para seus substratos, por meio de um sítio específico da molécula. O mecanismo de ação de LASSBio-1824 ocorre por impedimento dessa ligação entre o ATP e a molécula de P38 α MAPK. LASSBio-1824 interage em uma cavidade distinta do sítio de ligação ao ATP da p38 α , ela interage com resíduos de aminoácidos His-171 e Asp-165 através de pontes de hidrogênio e dessa forma impede a fosforilação pela P38 α MAPK. (Freitas et al, 2017).

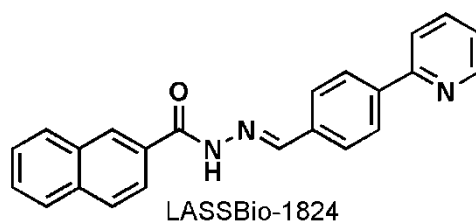


Figura 10: Estrutura de (*E*)-*N*-(4-(piridin-2-il) benzilideno)-2-nafto-hidrazida (LASSBio-1824).

1.4 Justificativa

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

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

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

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

2. OBJETIVO

2.1 Objetivos geral

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

2.2 Objetivos específicos

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

3. METODOLOGIA

3.1 Local da pesquisa

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

3.2 Comitê de ética

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

3.3 Substâncias Utilizadas

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

(St. Louis, MO, EUA). Anticorpo secundário usado na imunocitoquímica para α SMA foi adquirido de Nichirei (Tóquio, Japão).

3.4 Indução de HAP com monocrotalina (MCT)

Todos os experimentos foram realizados e analisados de forma cega. Inicialmente foi utilizado o modelo de HAP induzida por MCT, no qual os ratos Wistar machos (180 - 250g) receberam uma única injeção intraperitoneal de MCT (60mg/kg) (n = 10). Após 14 dias e com a confirmação da HAP através do ecocardiograma, foi iniciado o tratamento terapêutico com LASSBio-1824 (20mg/kg i.p.) com duração de 14 dias (Alencar *et al.*, 2014; Alencar *et al.*, 2017). Ecocardiograma foi realizado antes do início do protocolo e após 14 dias da injeção de MCT para confirmação da doença através da aquisição do doppler da artéria pulmonar que obtem a imagem do fluxo da AP, assim como medidas do tempo de aceleração da artéria pulmonar (TAP) e tempo de ejeção da artéria pulmonar (PET) (Thibault *et al.*, 2010; Gomez-Arroyo *et al.*, 2012; Alencar *et al.*, 2017; Alencar *et al.*, 2018; Bordenave *et al.*, 2019).

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

Protocolo experimental Monocrotalina (MCT)



Crotalaria spectabilis

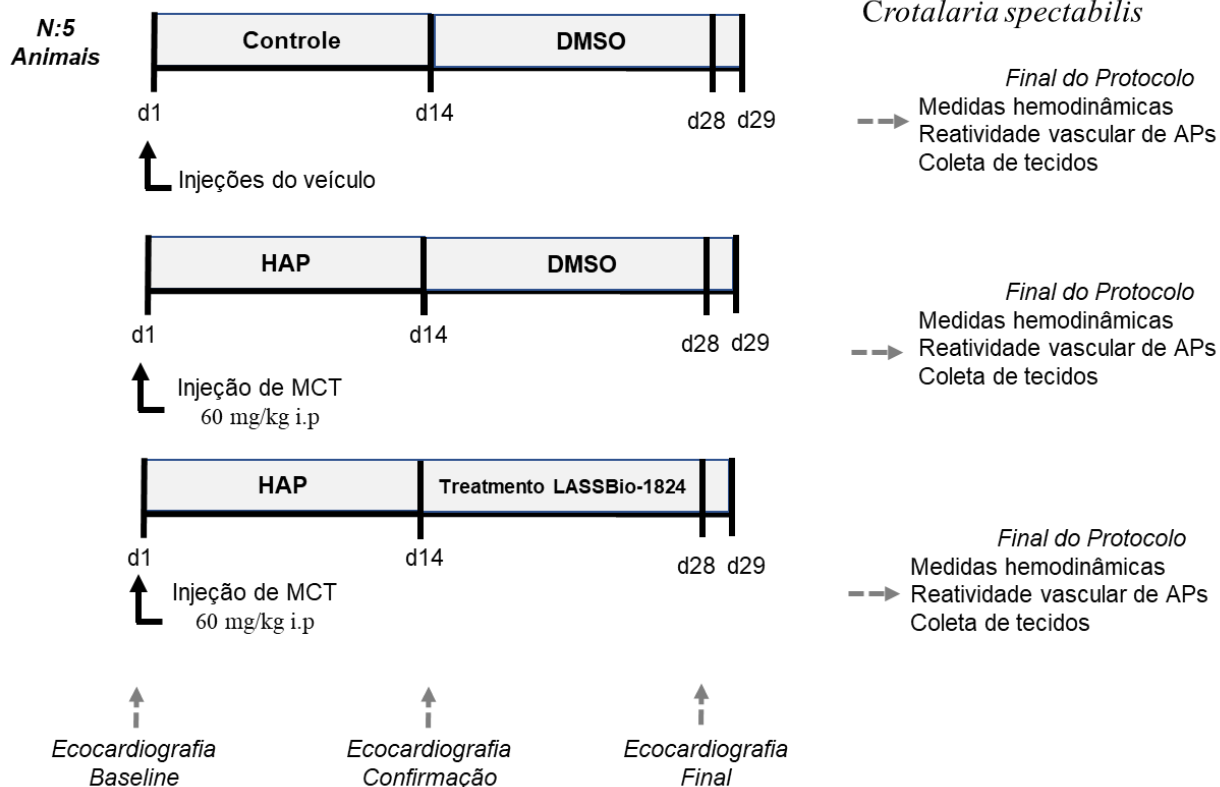


Figura 12: Esquema do desenho experimental para o protocolo de HAP induzido por MCT. Ecocardiograma foi realizado no início do estudo d1, no d14 para confirmação da HAP e ao final do protocolo. MCT, monocrotalina; HAP, hipertensão arterial pulmonar. Grupo controle n = 5, grupo MCT + veículo, n = 5, grupo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

3.5 Animais e desenho experimental hipóxia SU5416

Para induzir a HAP, ratos Wistar machos (180-250g) foram expostos durante 3 semanas à hipóxia normobárica (10% O₂; n = 10), através da manutenção em câmara de acrílico ventilada, na qual o nitrogênio foi injetado (90%) sob um controlador Oxycycler (BioSpherix, Lacona, NY, EUA). Os animais receberam uma vez por semana, via intraperitoneal SU5416 (20mg/kg). O grupo controle foi mantido em ambiente de normoxia (ar ambiente a 21% de O₂; n = 5) e recebeu injeções semanais de veículo (o mesmo usado para suspender SU5416). O ecocardiograma foi realizado antes do início do protocolo em todos os grupos experimentais, 3 semanas após a primeira

injeção de SU5416 com hipóxia e ao final do tratamento com LASSBio-1824. Utilizou-se o doppler na artéria pulmonar para adquirir imagem do trato de saída do fluxo da AP, e o estabelecimento da HAP foi confirmado por uma alteração na forma da onda de fluxo juntamente com medidas do tempo de aceleração da artéria pulmonar (TAP) e tempo de ejeção da artéria pulmonar (PET). Essas medidas foram utilizadas como parâmetro de estabelecimento da HAP (Thibault et al., 2010; Gomez-Arroyo et al., 2012; Alencar et al., 2017; Alencar et al., 2018; Bordenave et al., 2019). A Figura 13 mostra a linha temporal usada para caracterizar a evolução da HAP e o protocolo experimental. Uma vez confirmado a HAP, os ratos SuHx foram expostos a condições de normoxia por 2 semanas adicionais e foram divididos em dois grupos: SuHx + veículo (DMSO; 100µL por kg; n = 5) e SuHx + LASSBio-1824 (n = 5).

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

Protocolo experimental Hipóxia-SU5416

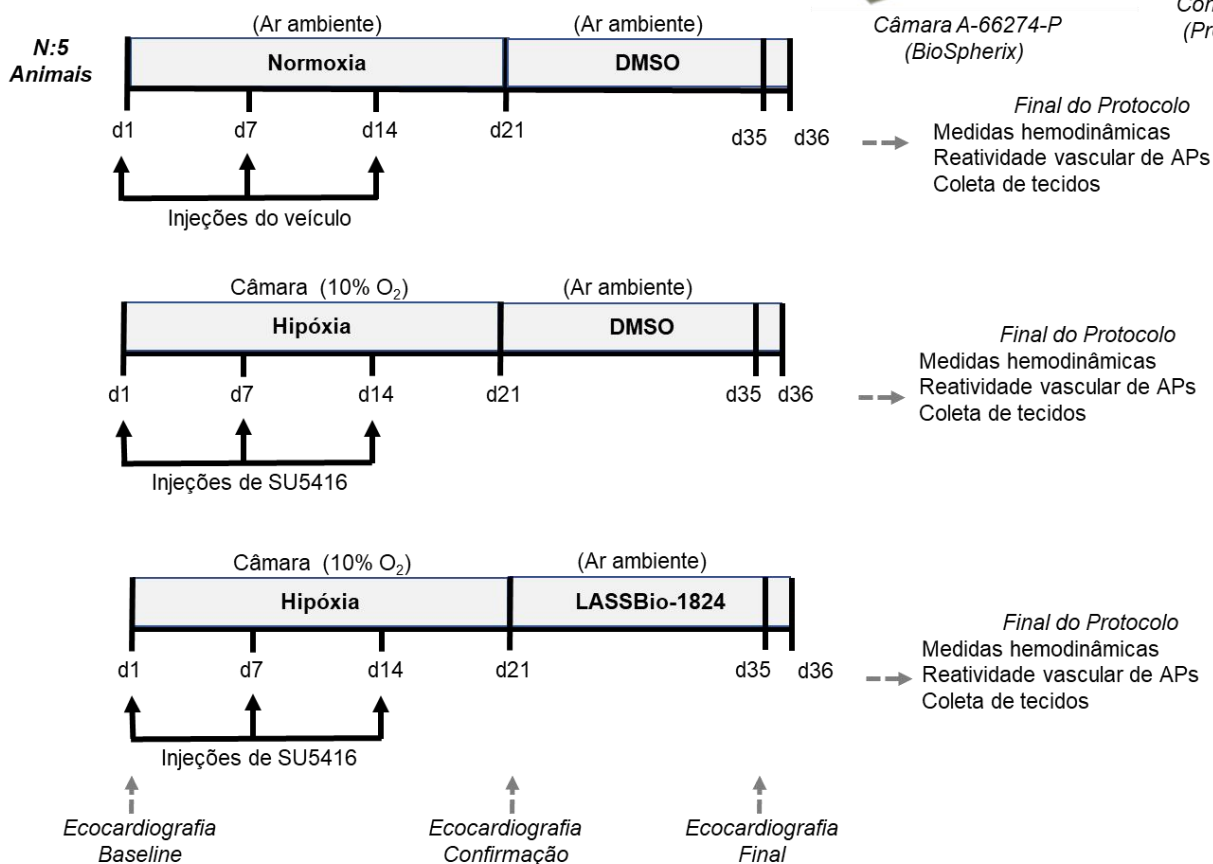
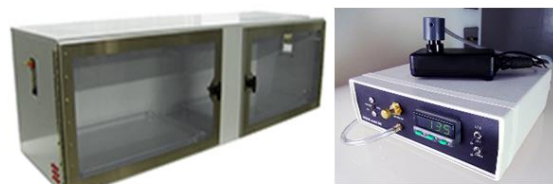


Figura 13: Esquema do desenho experimental para o protocolo de HAP induzido por SuHx. Ecocardiograma foi realizado no início do estudo d1, no d21 para confirmação da HAP e ao final do protocolo. SuHx, SU5416/hipóxia; HAP, hipertensão arterial pulmonar. Grupo normoxia n = 5, grupo SuHx + veículo, n =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

3.5 Ecocardiografia

Os animais foram anestesiados com mistura de isoflurano/oxigênio a 2% através de um cone nasal durante ventilação espontânea e colocados em decúbito lateral esquerdo para realização da ecocardiografia. A temperatura da sala foi mantida a aproximadamente 25° C para evitar hipotermia. A função e a estrutura cardíaca foram avaliadas por um sistema de imagem de ultra som de alta resolução equipado com um transdutor RMV-710B com frequência de 25 MHz e distância focal fixa de 15 mm montada em um sistema integrado (Vevo 770, Visualsonics, Toronto, Canadá). Foram registradas imagens paraesternais do VD e do VE em eixo curto e longo, e captadas suas áreas em diástole final.

O volume sistólico do ventrículo esquerdo (VSVE) foi obtido no modo B, de acordo com o método de Simpson. O débito cardíaco do VE (DCVE) foi calculado como $DCVE = VSVE \times \text{frequência cardíaca}$. A espessura da parede do VD foi obtida em modo M para determinar um índice indireto de hipertrofia. O volume sistólico do ventrículo direito (VSVD) foi obtido a partir do diâmetro da AP (APd) e do fluxo da AP medido no plano paraesternal de eixo curto no meio da sístole, pela ecocardiografia Doppler bidimensional e onda de pulso, respectivamente. O VSVD foi calculado como $VSVD = \text{área da seção transversa da AP (AST)} \times \text{integral do tempo da velocidade da AP}$, onde $AP_{AST} = (APd/2)^2 \times 3,14$. O débito cardíaco do ventrículo direito (DCVD) = VSVD \times frequência cardíaca, de acordo com os procedimentos já publicados (Urboniene et al., 2010). Todos os parâmetros seguiram a Sociedade Americana de Ecocardiografia.

3.6 Medida invasiva de parâmetros hemodinâmicos

Os animais foram submetidos a anestesia com ketamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (15 mg/kg, i.p.) para realização da introdução de cateter de volume pressórico (SPR-838, Millar Instruments, Houston, TX, EUA) na artéria carótida esquerda para medir a pressão sistólica (PAS), diastólica (PAD) e arterial média (PAM). Posteriormente, o cateter foi posicionado até o VE para registrar a pressão sistólica do VE (PSVE), enquanto a medida da PSVD foi feita através da inserção do cateter conectado a um transdutor de pressão (MLT884, ADInstruments, Inc., Colorado Springs, CO, EUA) no VD através da veia jugular externa direita. Os parâmetros foram registrados em computador para análise usando o software Lab Chart (Versão 7.0, ADInstruments, Inc.). Imediatamente após as medidas hemodinâmicas, os animais foram eutanasiados por exsanguinação através de punção cardíaca para retirada de tecidos e consequente avaliação histopatológica e molecular.

3.7 Retirada e acondicionamento de tecidos

Os pulmões foram lavados brevemente em solução salina e os lobos direitos foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido para análise de

expressão de proteínas. Os lobos esquerdos foram inflados com formalina de zinco e imersos nesse fluido para fixação e posterior incorporação em parafina (Alencar et al., 2017). Os corações foram pesados e a parede do VD foi separada do VE e septo (S). A razão entre o peso do VD e o VE mais o septo ($VD/VE + S$) foi calculada para determinar a extensão da hipertrofia do VD. VD e VE foram seccionados longitudinalmente e uma porção foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido para análise molecular, e a outra imersa em formalina de zinco. Os tecidos separados para estudo histológico, permaneceram fixados em formaldeído tamponado a 10% por uma semana e depois foram parafinizados: imersos em álcool 70% por 24h, passam por uma série de 3 banhos de álcool a 100%, 3 banhos de xilol. Os pulmões ficaram 40 minutos em cada banho e os VD 20 minutos. Por fim, os tecidos submetidos a dois banhos de parafina, e em sequência inseridos em blocos de parafina para posterior corte em micrótomo. Cortes de 5 μ m de espessura foram delicadamente acomodados em lâminas de vidro para secagem em estufa. O material histológico foi numerado aleatoriamente e a análise realizada por observador cego. Posteriormente, um outro experimentador coletou os dados e realizou análise estatística.

3.8 Análise imunohistopatológica pulmão e VD

Cortes de VD e pulmões foram corados com picro-Sirius red (PSR) para avaliação do conteúdo de colágeno cardíaco e perivascular. Os cortes foram reidratados com lavagem com xileno e etanol e, em seguida, corados com PSR por 90 minutos e montados com Entellan (Merck, Alemanha) conforme descrito anteriormente (Alencar et al., 2017). O conteúdo de colágeno perivascular foi determinado como a razão entre a área perivascular e a área da secção transversal do vaso, mas o colágeno intersticial do VD expresso pela área média de colágeno no tecido miocárdico. Foram fotografadas de 15-20 arteríolas com diâmetro externo inferior a 150 μ m dos pulmões (aumento de 1000 \times) e 10 campos de VD (aumento de 400 \times) usando uma câmera digital (Canon A620, Canon, EUA) acoplada a um microscópio óptico (Axiostar, Zeiss, Alemanha).

Para a avaliação da hipertrofia medial nas arteríolas intrapulmonares as secções de pulmão foram imunocoradas para α -SMA. A atividade da peroxidase endógena foi extinta usando peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) após desparafinação e reidratação das seções seguida de bloqueio da ligação não específica usando incubação de BSA a 5% por 60 minutos. Depois disso, as seções foram incubadas por 2 h com anticorpo anti- α SMA em PBS com BSA a 1%. Após a lavagem em PBS, as lâminas foram expostas ao anticorpo secundário de polímero anti-rato-HRP diluído 1:3 em PBS por 2h seguido por solução de 3,3'-diaminobenzidina e hematoxilina como contra coloração. A espessura média da parede foi calculada como a fração da área da seção transversal do vaso corada em marrom observada nas fotos tiradas de arteríolas com diâmetro externo inferior a 150 μ m.

Imunocoloração de cardiomiócitos para c-Fos

Secções do VD foram desparafinizadas, permeabilizados em PBS-Triton X100 0,1% e incubados com anticorpo anti-c-Fos (1:200), durante uma noite em câmara úmida a 4°C. A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio (3% v/v em PBS) por 15 minutos seguido de incubação com anticorpo secundário (1:3) por 1h em câmara úmida em temperatura ambiente. A detecção foi realizada usando uma técnica padrão de diaminobenzidina e hematoxilina como contraste. Foram fotografados 10 campos com câmera digital (Canon A620, Canon, EUA) acoplada a microscópio óptico (Axiostar, Zeiss, Alemanha) com aumento de 1000x. A ativação de c-Fos foi expressa como a fração da contagem total de núcleos de cardiomiócitos apresentando coloração marrom.

3.9 Avaliação da reatividade vascular de artérias pulmonares

Após a eutanásia, 3 mm da artéria pulmonar mais próxima do coração foi removida e preparada para registro da tensão isométrica. Os anéis foram posicionados em cubas experimentais por meio de hastes metálicas, com uma extremidade do tecido conectada a um transdutor de força para o registro de tensão. No interior das cubas experimentais, os anéis da artéria pulmonar foram imersos em uma solução nutritiva de Tyrode modificada (NaCl 120 x

10^{-3} mol·L⁻¹, $5,9 \times 10^{-3}$ mol·L⁻¹ KCl, $1,2 \times 10^{-3}$ mol·L⁻¹ MgCl₂, $1,2 \times 10^{-3}$ mol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 18×10^{-3} mol·L⁻¹ NaHCO₃, $1,2 \times 10^{-3}$ mol·L⁻¹ CaCl₂ e 11×10^{-3} mol·L⁻¹ glicose; pH 7,4) e oxigenado com gás carbônico (95% O₂ / 5% CO₂) a $37,0 \pm 0,5$ °C. Após equilíbrio de 2 horas e com 1,5 g de tensão em repouso, as preparações foram expostas a concentrações crescentes de fenilefrina (Phe, 1 nM - 10 µM). Após um platô de contração, os anéis de AP foram expostos a concentrações crescentes de acetilcolina (ACh, 1 nM - 10 µM) para determinar a capacidade de vasodilatação e a integridade endotelial.

3.10 Expressão de proteínas - análise de Western Blot

Tecidos do pulmão e do VD foram obtidos, armazenados em tampão de lise com inibidores de protease e congelados em nitrogênio líquido até a homogeneização. Os tecidos pulmonares e cardíacos foram homogeneizados em um homogeneizador de vidro potter usando tampão de lise (12,5% de sacarose, 20 mM de Tris-HCl pH 7,4, 1 mM de EDTA) na presença de 1 mM de fenilmetanossulfonilfluoreto, 1 mM de benzamidina, 1 mM de ditioneitol e 1 µg/mL da solução de inibidor de protease polipeptídica (pepstatina, quimostatina, aprotinina, leupeptina e antipaina). A mistura foi centrifugada por 5 min a 1000xg e o sobrenadante (cerca de 1ml) foi coletado e congelado a -80°C. A concentração de proteína total em cada amostra foi determinada em espectrofotômetro usando o método de Bradford (Bradford, 1976). Proteínas (50 µg) foram detectadas em gel de SDS-PAGE 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando um sistema semi-seco (Bio-Rad, EUA). As membranas foram bloqueadas usando 5% de leite desnatado em PBS, que continha 0,1% de Tween 20 e incubadas com anticorpos primários contra TNFα (1:1000), caspase-3 ativa (1:1000), p-38 MAPK (1:200), fosfo-p-38 MAPK (1:1000), ERK5 (1:200), fosfo-p-ERK5 (1:100), iNOS (1:1000), c-Fos (1:200) e GAPDH (1:1000), todos diluídos em PBS. A solução de anticorpo foi usada duas vezes. Após a marcação das membranas com anticorpos primários e secundários (diluídos 1:10000 em PBS), a detecção de bandas específicas foi realizada utilizando ECL Prime como substrato para HRP. As imagens foram adquiridas por quimioluminescência usando Image Quant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences). Todas as imagens foram processadas usando o

software NIH ImageJ (versão 1.6.0) e a quantificação da densidade da banda de proteína normalizada para GAPDH foi medida usando ImageJ.

3.11 Análise estatística

A análise de dados foi realizada para todos os desfechos, e a análise de variância unidirecional, ANOVA, foi usada para determinar a significância das diferenças entre os grupos ($n = 5$ por grupo). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A ANOVA foi seguida do teste post-hoc de Tukey quando se atingiu o nível de significância estatística necessário e não houve heterogeneidade entre os grupos. A correlação de Pearson foi usada para testar a relação entre a espessura da parede do vaso, a eficácia da ACh e as mudanças na relação TAP/TET. A análise foi realizada usando GraphPad Prism, versão 6 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Para todas as análises estatísticas, exceto para Western blot, 5 animais identificados por números foram usados por grupo. A análise não cega de western blot incluiu 4 animais por grupo, uma vez que a concentração de proteína obtida em um animal do grupo SuHx + DMSO não foi suficiente para a análise.

4. RESULTADOS

4.1 Hemodinâmica cardiovascular e parâmetros funcionais

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

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

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

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

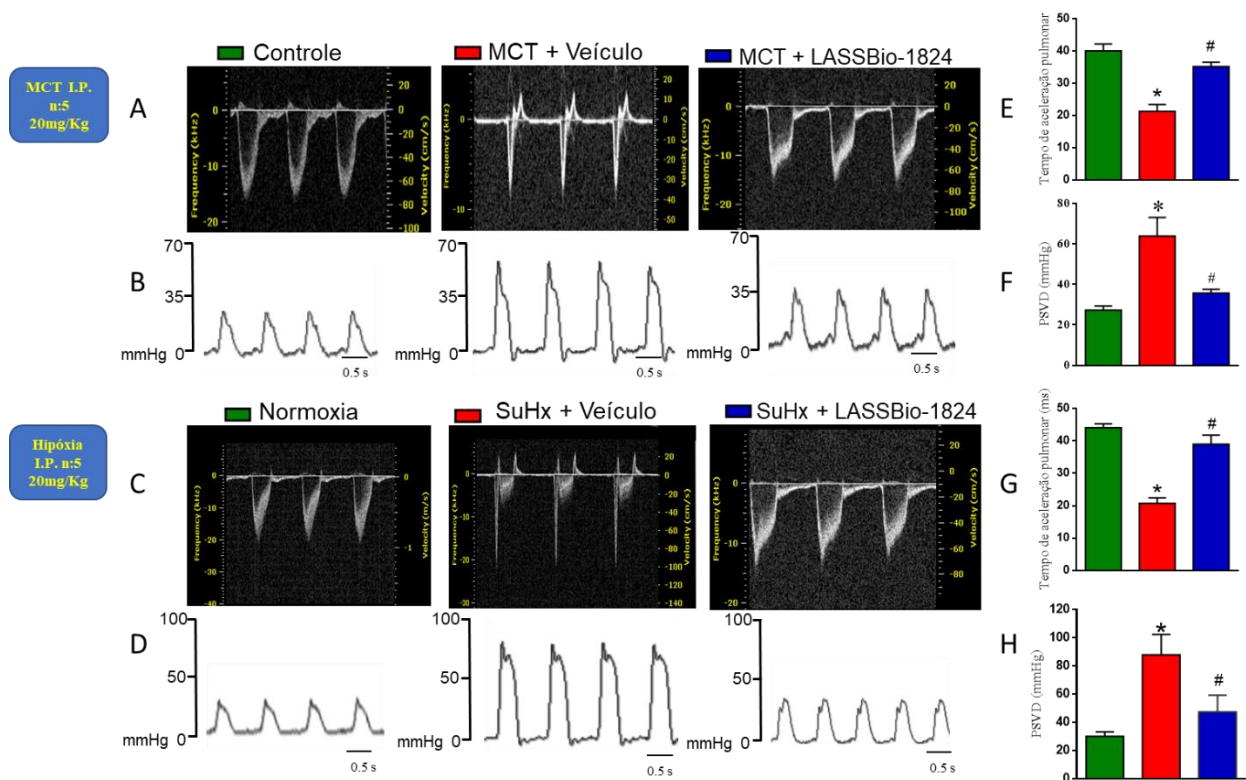


Figura 14: Efeitos da terapia com LASSBio-1824 nas alterações vasculares pulmonares e hemodinâmicas observadas em ratos SuHx e MCT. (A/C) imagens representativas do trato de saída do fluxo da AP de todos os grupos. (B/D) traçados representativos da PSVD. (E/G) tempo de aceleração pulmonar. (F/H) PSVD.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

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

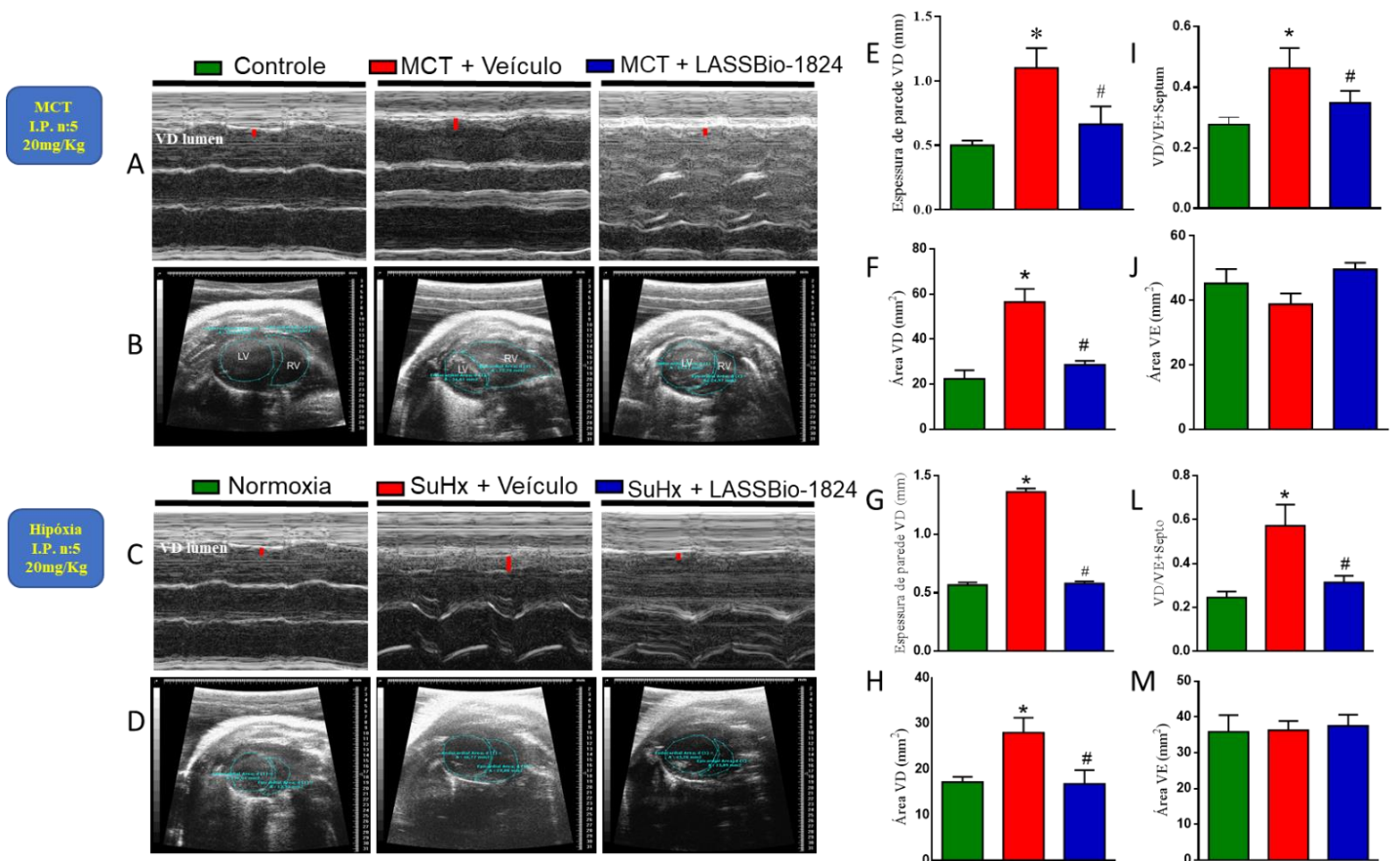


Figura 15: Efeitos do tratamento com veículo ou LASSBio-1824 na estrutura do coração de ratos SuHx e MCT. (A/C) imagens representativas da parede livre do VD obtidas pela ecocardiografia modo-M. (B/D) imagens representativas de incidências paraesternais no eixo curto obtidas por ecocardiografia modo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

4.1.2 Administração oral no grupo SuHx

O protocolo experimental e os tratamentos com veículo ou LASSBio-1824 tiveram efeitos neutros no peso corporal final, uma vez que os mesmos não se alteraram entre os grupos experimentais (Figura 16). Durante o tratamento oral, nem o veículo nem o LASSBio-1824 promoveram efeitos significativos sobre as pressões sistêmicas dos grupos experimentais (Tabela 3), uma vez que a PAS, PAD e PAM de forma invasiva não foram alteradas, indicando a ausência de hipotensão sistêmica indesejada. No final do protocolo, a PSVE permaneceu inalterada pela HAP ou pelos tratamentos

(Tabela 3). Não foram observadas diferenças no VSVE, frequência cardíaca e DCVE entre os ratos controle ou HAP. Contudo, o VSVD e DCVD dos animais SuHx tratados com veículo reduziram consideravelmente quando comparado aos grupos normoxia e tratados com LASSBio-1824 (Tabela 3).

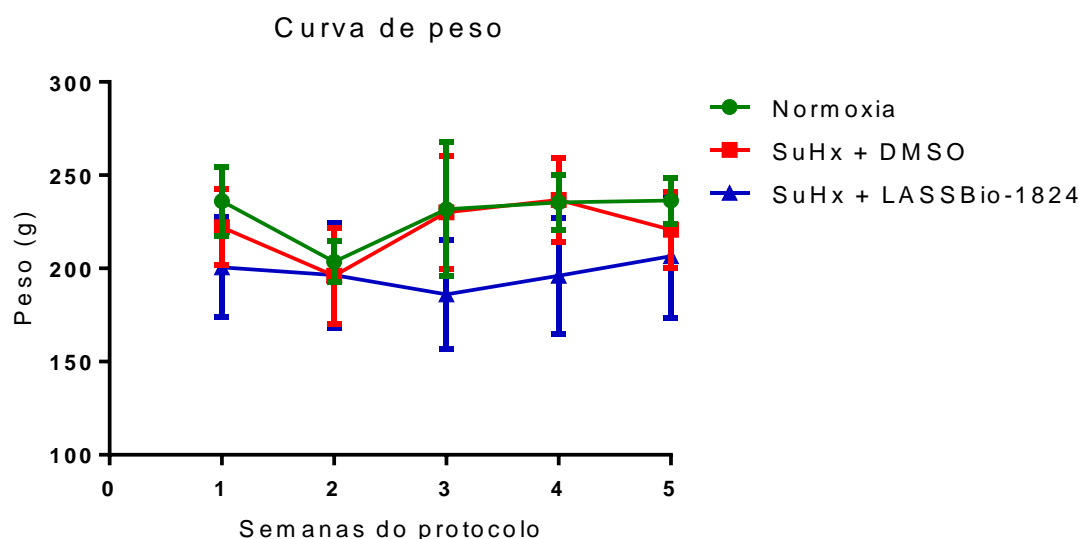


Figura 16: Curva de peso de ratos com HAP induzidos por SuHx e normoxia tratados com veículo ou LASSBio-1824.

Grupos	Normoxia	SuHx + veículo	SuHx + LASSBio-1824
Peso corporal (g)	236.4 ± 5.5	220.8 ± 9.1	206.5 ± 16.5
PAS (mmHg)	106.9 ± 6.8	104.7 ± 3.8	97.2 ± 8.6
PAD (mmHg)	79.5 ± 7.1	81.6 ± 4.5	71.3 ± 5.4
PAM (mmHg)	93.3 ± 6.9	93.4 ± 4.1	84.2 ± 2.8
PSVE (mmHg)	98.1 ± 4.1	83.3 ± 5.2	89.6 ± 2.4
VSVE (mL)	0.23 ± 0.01	0.27 ± 0.03	0.25 ± 0.02
DCVE (mL/min)	68.8 ± 4.8	79.8 ± 11.6	71.3 ± 7.9
VSVD (mL)	0.18 ± 0.009	<u>0.07 ± 0.007 *</u>	<u>0.18 ± 0.008#</u>
DCVD (mL/min)	54.1 ± 3.8	<u>22.4 ± 2.9*</u>	<u>54.3 ± 3.7#</u>
FC	286.0 ± 10.8	290.5 ± 12.8	275.8 ± 10.3

Tabela 3: Função e estrutura cardíaca – Grupo SuHx- 50mg/Kg via oral. Dados representam a média ± SEM (n = 6 ratos por grupo). * p <0,05 em comparação com o grupo controle normóxia. #p <0,05 em comparação com o grupo SuHx + veículo. PAS, pressão arterial sistólica sistêmica; PAD, pressão arterial diastólica sistêmica; PAM, pressão arterial média sistêmica; PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; VSVE, volume sistólico do ventrículo esquerdo; DCVE, débito cardíaco do ventrículo esquerdo; VSVD, volume sistólico do ventrículo direito; DCVD, débito cardíaco do ventrículo direito.

A razão entre TAP e TET, parâmetros medidos pela ecocardiografia Doppler, foi usada para confirmar o desenvolvimento da HAP. Da mesma forma que o TAP isolado, essa relação é uma medida indireta da resistência vascular pulmonar, apenas normalizada para reduzir a influência de variáveis como a FC. A razão TAP/TET reduziu significativamente no dia 21 do protocolo nos ratos SuHx em comparação ao grupo normoxia ($p < 0,05$; Figura 17). A inibição da MAPK p-38 α pela administração oral de LASSBio-1824 por 14 dias aumentou significativamente a proporção TAP/TET ao final do protocolo quando comparada com ratos HAP tratados com veículo ($p < 0,05$; Figura 17).

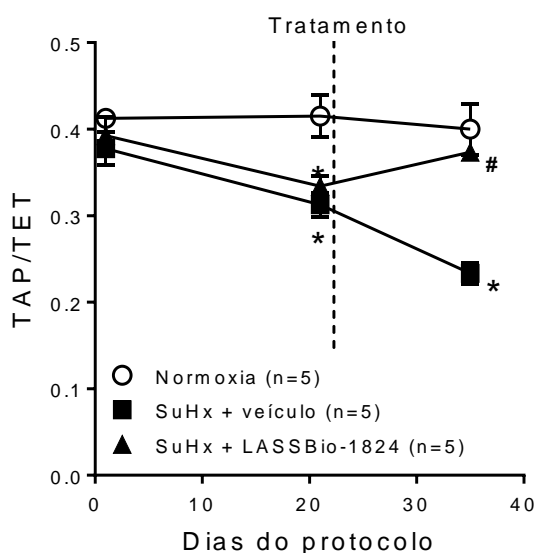


Figure 17: Regressão linear entre a relação TAP/TET e dias de protocolo. SuHx, SU5416/hipóxia; HAP, hipertensão arterial pulmonar; TAP, tempo de aceleração da artéria pulmonar; TET, tempo de ejeção da artéria pulmonar. Grupo normoxia n = 5, grupo SuHx + veículo, n = 5, grupo SuHx + LASSBio-1824, n =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

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

A Figura 18A mostra imagens representativas do trato de saída do fluxo sanguíneo da AP mensurados pela ecocardiografia com Doppler. Observou-se a formação de um *mid-systolic notch*, ou incisura no meio da sístole após exposição crônica dos animais ao protocolo SuHx. É importante ressaltar que a terapia com LASSBio-1824 em ratos com HAP normalizou a forma do fluxo de

saída (Figura 18A). As Figuras 18B-C mostram imagens representativas de cortes pulmonares para imunohistoquímica de α SMA e conteúdo de colágeno perivascular, respectivamente. Cinco semanas após o início do protocolo, os ratos HAP tratados com veículo exibiram uma diferença significativa na espessura da parede das arteríolas distais em comparação com o grupo normoxia (Figuras 18D-E; $p < 0,05$). A administração de LASSBio-1824 em animais SuHx restringiu totalmente a hipertrofia da parede medial dos vasos em comparação com ratos HAP tratados com veículo (Figuras 18D-E; $p < 0,05$). A deposição perivascular de colágeno foi significativamente maior em ratos SuHx do que em animais normoxia (Figura 18F; $p < 0,05$). Quatorze dias de administração oral de LASSBio-1824 em ratos com HAP reduziu significativamente a fibrose perivascular, quando comparado ao grupo SuHx tratado com veículo (Figura 18F; $p < 0,05$). A Figura 18G mostra que o relaxamento da AP induzido por ACh foi reduzido em animais com HAP em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$), indicando que o modelo SuHx induziu lesão endotelial nas APs. O tratamento com LASSBio-1824 aumentou a resposta a ACh em APs de ratos com HAP em comparação com ratos SuHx tratados com veículo (Figura 18G; $p < 0,05$). Finalmente, as Figuras 18H-I mostram a espessura da parede do vaso e o relaxamento induzido por ACh em APs, respectivamente, esses resultados estão correlacionados com a razão TAP/TET ($p < 0,05$). Logo, a hipertrofia da parede das APs distais e a disfunção endotelial subsequente podem ser responsáveis pela menor proporção entre TAP/TET nos ratos com HAP.

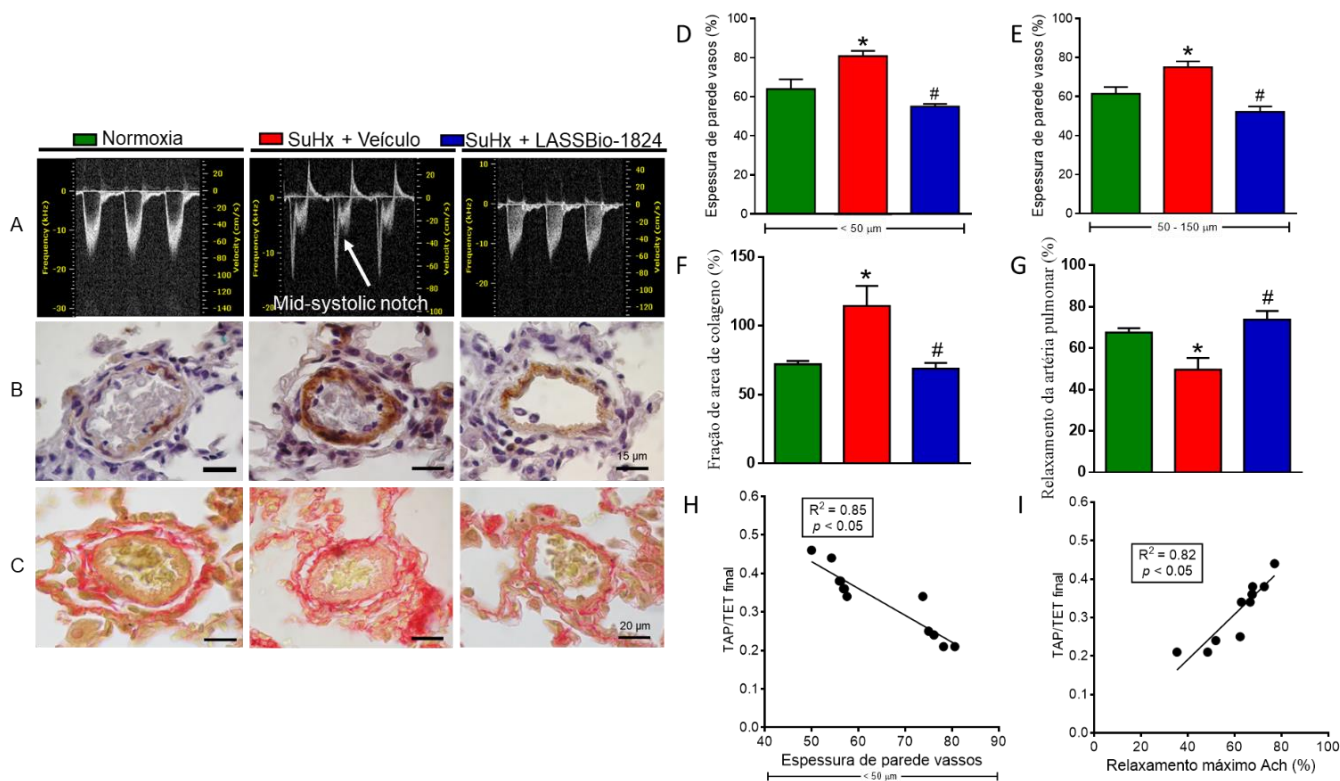


Figura 18: Efeitos da terapia com LASSBio-1824 nas alterações vasculares pulmonares observadas em ratos SuHx-HAP. (A) Imagens representativas do trato de saída do fluxo da AP de todos os grupos 35 dias após o início do protocolo. (B) Imunohistoquímica para α -SMA de APs distais de ratos expostos a normoxia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

4.3 Redução da sobrecarga e da hipertrofia concêntrica do VD pelo LASSBIO-1824

A Figura 19A mostra imagens ecocardiográficas representativas do VD de todos os grupos experimentais obtidos pelo modo M. Cinco semanas de sobrecarga de VD induzida por SuHx nos ratos com HAP resultaram em hipertrofia concêntrica do VD, como demonstrado pelo aumento significativo na espessura da parede livre do VD nos animais SuHx em comparação ao grupo normoxia (Figura 19D; $p < 0,05$). A hipertrofia do VD foi confirmada ainda mais

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

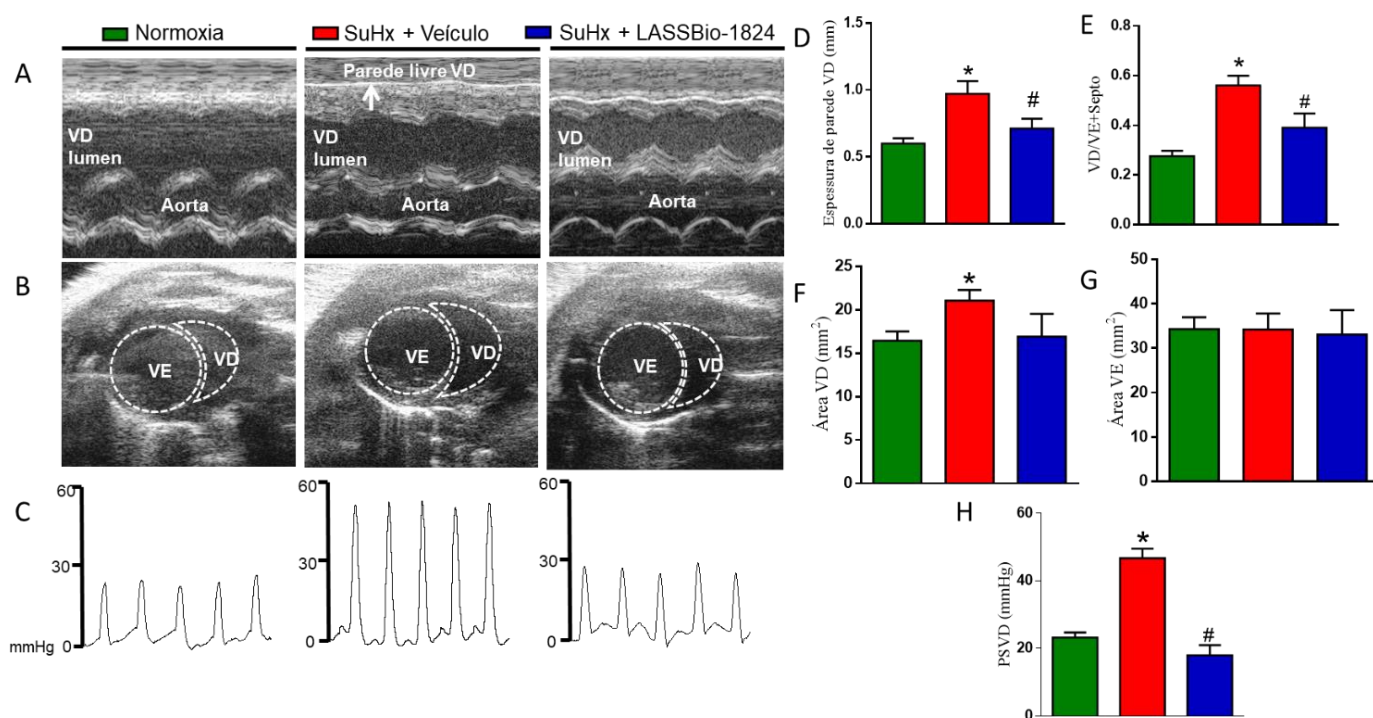


Figura 19: Efeitos do tratamento com veículo ou LASSBio-1824 na estrutura e função do coração de ratos SuHx-HAP. (A) imagens representativas da parede livre do VD obtidas pela ecocardiografia modo-M. (B) imagens representativas de incidências paraesternais no eixo curto obtidas por ecocardiografia modo B (em diástole final). (C) traçados representativos da PSVD. (D) espessura da parede livre do VD. (E) relação VD/VE + septo. (F) Área de VD. (G) Área do VE. (H) PSVD. Dados representam a média \pm S.E.M. ($n = 5$ ratos por grupo). * $P < 0,05$ em comparação com o grupo normóxia; # $P < 0,05$ em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo. *One-way ANOVA* com múltiplas comparações. Teste *post hoc* de Tukey. SuHx, SU5416/hipóxia; HAP, hipertensão arterial pulmonar; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo; PSVD, pressão sistólica do ventrículo direito.

4.4 Normalização da expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular, inflamação e apoptose em amostras de pulmão e VD

Imagens representativas de Western Blot de tecidos pulmonares de todos os grupos experimentais são mostradas na Figura 20A. Os níveis de TNF- α e iNOS aumentaram significativamente nos ratos SuHx tratados com veículo, em comparação com os seus pares de normoxia (Figuras 20B-C; $p < 0,05$). A relação MAPK fosfo-p-38/MAPK p-38 aumentou no grupo SuHx em comparação aos ratos controle normoxia (Figuras 20D; $p < 0,05$), e os níveis de caspase-3 ativa também foram maiores que os níveis do grupo normoxia (Figura 20E; $p < 0,05$). Da mesma forma a relação fosfo-p-ERK-5/ERK-5 e a expressão de c-Fos aumentaram significativamente no grupo SuHx (Figuras 20F-G; $p < 0,05$). Quatorze dias de tratamento com LASSBio-1824 em ratos com HAP normalizaram completamente a expressão desses marcadores da HAP, em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo (Figura 20B-G; $p < 0,05$). Imagens de Western blot do VD de todos os grupos experimentais são mostradas na Figura 21A. As Figuras 21B-G mostram que os níveis de proteínas TNF- α , iNOS, fosfo-p-38 MAPK, caspase-3 ativa, fosfo-p-ERK-5/ERK-5 e c-Fos aumentaram no VD dos animais com HAP, em comparação com o grupo normoxia, respectivamente ($p < 0,05$). O tratamento dos ratos SuHx com LASSBio-1824 normalizou a expressão de todas essas moléculas envolvidas na remodelação do VD, na progressão para uma câmara direita hipertrofiada com conseqüente desenvolvimento de disfunção, em comparação com animais com HAP tratados com veículo (Figuras 7B-E; $p < 0,05$).

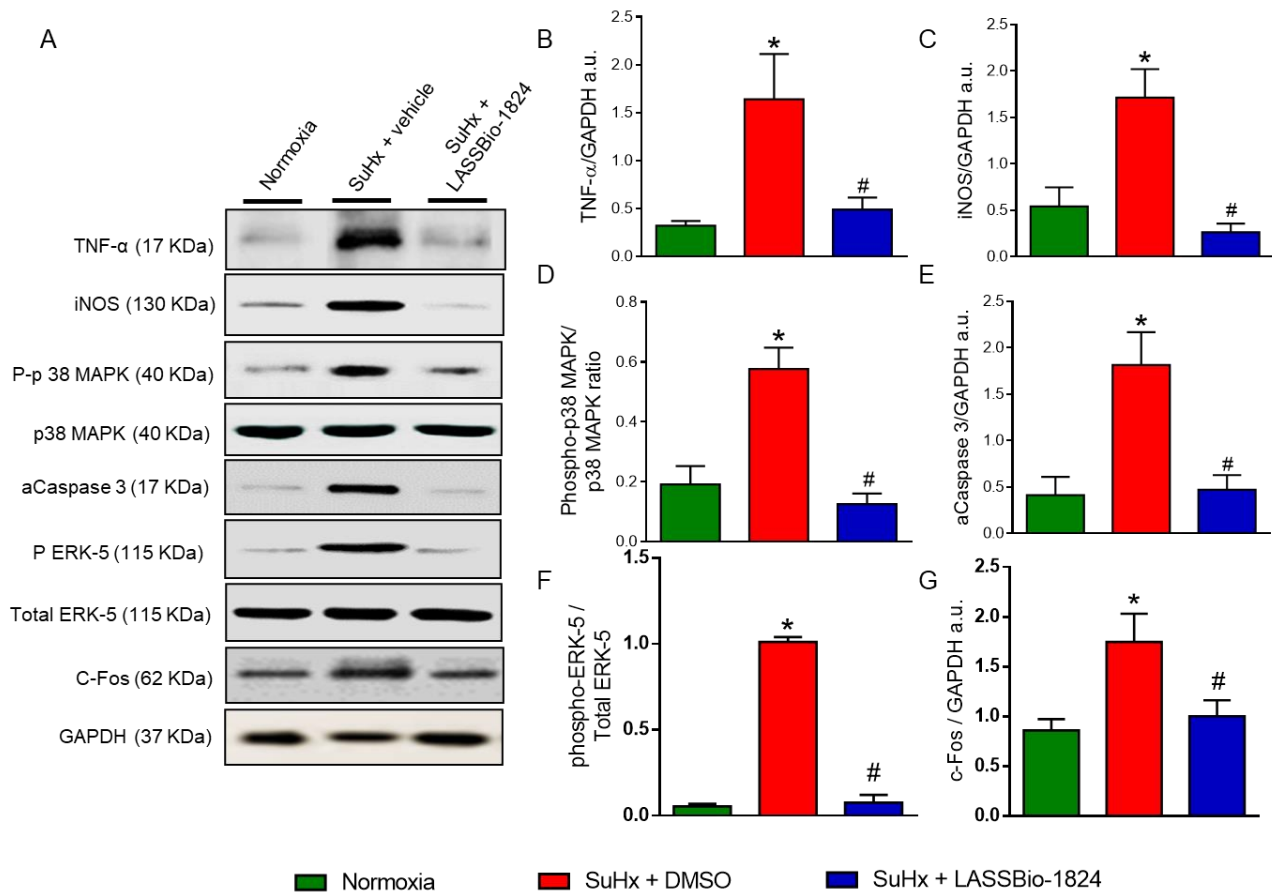


Figura 20: Efeitos do modelo SuHx na expressão de proteínas no pulmão ao longo de 35 dias do protocolo e tratamento oral com veículo ou LASSBio-1824 por 14 dias. A Figura (A) mostra imagens das diferentes membranas do western blot para TNF- α , iNOS, p-p38 MAPK, p-38 MAPK, caspase 3 ativa, p ERK-5, ERK-5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

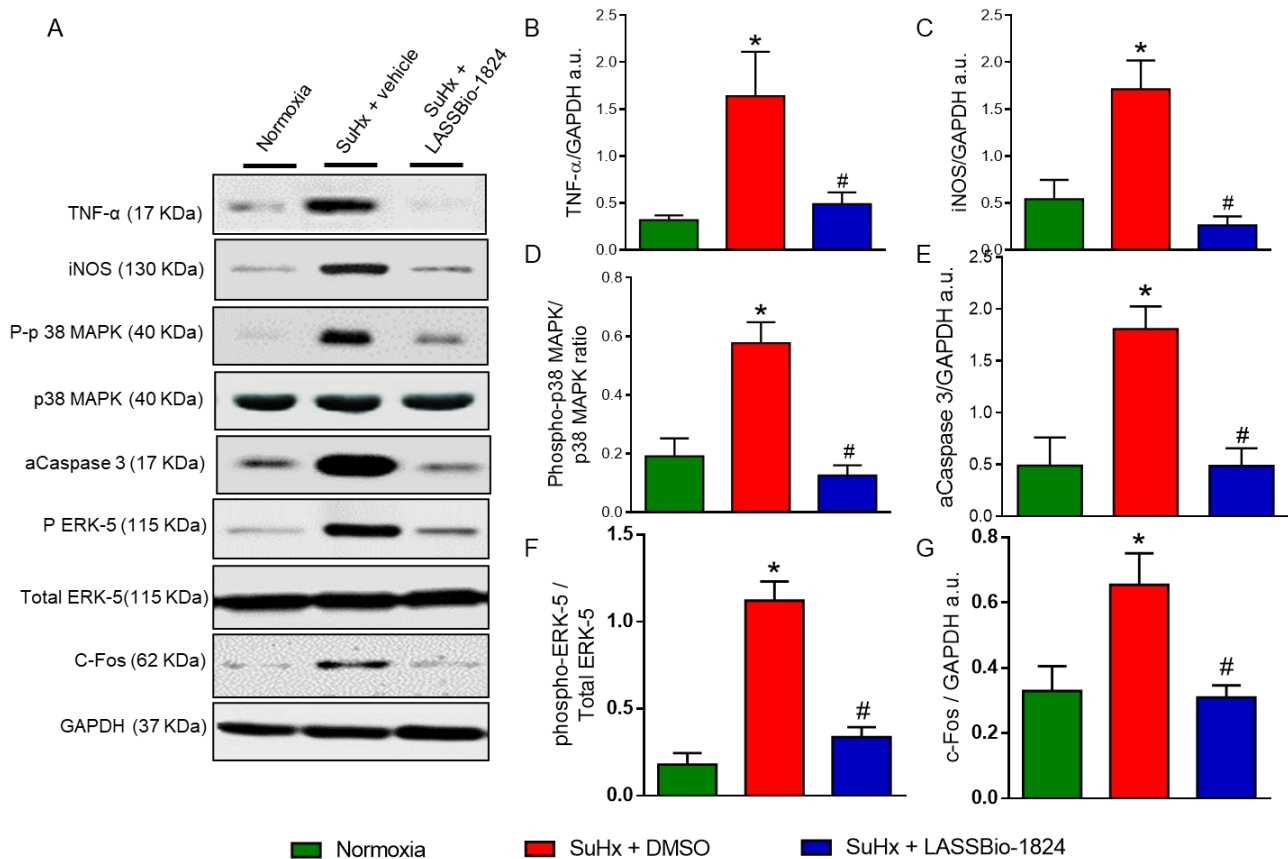


Figure 21: Efeitos do modelo SuHx na expressão de proteína do coração ao longo de 35 dias de protocolo e tratamento oral com veículo ou LASSBio-1824 por 14 dias. A Figura (A) mostra imagens das diferentes membranas do western blot de TNF- α , iNOS, p-p38 MAPK, p-38 MAPK, caspase 3 ativa, p-ERK-5, ERK-5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

4.5 Reversão da fibrose do VD pelo LASSBio-1824

A Figura 22A mostram imagens representativas da deposição de colágeno no miocárdio do VD. O conteúdo de colágeno do VD foi significativamente aumentado no grupo SuHx, comparado aos ratos normoxia (Figura 22C; p <0,05). E a administração de LASSBio-1824 em ratos com HAP reduziu a deposição de colágeno no miocárdio em comparação com ratos com HAP tratados com veículo (Figuras 22C; p <0,05). O tratamento com LASSBio-

1824 também reduziu a expressão de c-Fos, uma proteína celular envolvida com proliferação celular. A Figura 22B representa imagens imunohistoquímicas para a marcação de c-Fos em VD. Os animais SuHx apresentaram uma maior expressão de c-fos quando comparados aos controles de normoxia e SuHx tratados com LASSBio-1824 (Figuras 22D; $p < 0,05$).

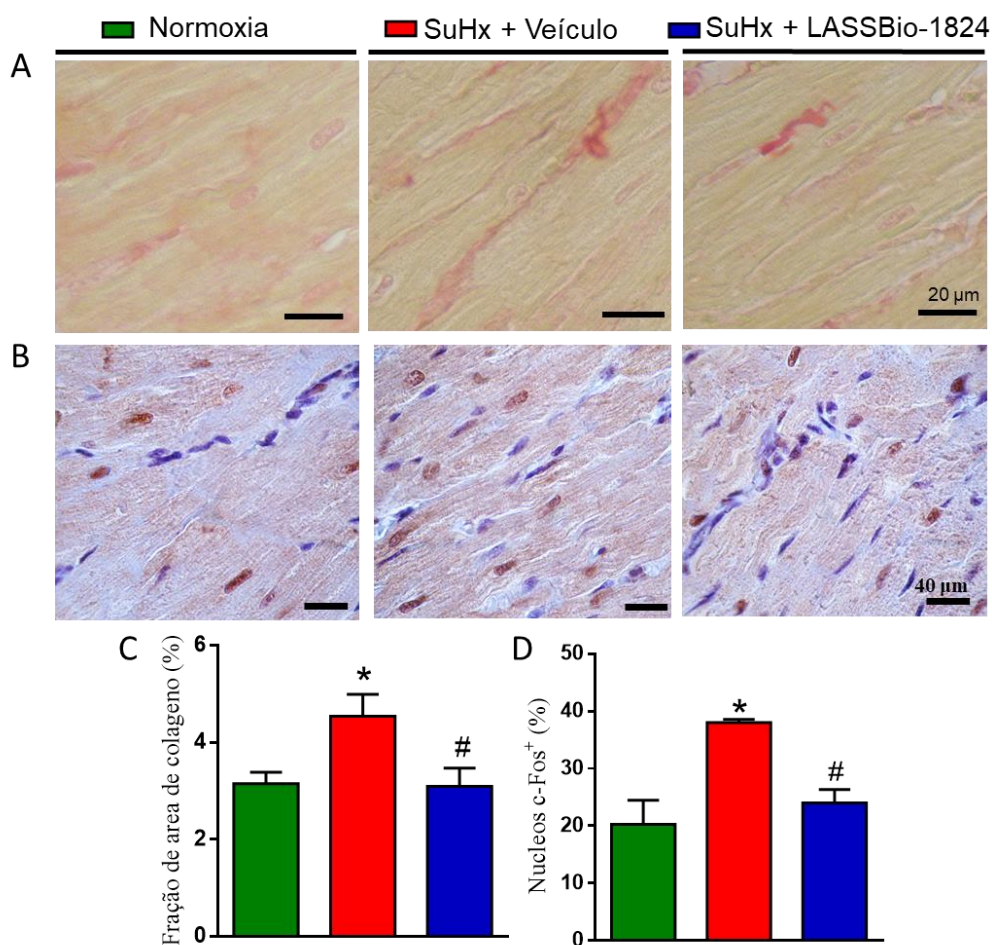


Figure 22: Efeitos da terapia com LASSBio-1824 na fração de colágeno e expressão de c-fos no coração de animais normoxia e SuHx. (A) Coloração com picrosirius red sob microscopia óptica (aumento 100x) mostrando fibras de colágeno em vermelho. (B) Imagens representativas da imunohistoquímica de c-fos no VD de todos os grupos experimentais. (C) Fração de área de colágeno (%). (D) Núcleos marcados para c-fos. Dados representam a média \pm S.E.M. ($n = 5$ ratos por grupo). * $P < 0,05$ em comparação com o grupo normóxia; # $P < 0,05$ em comparação com o grupo SuHx tratado com veículo. *One-way ANOVA* com múltiplas comparações. Teste *post hoc* de Tukey. SuHx, SU5416/hipóxia.

5. DISCUSSÃO

Embora ainda não existam modelos animais de HAP com similaridade em todos os aspectos fisiopatológicos e de severidade da doença em humanos (Stenmark *et al.*, 2009), os diferentes modelos MCT e SuHx dão suporte à ideia de que a HAP é iniciada por vários estímulos e que as mudanças estruturais observadas na vasculatura pulmonar estão relacionadas ao tipo de evento desencadeante (Tuder *et al.*, 2013). O desenvolvimento de HAP está associado com vários graus de muscularização das pequenas arteríolas pulmonares, que podem variar de leve a moderada, e isso está comumente relacionado à hipertrofia e/ou hiperplasia das células musculares lisas. O espessamento da camada adventícia e a infiltração de células inflamatórias nessa região também são comuns. Essas mudanças vasculares em pacientes com HAP são de fato mais leves e menos robustas do que acontece em modelos animais da doença (Hoshikawa *et al.*, 2003).

A investigação dos efeitos terapêuticos de LASSBio-1824 sobre a HAP, iniciou-se utilizando os modelos de induzidos por MCT e SuHx, em dose de 20mg/kg por via de administração intraperitoneal. Nesses grupos experimentais foram analisadas características definidoras da HAP. O aumento do TAP, uma medida indireta da RVP e por consequência da PSVD foi observado nos animais com HAP tratados com veículo em ambos os grupos experimentais (MCT e SuHx), e o tratamento com LASSBio-1824 reverteu essas características. O aumento da RVP está diretamente relacionado as alterações vasculares de hipertrofia e aumento da espessura de parede dos vasos, assim como ao infiltrado celular inflamatório que se dirige para as camadas dos vasos (Schermuly *et al.*, 2011; Humbert *et al.*, 2019). Com a redução do lúmen vascular e consequente aumento da RVP, eleva-se a pós carga do VD, que passa a trabalhar sobre pressão maior para garantir a homeostase sanguínea, por isso o VD desenvolve maior espessura da parede livre e área (Anton Vonk-Noordegraaf *et al.*, 2013). A reversão desta espessura nos modelos apresentados, reforça a efetividade da inibição da p38 α MAPK na fisiopatologia da HAP.

Como o modelo SuHx é reconhecido por causar lesões pulmonares e insuficiência cardíaca que melhor reproduzem o cenário clínico em humanos, a

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

A isoforma p-38 α MAPK apresenta papel importante na fisiopatologia da HP (Church *et al.*, 2015) devido ao fato de sua inibição em dois modelos distintos de HP ter impedido ou revertido as características da doença, principalmente nos pulmões. Também foi previamente descrito maior expressão e atividade de fosfo-p-38 α MAPK nos vasos pulmonares de pacientes com HAP idiopática (Church *et al.*, 2015). A inibição da p38 α MAPK melhorou a função do VD em dois protocolos experimentais de hipertrofia do VD induzida por sobrecarga de pressão (hipóxia crônica e bandagem da artéria pulmonar em camundongos) e foi reforçada a hipótese de que existe maior expressão de fosfo-p-38 α MAPK porque foi detectada aumentada expressão em células de VD de humanos com HAP idiopático (Kojonazarov *et al.*, 2017).

Este trabalho apresenta de forma inédita, os efeitos de um novo inibidor da p-38 α MAPK quando administrados por via oral em ratos com HAP induzida pela combinação de hipóxia crônica e injeções de um antagonista do receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (SU5416). Este modelo simula várias características fisiopatológicas da HAP em humanos, tanto histológicas como hemodinâmicas (Taraseviciene-Stewart *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2010; Toba *et al.*, 2014; Vitali *et al.*, 2014). A administração oral por 14 dias com LASSBio-1824 reduziu várias características da HAP tais como o fluxo nas

APs, remodelamento e hipertrofia da parede dos vasos, disfunção vascular, sobrecarga e disfunção do VD, remodelamento e hipertrofia do miocárdio. Assim, nossos dados trazem para o campo de pesquisa sobre HAP importantes complementos a fim de se reafirmar a hipótese de considerar a inibição da MAPK p-38 α como uma alternativa no tratamento desta doença cardiopulmonar e incentiva investigações clínicas adicionais.

Atualmente, é considerado que a disfunção endotelial na HAP ocorra inicialmente devido a alterações no fenótipo de células endoteliais que liberam excessivamente fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e vasoconstritores (Humbert et al., 2019). Fatores de crescimento e citocinas ativam seus receptores na superfície da membrana celular nos vasos, mediando assim a fosforilação intracelular e subsequente ativação de p38 α MAPK. Assim, desencadeia-se um processo patológico caracterizado por proliferação celular exacerbada, resistência à apoptose e inflamação nas células vasculares pulmonares de indivíduos com HAP (Moreno-Vinasco et al., 2008; Rajkumar et al., 2010; Goncharov et al., 2014; Church et al., 2015). Essas alterações esclarecem o remodelamento vascular na pequena circulação (Huertas et al, 2018), a hipertrofia da parede de APs e o desenvolvimento de disfunção do VD com falência subsequente na HAP.

O remodelamento da parede dos vasos pulmonares, o espessamento e a vasoconstrição desregulada podem ser inicialmente desencadeados pelas células endoteliais pulmonares lesadas na HAP (Humbert et al., 2019). Neste estudo, a espessura da parede do vaso e o conteúdo de colágeno perivascular foram maiores nos APs distais dos animais SuHx do que nas arteríolas do grupo controle normoxia. Assim, assumimos que no modelo de HAP utilizado ocorreu remodelamento vascular pulmonar com subsequente hipertrofia da parede de AP e que essas alterações causaram um aumento na resistência vascular pulmonar e redução do fluxo sanguíneo através da circulação pulmonar, uma vez que as medidas finais das relações TAP/TET correlacionaram-se significativamente com a espessura da parede de APs distais. A inibição da p-38 MAPK, isoforma p-38 α , induzida pela administração de LASSBio-1824 por 2 semanas reduziu de maneira benéfica a deposição de colágeno perivascular pulmonar, remodelamento da parede dos vasos e hipertrofia medial em APs distais.

A reduzida vasodilatação induzida por ACh em APs pode ser resultado de um comprometimento da produção dependente de endotélio de moléculas vasodilatadoras, como o NO (Tuder et al., 2001), o que favorece uma vasoconstrição anormal nos pulmões no modelo de HAP induzido pelo SuHx. Este aspecto também contribui para aumentar a resistência vascular pulmonar e obstruir o fluxo sanguíneo pulmonar, detectado pela correlação significativa entre as relações TAP/TET e o relaxamento máximo induzido por ACh. A administração de LASSBio-1824 melhorou a disfunção vascular indicando que o componente endotelial que regula tônus vascular pulmonar foi recuperado pelo inibidor de MAPK p-38.

A presente pesquisa investigou a expressão de alguns marcadores da HAP nos pulmões de todos os grupos experimentais. A aumentada expressão de TNF- α nas amostras pulmonares dos animais com HAP é condizente com a descrição de que os níveis circulantes de TNF- α estão aumentados em pacientes com HAP (Itoh et al., 2006). O TNF- α é expresso localmente nos vasos pulmonares de pacientes com HAP e sua sinalização promove o remodelamento vascular pulmonar (Hurst et al., 2017) que estimula a sinalização da MAPK p-38 (Ferrero et al., 2001) e, que na condição de HAP, está anormal e contribui para proliferação aberrante de células dos vasos pulmonares, remodelamento vascular, inflamação local e desenvolvimento de hipertrofia da parede de APs (Church et al., 2015). A proliferação de células do músculo liso das APs também participa do processo de iniciar ou manter a hipertrofia dos vasos pulmonares em pacientes com HAP (Zhang et al., 2003). A ativação da p-38 MAPK promove a regulação positiva da iNOS nessas células na HAP que induz a resistência a apoptose, potencializando o espessamento medial vascular pulmonar e a hipertrofia da parede do vaso (Jin et al., 2014). Este fato foi demonstrado neste trabalho com a detecção de aumento da expressão de iNOS nos tecidos pulmonares de ratos com HAP, que poderia contribuir para o remodelamento e hipertrofia vascular pulmonar. A avaliação da expressão de caspase-3 ativa em pulmão foi importante pois esta proteína pode desencadear a apoptose de células endoteliais celular sendo mecanismo inicial a obliteração das APs na HAP devido a uma degeneração da estrutura do endotélio pulmonar (Zhao et al., 2005; White; et al., 2014). Após observar os níveis mais altos de caspase-3 ativa no pulmão de ratos com HAP

houve a confirmação da resistência a apoptose, indicando uma proliferação desregulada dos componentes dos vasos pulmonares.

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

A administração oral de LASSBio-1824 atenuou os efeitos prejudiciais acima mencionados da HAP, em parte, limitando as vias de sinalização de TNF- α , p-38 MAPK, iNOS, caspase-3 ativa, c-Fos e ERK5 nos pulmões de animais com HAP.

A sobrecarga persistente sobre o VD induzida pela HAP promoveu uma adaptação na estrutura dessa câmara, representada pelo aumento dos índices de hipertrofia. Por meio da ecocardiografia foi observado maior espessura da parede livre do VD e área do VD na diástole final induzidas pela HAP, assim como também aumento da relação VD/VE + S em comparação com o grupo controle. A disfunção do VD foi evidenciada pela redução do VSVD e DCVD sem disfunção cardíaca global, evidenciado por hipertrofia concêntrica de VD não suficiente para causar movimento septal interventricular e disfunção do VE. Não houve alteração da área do VE e PSVE, VSVE, frequência cardíaca e DCVE não foram alteradas, comprovando que o VE manteve a função preservada. No entanto, o VD dos animais com HAP se apresentaram em transição para um estado compensatório na função cardíaca global que poderia evoluir para uma dilatação progressiva e irreversível. Provavelmente, uma

expansão do tempo de exposição a hipóxia poderia levar a disfunção cardíaca global. É de grande importância mencionar que o período de 14 dias de tratamento com LASSBio-1824 parece atuar seletivamente as alterações no sistema cardiopulmonar.

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

De fato, não podemos afirmar que LASSBio-1824 seja seletivo para a isoforma alfa de p-38 MAPK, pois não há dados analisando sua ação em outras isoenzimas dessa família de cinases, como as isoformas β , γ e δ . No entanto, LASSBio-1824 apresentou melhor perfil anti-inflamatório e anti-proliferativo do que o inibidor seletivo de p-38 α MAPK (SB203580). Enquanto LASSBio-1824 produziu uma redução acentuada na produção de TNF- α , mesmo comportamento não foi observado com SB203580 (Freitas et al., 2018).

6. CONCLUSÃO

Apesar de ambos os modelos de HAP utilizados não apresentarem lesões plexiformes e insuficiência cardíaca descompensada, LASSBio-1824, através da inibição da p-38 α MAPK, contribuiu para a reparação das alterações no pulmão e VD, reforçando a importância de considerar a p-38 α MAPK como alvo terapêutico para a HAP.

8.0 REFERÊNCIAS

1. Abe, K., Toba, M., Alzoubi, A., Ito, M., Fagan, K. A., Cool, C. D., ... Oka, M. (2010). *Formation of Plexiform Lesions in Experimental Severe Pulmonary Arterial Hypertension*. *Circulation*, 121(25), 2747–2754. doi:10.1161/circulationaha.109.927681
2. Alencar, A. K. N., Pereira, S. L., Montagnoli, T. L., Maia, R. C., Kümmerle, A. E., Landgraf, S. S., ... Zapata-Sudo, G. (2013). *Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. *British Journal of Pharmacology*, 169(5), 953–962. doi:10.1111/bph.12193
3. Alencar, A. K. N., Pereira, S. L., da Silva, F. E., Mendes, L. V. P., Cunha, V. do M. N., Lima, L. M., ... Zapata-Sudo, G. (2014). *N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine A2A activity*. *International Journal of Cardiology*, 173(2), 154–162. doi:10.1016/j.ijcard.2014.02.022
4. Alencar, A. K., Montes, G. C., Montagnoli, T., Silva, A. M., Martinez, S. T., Fraga, A. G., ... Zapata-Sudo, G. (2017). *Activation of GPER ameliorates experimental pulmonary hypertension in male rats*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 208–217. doi:10.1016/j.ejps.2016.11.009
5. Alencar, A. K. N., Pimentel-Coelho, P. M., Montes, G. C., Silva, M. M. C., Mendes, L. V. P., Montagnoli, T. L., ... Zapata-Sudo, G. (2018). *Human Mesenchymal Stem Cell Therapy Reverses Su5416/Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Mice*. *Front. Pharmacol.* 9:1395. doi: 10.3389/fphar.2018.01395.
6. Bordenave, J., Thuillet, R., Tu, L., Phan, C., Cumont, A., Marsol, C., ... Guignabert, C. (2019). *Neutralization of CXCL12 attenuates established pulmonary hypertension in rats*. *Cardiovascular Research*. doi:10.1093/cvr/cvz153
7. Alves, J. L., Gavilanes, F., Jardim, C., Fernandes, C. J. C. dos S., Morinaga, L. T. K., Dias, B., ... Souza, R. (2015). *Pulmonary Arterial Hypertension in the Southern Hemisphere*. *Chest*, 147(2), 495–501. doi:10.1378/chest.14-1036
8. Amabile, N., Guignabert, C., Montani, D., Yeghiazarians, Y., Boulanger, C. M., & Humbert, M. (2012). *Cellular microparticles in the pathogenesis of pulmonary hypertension*. *European Respiratory Journal*, 42(1), 272–279. doi:10.1183/09031936.00087212
9. *Arteries with Special Reference to Congenital Cardiac Septal Defects*. *Circulation*, 18(4), 533–547. doi:10.1161/01.cir.18.4.533

10. Arthur, J. S., C. (2008). *MSK activation and physiological roles*. *Frontiers in Bioscience, Volume(13)*, 5866. doi:10.2741/3122
11. Badesch, D. B., Raskob, G. E., Elliott, C. G., Krichman, A. M., Farber, H. W., Frost, A. E., ... McGoon, M. D. (2010). *Pulmonary Arterial Hypertension*. *Chest*, 137(2), 376–387. doi:10.1378/chest.09-1140
12. Barreiro, E. J. (2002). *Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo*. *Química Nova*, 25(6b), 1172–1180. doi:10.1590/s0100-40422002000700018
13. Barst, R. J., Rubin, L. J., Long, W. A., McGoon, M. D., Rich, S., Badesch, D. B., ... Crow, J. W. (1996). *A Comparison of Continuous Intravenous Epoprostenol (Prostacyclin) with Conventional Therapy for Primary Pulmonary Hypertension*. *New England Journal of Medicine*, 334(5), 296–301. doi:10.1056/nejm199602013340504
14. Barnes, H., Fothergill, T., Burns, A., Humbert, M., & Williams, T. (2017). Prostacyclin for pulmonary hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd012785
15. Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H. F., & Marshall, C. J. (1998). *Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2*. *Current Biology*, 8(19), 1049–1057. doi:10.1016/s0960-9822(98)70442-7
16. Bogoyevitch, M. A., & Court, N. W. (2004). *Counting on mitogen-activated protein kinases—ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8*. *Cellular Signalling*, 16(12), 1345–1354. doi:10.1016/j.cellsig.2004.05.004
17. Bossone, E., Paciocco, G., Iarussi, D., Agretto, A., Iacono, A., Gillespie, B. W., & Rubenfire, M. (2002). *The Prognostic Role of the ECG in Primary Pulmonary Hypertension*. *Chest*, 121(2), 513–518. doi:10.1378/chest.121.2.513*
18. Boucherat, O., Vitry, G., Trinh, I., Paulin, R., Provencher, S., & Bonnet, S. (2017). *The cancer theory of pulmonary arterial hypertension*. *Pulmonary Circulation*, 7(2), 285–299. doi:10.1177/2045893217701438
19. Bogaard, H. J., Natarajan, R., Henderson, S. C., Long, C. S., Kraskauskas, D., Smithson, L., ... Voelkel, N. F. (2009). *Chronic Pulmonary Artery Pressure Elevation Is Insufficient to Explain Right Heart Failure*. *Circulation*, 120(20), 1951–1960. doi:10.1161/circulationaha.109.883843
20. Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., & Hirth, P. (2012). *Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(11), 873–886. doi:10.1038/nrd3847

21. Burke, D. L., Frid, M. G., Kunrath, C. L., Karoor, V., Anwar, A., Wagner, B. D., ... Stenmark, K. R. (2009). *Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(2), L238–L250. doi:10.1152/ajplung.90591.2008
22. Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (2008). *Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(1), 14–30. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.09.006
23. CHAZOVA, I. et al. Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. **Am J Pathol**, v. 146, n. 2, p. 389-97, Feb 1995.
24. Ciuculan, L., Bonneau, O., Hussey, M., Duggan, N., Holmes, A. M., Good, R., ... Thomas, M. (2011). *A Novel Murine Model of Severe Pulmonary Arterial Hypertension. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(10), 1171–1182. doi:10.1164/rccm.201103-0412oc
25. Chung, L., Liu, J., Parsons, L., Hassoun, P. M., McGoon, M., Badesch, D. B., ... Zamanian, R. T. (2010). *Characterization of Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial Hypertension From REVEAL. Chest*, 138(6), 1383–1394. doi:10.1378/chest.10-0260
26. Carvalho, S., Kaiser, M., Brun, R., Silva, E., & Fraga, C. (2014). *Antiprotozoal Activity of (E)-Cinnamic N-Acylhydrazones Derivatives. Molecules*, 19(12), 20374–20381. doi:10.3390/molecules191220374
27. Campo, A., Mathai, S. C., Le Pavec, J., Zaiman, A. L., Hummers, L. K., Boyce, D., ... Hassoun, P. M. (2010). *Hemodynamic Predictors of Survival in Scleroderma-related Pulmonary Arterial Hypertension. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(2), 252–260. doi:10.1164/rccm.200912-1820oc
28. Cool, C. D., Stewart, J. S., Werahera, P., Miller, G. J., Williams, R. L., Voelkel, N. F., & Tuder, R. M. (1999). *Three-Dimensional Reconstruction of Pulmonary Arteries in Plexiform Pulmonary Hypertension Using Cell-Specific Markers. The American Journal of Pathology*, 155(2), 411–419. doi:10.1016/s0002-9440(10)65137-1
29. Coleman, R. A., Grix, S. P., Head, S. A., Louttit, J. B., Mallett, A., & Sheldrick, R. L. G. (1994). *A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. Prostaglandins*, 47(2), 151–168. doi:10.1016/0090-6980(94)90084-1
30. Corre, I., Paris, F., & Huot, J. (2017). The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget*, 8(33). doi:10.18632/oncotarget.1826

31. Chin, K. M., Kim, N. H. S., & Rubin, L. J. (2005). *The right ventricle in pulmonary hypertension. Coronary Artery Disease, 16(1), 13–18.* doi:10.1097/00019501-200502000-00003
32. Channick, R. N., Simonneau, G., Sitbon, O., Robbins, I. M., Frost, A., Tapson, V. F., ... Rubin, L. J. (2001). *Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebocontrolled study. The Lancet, 358(9288), 1119–1123.* doi:10.1016/s0140-6736(01)06250-x
33. Channick, R. N., Simonneau, G., Sitbon, O., Robbins, I. M., Frost, A., Tapson, V. F., ... Rubin, L. J. (2001). *Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebocontrolled study. The Lancet, 358(9288), 1119–1123.* doi:10.1016/s0140-6736(01)06250-x
34. Church, A. C., Martin, D. H., Wadsworth, R., Bryson, G., Fisher, A. J., Welsh, D. J., & Peacock, A. J. (2015). *The reversal of pulmonary vascular remodeling through inhibition of p38 MAPK-alpha: a potential novel anti-inflammatory strategy in pulmonary hypertension. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 309(4), L333–L347.* doi:10.1152/ajplung.00038.2015
35. Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (2008). *Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 44(1), 14–30.* doi:10.1016/j.yjmcc.2007.09.006
36. Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). *p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1773(8), 1358–1375.* doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010
37. Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. Biochemical Journal, 429(3), 403–417.* doi:10.1042/bj20100323
38. Craxton, A, Geraldine Shu, G, Graves, J, Saklatvala, J, Krebs E. G. and Edward A. Clark, E. A. *p38 MAPK Is Required for CD40-Induced Gene Expression and Proliferation in B Lymphocytes. J Immunol October 1, 1998, 161 (7) 3225-3236;*
39. Duarte, C., Barreiro, E., & Fraga, C. (2007). *Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 7(11), 1108–1119.* doi:10.2174/138955707782331722
40. Dasgupta, A., Bowman, L., D'Arsigny, C., & Archer, S. (2014). *Soluble Guanylate Cyclase: A New Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.*

41. Egito, E. S. E. T., Aiello, V. D., Bosisio, I. B. J., Lichtenfels, A. J., Horta, A. L. M., Saldiva, P. H. N., & Capelozzi, V. L. (2003). *Vascular Remodeling Process in Reversibility of Pulmonary Arterial Hypertension Secondary to Congenital Heart Disease. Pathology - Research and Practice*, 199(8), 521–532. doi:10.1078/0344-0338-00457
42. Eddahibi, S., Guignabert, C., Barlier-Mur, A. M., Dewachter, L., Fadel, E., Dartevielle, P., ... Adnot, S. (2006). *Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension: Critical Role for Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia. Circulation*, 113(15), 1857–1864. doi:10.1161/circulationaha.105.591321
43. Enslin, H. (2000). *Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. The EMBO Journal*, 19(6), 1301–1311. doi:10.1093/emboj/19.6.1301
44. Frost, A., Badesch, D., Gibbs, J. S. R., Gopalan, D., Khanna, D., Manes, A., ... Torbicki, A. (2018). *Diagnosis of pulmonary hypertension. European Respiratory Journal*, 1801904. doi:10.1183/13993003.01904-2018
45. Frost, A. E., Badesch, D. B., Barst, R. J., Benza, R. L., Elliott, C. G., Farber, H. W., ... McGoon, M. D. (2011). *The Changing Picture of Patients With Pulmonary Arterial Hypertension in the United States. Chest*, 139(1), 128–137. doi:10.1378/chest.10-0075Pugh, M. E. et al 2014
46. Freitas, R. H. C. N., Cordeiro, N. M., Carvalho, P. R., Alves, M. A., Guedes, I. A., Valerio, T. S., ... Fraga, C. A. M. (2017). *Discovery of naphthyl-N -acylhydrazone p38 α MAPK inhibitors with in vivo anti-inflammatory and anti-TNF- α activity. Chemical Biology & Drug Design*, 91(2), 391–397. doi:10.1111/cbdd.13085
47. Finn, R. S., Martin, M., Rugo, H. S., Jones, S., Im, S.-A., Gelmon, K., ... Slamon, D. J. (2016). *Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. New England Journal of Medicine*, 375(20), 1925–1936. doi:10.1056/nejmoa1607303
48. Ferrero, E., Zocchi, M. R., Magni, E., Panzeri, M. C., Curnis, F., Rugarli, C., ... Corti, A. (2001). *Roles of tumor necrosis factor p55 and p75 receptors in TNF- α -induced vascular permeability. American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 281(4), C1173–C1179. doi:10.1152/ajpcell.2001.281.4.c1173
49. Galiè, N., McLaughlin, V. V., Rubin, L. J., & Simonneau, G. (2018). *An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension.*

European Respiratory Journal, 1802148. doi:10.1183/13993003.02148-2018

50. Guan, Z., Buckman, S. Y., Pentland, A. P., Templeton, D. J., & Morrison, A. R. (1998). *Induction of Cyclooxygenase-2 by the Activated MEKK1 → SEK1/MKK4 → p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 12901–12908. doi:10.1074/jbc.273.21.12901
51. Goettert, M., Graeser, R., & Laufer, S. A. (2010). *Optimization of a nonradioactive immunosorbent assay for p38α mitogen-activated protein kinase activity*. *Analytical Biochemistry*, 406(2), 233–234. doi:10.1016/j.ab.2010.07.007
52. Gomez-Arroyo, J., Saleem, S. J., Mizuno, S., Syed, A. A., Bogaard, H. J., Abbate, A., ... Voelkel, N. F. (2012). *A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(10), L977–L991. doi:10.1152/ajplung.00362.2011
53. Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J.-L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., ... Hoeper, M. (2016). *2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension*. *European Heart Journal*, 37(1), 67–119. doi:10.1093/eurheartj/ehv317
54. Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J.-L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., ... Hoeper, M. (2015). *2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension*. *European Respiratory Journal*, 46(4), 903–975. doi:10.1183/13993003.01032-2015
55. Guignabert, C., & Dorfmueller, P. (2013). *Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension*. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34(05), 551–559. doi:10.1055/s-0033-1356496
56. Guignabert, C., Tu, L., Girerd, B., Ricard, N., Huertas, A., Montani, D., & Humbert, M. (2015). *New Molecular Targets of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension*. *Chest*, 147(2), 529–537. doi:10.1378/chest.14-0862
57. Gomberg-Maitland, M., & Olschewski, H. (2008). *Prostacyclin therapies for the treatment of pulmonary arterial hypertension*. *European Respiratory Journal*, 31(4), 891–901. doi:10.1183/09031936.00097107
58. Galiè, N., Corris, P. A., Frost, A., Girgis, R. E., Granton, J., Jing, Z. C., ... Keogh, A. (2013). *Updated Treatment Algorithm of Pulmonary Arterial Hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25), D60–D72. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.031
59. Goncharov, D. A., Kudryashova, T. V., Ziai, H., Ihida-Stansbury, K., DeLisser, H., Krymskaya, V. P., ... Goncharova, E. A.

- (2013). *Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 (mTORC2) Coordinates Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Metabolism, Proliferation, and Survival in Pulmonary Arterial Hypertension*. *Circulation*, 129(8), 864–874. doi:10.1161/circulationaha.113.004581
60. Hyduk A et, CDC's National Center for Health Statistics, 2005) <https://books.google.com.br/books?hl=pt-R&lr=&id=k3CEzhaYFEUC&oi=fnd&pg=RA4-PA1&dq=Hyduk+A+et,+CDC%27s+National+Center+for+Health+Statistics,+2005&ots=y3f9ybviG7&sig=eHtedn7yRD5i29oBzQI2ngZqMgA#v=onepage&q&f=false>. Acessado em 27/09/2020
61. Humbert, M., Guignabert, C., Bonnet, S., Dorfmüller, P., Klinger, J. R., Nicolls, M. R., ... Rabinovitch, M. (2018). *Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives*. *European Respiratory Journal*, 1801887. doi:10.1183/13993003.01887-2018
62. Humbert, M., Morrell, N. W., Archer, S. L., Stenmark, K. R., MacLean, M. R., Lang, I. M., ... Rabinovitch, M. (2004). *Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(12), S13–S24. doi:10.1016/j.jacc.2004.02.029
63. Humbert, M., Lau, E. M. T., Montani, D., Jais, X., Sitbon, O., & Simonneau, G. (2014). *Advances in Therapeutic Interventions for Patients With Pulmonary Arterial Hypertension*. *Circulation*, 130(24), 2189–2208. doi:10.1161/circulationaha.114.006974
64. HEATH, D., & EDWARDS, J. E. (1958). *The Pathology of Hypertensive Pulmonary Vascular Disease: A Description of Six Grades of Structural Changes in the Pulmonary* Yamaki, S., Kumate, M., Yonesaka, S., Maeda, K., Endo, M., & Tabayashi, K. (2004). *Lung Biopsy Diagnosis of Operative Indication in Secundum Atrial Septal Defect With Severe Pulmonary Vascular Disease*. *Chest*, 126(4), 1042–1047. doi:10.1378/chest.126.4.1042
65. Hoffman, J. I., Rudolph, A. M., & Heymann, M. A. (1981). *Pulmonary vascular disease with congenital heart lesions: pathologic features and causes*. *Circulation*, 64(5), 873–877. doi:10.1161/01.cir.64.5.873
66. Hanahan, D. (1997). *Signaling Vascular Morphogenesis and Maintenance*. *Science*, 277(5322), 48–50. doi:10.1126/science.277.5322.48
67. Helderman, F., Mauritz, G.-J., Andringa, K. E., Vonk-Noordegraaf, A., & Marcus, J. T. (2011). *Early onset of retrograde flow in the main pulmonary artery is a characteristic of pulmonary arterial hypertension*. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 33(6), 1362–1368. doi:10.1002/jmri.22581

68. Hemnes, A. R., & Champion, H. C. (2008). *Right heart function and haemodynamics in pulmonary hypertension. International Journal of Clinical Practice*, 62, 11–19. doi:10.1111/j.1742-1241.2008.01812.x
69. Humbert, M. (2009). *Update in Pulmonary Hypertension 2008. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(8), 650–656. doi:10.1164/rccm.200901-0136up
70. Humbert, M., Morrell, N. W., Archer, S. L., Stenmark, K. R., MacLean, M. R., Lang, I. M., ... Rabinovitch, M. (2004). *Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. Journal of the American College of Cardiology*, 43(12), S13–S24. doi:10.1016/j.jacc.2004.02.029
71. Hanks, S., Quinn, A., & Hunter, T. (1988). *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science*, 241(4861), 42–52. doi:10.1126/science.3291115
72. Hanks, S. K., & Hunter, T. (1995). *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. The FASEB Journal*, 9(8), 576–596. doi:10.1096/fasebj.9.8.7768349
73. Hollenbach, E., Neumann, M., Vieth, M., Roessner, A., Malfertheiner, P., & Naumann, M. (2004). *Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF- κ B-signaling suppresses inflammatory bowel disease. The FASEB Journal*, 18(13), 1550–1552. doi:10.1096/fj.04-1642fje
74. Hoshikawa, Y., Nana-Sinkam, P., Moore, M. D., Sotto-Santiago, S., Phang, T., Keith, R. L., ... Geraci, M. W. (2003). *Hypoxia induces different genes in the lungs of rats compared with mice. Physiological Genomics*, 12(3), 209–219. doi:10.1152/physiolgenomics.00081.2001
75. Huertas, A., Guignabert, C., Barberà, J. A., Bärtsch, P., Bhattacharya, J., Bhattacharya, S., ... Wilkins, M. R. (2018). *Pulmonary vascular endothelium: the orchestra conductor in respiratory diseases. European Respiratory Journal*, 51(4), 1700745. doi:10.1183/13993003.00745-2017
76. Hurst, L. A., Dunmore, B. J., Long, L., Crosby, A., Al-Lamki, R., Deighton, J., ... Morrell, N. W. (2017). *TNF α drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling. Nature Communications*, 8, 14079. doi:10.1038/ncomms14079
77. Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V., ... Simonneau, G. (2006). *Pulmonary Arterial Hypertension in France. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(9), 1023–1030. doi:10.1164/rccm.200510-1668oc
78. ITOH, T., NAGAYA, N., ISHIBASHI-UEDA, H., KYOTANI, S., OYA, H., SAKAMAKI, F., ... NAKANISHI, N. (2006). *Increased plasma monocyte*

- chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Respirology, 11(2), 158–163. doi:10.1111/j.1440-1843.2006.00821.x*
79. I.A. Guedes, R.H.C.N. Freitas, N.M. Cordeiro, T.S. do Nascimento, T.S. Valerio, P.D. Fernandes, L.E. Dardenne, C.A.M. Fraga, *ChemMedChem* **2016**, *11*, 234
80. Iglarz, M., Binkert, C., Morrison, K., Fischli, W., Gatfield, J., Treiber, A., ... Clozel, M. (2008). *Pharmacology of Macitentan, an Orally Active Tissue-Targeting Dual Endothelin Receptor Antagonist. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 327(3), 736–745. doi:10.1124/jpet.108.142976* Pulido, T. et al., 2013
81. Jin, C., Guo, J., Qiu, X., Ma, K., Xiang, M., Zhu, X., & Guo, J. (2014). *IGF-1 induces iNOS expression via the p38 MAPK signal pathway in the anti-apoptotic process in pulmonary artery smooth muscle cells during PAH. Journal of Receptors and Signal Transduction, 34(4), 325–331. doi:10.3109/10799893.2014.903417*
82. Jones, J. E., Mendes, L., Rudd, M. A., Russo, G., Loscalzo, J., & Zhang, Y.-Y. (2002). *Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 283(1), H364–H371. doi:10.1152/ajpheart.00979.2001*
83. Jasmin, J.-F., Lucas, M., Cernacek, P., & Dupuis, J. (2001). *Effectiveness of a Nonselective ETA/B and a Selective ETA Antagonist in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. Circulation, 103(2), 314–318. doi:10.1161/01.cir.103.2.314*
84. Kitterman, N., Poms, A., Miller, D. P., Lombardi, S., Farber, H. W., & Barst, R. J. (2012). *Bloodstream Infections in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension Treated With Intravenous Prostanoids: Insights From the REVEAL REGISTRY®. Mayo Clinic Proceedings, 87(9), 825–834. doi:10.1016/j.mayocp.2012.05.014*
85. Kaufmann, P., Okubo, K., Bruderer, S., Mant, T., Yamada, T., Dingemans, J., & Mukai, H. (2015). *Pharmacokinetics and Tolerability of the Novel Oral Prostacyclin IP Receptor Agonist Selexipag. American Journal of Cardiovascular Drugs, 15(3), 195–203. doi:10.1007/s40256-015-0117-4*
86. Kuwano, K., Hashino, A., Noda, K., Kosugi, K., & Kuwabara, K. (2008). *A Long-Acting and Highly Selective Prostacyclin Receptor Agonist Prodrug, 2-*N*-(methylsulfonyl)acetamide (NS-304), Ameliorates Rat Pulmonary Hypertension with Unique Relaxant Responses of Its Active Form, acetic Acid (MRE-269), on Rat Pulmonary Artery. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 326(3), 691–699. doi:10.1124/jpet.108.138305*

87. Kummer, J. L., Rao, P. K., & Heidenreich, K. A. (1997). *Apoptosis Induced by Withdrawal of Trophic Factors Is Mediated by p38 Mitogen-activated Protein Kinase*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20490–20494. doi:10.1074/jbc.272.33.20490
88. Kay, J. M., Harris, P., & Heath, D. (1967). *Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of Crotalaria spectabilis seeds*. *Thorax*, 22(2), 176–179. doi:10.1136/thx.22.2.176
89. Kojonazarov, B., Novoyatleva, T., Boehm, M., Happe, C., Sibinska, Z., Tian, X., ... Schermuly, R. T. (2017). *p38 MAPK Inhibition Improves Heart Function in Pressure-Loaded Right Ventricular Hypertrophy*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 57(5), 603–614. doi:10.1165/rcmb.2016-0374oc
90. Ling, Y., Johnson, M. K., Kiely, D. G., Condliffe, R., Elliot, C. A., Gibbs, J. S. R., ... Peacock, A. J. (2012). *Changing Demographics, Epidemiology, and Survival of Incident Pulmonary Arterial Hypertension*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(8), 790–796. doi:10.1164/rccm.201203-0383oc
91. Lima, P. C., Lima, L. M., da Silva, K. C. M., Léda, P. H. O., de Miranda, A. L. P., Fraga, C. A. M., & Barreiro, E. J. (2000). *Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural saffron*##This paper represents contribution # 36 of the LASSBio, UFRJ (Br.) (LASSBio, <http://acd.ufrj.br/~pharma/lassbio>); For contribution # 35, see [24]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35(2), 187–203. doi:10.1016/s0223-5234(00)00120-3
92. Lima, L., & Barreiro, E. (2005). *Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design*. *Current Medicinal Chemistry*, 12(1), 23–49. doi:10.2174/0929867053363540
93. Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). *Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases*. *Cell*, 141(7), 1117–1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
94. Larissa J.R.P. Raymundo; Carolina C. Guilhon; Daniela S. Alviano; Maria Eline Matheus; Angelo R. Antonioli; Sócrates C.H. Cavalcanti; Péricles B. Alves; Celuta S. Alviano; Patrícia D. Fernandes (2011). *Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the Hyptis pectinata (L.) Poit essential oil*. , 134(3), 0–732. doi:10.1016/j.jep.2011.01.027
95. Lau, E. M. T., Giannoulatou, E., Celermajer, D. S., & Humbert, M. (2017). *Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension*. *Nature Reviews Cardiology*, 14(10), 603–614. doi:10.1038/nrcardio.2017.84

96. MEYRICK, B. The pathology of pulmonary artery hypertension. **Clin Chest Med**, v. 22, n. 3, p. 393-404, vii, Sep 2001.
97. McCann, G. P., Gan, C. T., Beek, A. M., Niessen, H. W. M., Noordegraaf, A. V., & van Rossum, A. C. (2007). *Extent of MRI Delayed Enhancement of Myocardial Mass Is Related to Right Ventricular Dysfunction in Pulmonary Artery Hypertension*. *American Journal of Roentgenology*, 188(2), 349–355. doi:10.2214/ajr.05.1259
98. Morales-Blanhir, J., Santos, S., de Jover, L., Sala, E., Paré, C., Roca, J., ... Barberà, J. A. (2004). *Clinical value of vasodilator test with inhaled nitric oxide for predicting long-term response to oral vasodilators in pulmonary hypertension*. *Respiratory Medicine*, 98(3), 225–234. doi:10.1016/j.rmed.2003.09.019
99. McLaughlin, V. V. (2005). *Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension*. *European Respiratory Journal*, 25(2), 244–249. doi:10.1183/09031936.05.00054804
100. McLaughlin, V. V. (2005). Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 25(2), 244–249. doi:10.1183/09031936.05.00054804
101. Meyrick B., Reid L. M. Crotalaria-Induced Pulmonary Hypertension Uptake of 3H-Thymidine by the Cells of the Pulmonary Circulation and Alveolar Walls. *AJP* January 1982/84-96
102. Moreno-Vinasco, L., Gomberg-Maitland, M., Maitland, M. L., Desai, A. A., Singleton, P. A., Sammani, S., ... Garcia, J. G. N. (2008). *Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension*. *Physiological Genomics*, 33(2), 278–291. doi:10.1152/physiolgenomics.00169.2007
103. McGoon, M. D., Benza, R. L., Escribano-Subias, P., Jiang, X., Miller, D. P., Peacock, A. J., et al. (2013). Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62(25 Suppl), D51–D59. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.023
104. Nebreda, A. R., & Porras, A. (2000). *p38 MAP kinases: beyond the stress response*. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(6), 257–260. doi:10.1016/s0968-0004(00)01595-4
105. Nagendran, J., & Michelakis, E. D. (2009). *Mitochondrial NOS is upregulated in the hypoxic heart: implications for the function of the hypertrophied right ventricle*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 296(6), H1723–H1726. doi:10.1152/ajpheart.00380.2009

106. Noble, M. E. M. (2004). *Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure*. *Science*, 303(5665), 1800–1805. doi:10.1126/science.1095920
107. Newman, J. H., Wheeler, L., Lane, K. B., Loyd, E., Gaddipati, R., Phillips, J. A., & Loyd, J. E. (2001). *Mutation in the Gene for Bone Morphogenetic Protein Receptor II as a Cause of Primary Pulmonary Hypertension in a Large Kindred*. *New England Journal of Medicine*, 345(5), 319–324. doi:10.1056/nejm200108023450502 Badesch, D. B. et al 2010
108. Oliveira, R. G. de, Guerra, F. S., Mermelstein, C. dos S., Fernandes, P. D., Bastos, I. T. de S., Costa, F. N., ... Fraga, C. A. M. (2018). *Synthesis and pharmacological evaluation of novel isoquinoline N-sulphonylhydrazones designed as ROCK inhibitors*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 1181–1193. doi:10.1080/14756366.2018.1490732
109. Pugh, M. E., Sivarajan, L., Wang, L., Robbins, I. M., Newman, J. H., & Hemnes, A. R. (2014). *Causes of Pulmonary Hypertension in the Elderly*. *Chest*, 146(1), 159–166. doi:10.1378/chest.13-1900
110. Pugliese, S. C., Poth, J. M., Fini, M. A., Olschewski, A., El Kasmi, K. C., & Stenmark, K. R. (2015). The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308(3), L229–L252. doi:10.1152/ajplung.00238.2014
111. Palevsky, H. I. (1990). *Chronic Cor Pulmonale*. *JAMA*, 263(17), 2347. doi:10.1001/jama.1990.03440170069039
112. Packer, M., Medina, N., & Yushak, M. (1984). *Adverse hemodynamic and clinical effects of calcium channel blockade in pulmonary hypertension secondary to obliterative pulmonary vascular disease*. *Journal of the American College of Cardiology*, 4(5), 890–901. doi:10.1016/s0735-1097(84)80048-0
113. Pulido, T., Adzerikho, I., Channick, R. N., Delcroix, M., Galiè, N., Ghofrani, H.-A., ... Simonneau, G. (2013). *Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension*. *New England Journal of Medicine*, 369(9), 809–818. doi:10.1056/nejmoa1213917
114. Rubin, L. J., Badesch, D. B., Fleming, T. R., Galiè, N., Simonneau, G., Ghofrani, H. A., ... Barst, R. J. (2011). *Long-term Treatment With Sildenafil Citrate in Pulmonary Arterial Hypertension*. *Chest*, 140(5), 1274–1283. doi:10.1378/chest.10-0969
115. Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). *Pro-inflammatory Cytokines and*

- Environmental Stress Cause p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation by Dual Phosphorylation on Tyrosine and Threonine. Journal of Biological Chemistry, 270(13), 7420–7426. doi:10.1074/jbc.270.13.7420*
116. Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). *ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68(2), 320–344. doi:10.1128/mnbr.68.2.320-344.2004*
 117. Rutkowski, P., Lugowska, I., Kosela-Paterczyk, H., & Kozak, K. (2015). *Trametinib: a MEK inhibitor for management of metastatic melanoma. OncoTargets and Therapy, 2251. doi:10.2147/ott.s72951*
 118. Roth, R. A., Dotzlauf, L. A., Baranyi, B., Kuo, C.-H., & Hook, J. B. (1981). *Effect of monocrotaline ingestion on liver, kidney, and lung of rats. Toxicology and Applied Pharmacology, 60(2), 193–203. doi:10.1016/0041-008x(91)90223-2*
 119. Rajkumar, R., Konishi, K., Richards, T. J., Ishizawar, D. C., Wiechert, A. C., Kaminski, N., & Ahmad, F. (2010). *Genomewide RNA expression profiling in lung identifies distinct signatures in idiopathic pulmonary arterial hypertension and secondary pulmonary hypertension. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 298(4), H1235–H1248. doi:10.1152/ajpheart.00254.2009*
 120. Rich, S., Kaufmann, E., & Levy, P. S. (1992). *The Effect of High Doses of Calcium-Channel Blockers on Survival in Primary Pulmonary Hypertension. New England Journal of Medicine, 327(2), 76–81. doi:10.1056/nejm199207093270203*
 121. Rubin, L. J., Badesch, D. B., Barst, R. J., Galiè, N., Black, C. M., Keogh, A., ... Simonneau, G. (2002). *Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. New England Journal of Medicine, 346(12), 896–903. doi:10.1056/nejmoa012212*
 122. Rabinovitch, M. (2007). *Pathobiology of Pulmonary Hypertension. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2(1), 369–399. doi:10.1146/annurev.pathol.2.010506.09*
 123. Rubin, L. J., Badesch, D. B., Barst, R. J., Galiè, N., Black, C. M., Keogh, A., ... Simonneau, G. (2002). *Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. New England Journal of Medicine, 346(12), 896–903. doi:10.1056/nejmoa012212*
 124. Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J., & McMurtry, I. F. (2009). *Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. American Journal of*

Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 297(6), L1013–L1032. doi:10.1152/ajplung.00217.2009

125. Sakao, S., Tatsumi, K., & Voelkel, N. F. (2009). *Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation*. *Respiratory Research*, 10(1). doi:10.1186/1465-9921-10-95
126. Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., & Grimminger, F. (2011). *Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension*. *Nature Reviews Cardiology*, 8(8), 443–455. doi:10.1038/nrcardio.2011.87
127. Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., ... Souza, R. (2018). *Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension*. *European Respiratory Journal*, 1801913. doi:10.1183/13993003.01913-2018
128. Sisbarro, L., Ihida-Stansbury, K., Stevens, T., Bauer, N., McMurtry, I., & Jones, P. L. (2005). *The Extracellular Matrix Microenvironment Specifies Pulmonary Endothelial Cell Identity*. *Chest*, 128(6), 564S. doi:10.1378/chest.128.6_suppl.564s
129. Sitbon, O., Delcroix, M., Bergot, E., Boonstra, A. B., Gr Anton Vonk-Noordegraaf, J., Langleben, D., ... Simonneau, G. (2014). *EPITOME-2: An open-label study assessing the transition to a new formulation of intravenous epoprostenol in patients with pulmonary arterial hypertension*. *American Heart Journal*, 167(2), 210–217
130. Sitbon, O., Badesch, D. B., Channick, R. N., Frost, A., Robbins, I. M., Simonneau, G., ... Rubin, L. J. (2003). *Effects of the Dual Endothelin Receptor Antagonist Bosentan in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension*. *Chest*, 124(1), 247–254. doi:10.1378/chest.124.1.247
131. Sitbon, O., Channick, R., Chin, K. M., Frey, A., Gaine, S., Galiè, N., ... McLaughlin, V. V. (2015). *Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension*. *New England Journal of Medicine*, 373(26), 2522–2533. doi:10.1056/nejmoa1503184
132. Seger, R., & Krebs, E. G. (1995). *The MAPK signaling cascade*. *The FASEB Journal*, 9(9), 726–735. doi:10.1096/fasebj.9.9.7601337
133. Son, Y., Kim, S., Chung, H.-T., & Pae, H.-O. (2013). *Reactive Oxygen Species in the Activation of MAP Kinases*. *Methods in Enzymology*, 27–48. doi:10.1016/b978-0-12-405881-1.00002-1
134. Soloaga, A. (2003). *MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14*. *The EMBO Journal*, 22(11), 2788–2797. doi:10.1093/emboj/cdg273

135. Shi, Y., & Gaestel, M. (2002). *In the Cellular Garden of Forking Paths: How p38 MAPKs Signal for Downstream Assistance*. *Biological Chemistry*, 383(10). doi:10.1515/bc.2002.173
136. St. Croix, C. M., & Steinhorn, R. H. (2016). *New Thoughts about the Origin of Plexiform Lesions*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193(5), 484–485. doi:10.1164/rccm.201510-1959ed
137. Tuder, R. M., Marecki, J. C., Richter, A., Fijalkowska, I., & Flores, S. (2007). *Pathology of Pulmonary Hypertension*. *Clinics in Chest Medicine*, 28(1), 23–42. doi:10.1016/j.ccm.2006.11.010
138. Taraseviciene-stewart, L., Kasahara, Y., Alger, L., Hirth, P., MC Mahon, G., Waltenberger, J., ... Tuder, R. M. (2001). *Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension*. *The FASEB Journal*, 15(2), 427–438. doi:10.1096/fj.00-0343com
139. Tanos, T., Marinissen, M. J., Leskow, F. C., Hochbaum, D., Martinetto, H., Gutkind, J. S., & Coso, O. A. (2005). *Phosphorylation of c-Fos by Members of the p38 MAPK Family*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18842–18852. doi:10.1074/jbc.m500620200
140. Turner, N. C., Ro, J., André, F., Loi, S., Verma, S., Iwata, H., ... Cristofanilli, M. (2015). *Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 373(3), 209–219. doi:10.1056/nejmoa1505270
141. Tuder, R. M., Archer, S. L., Dorfmueller, P., Erzurum, S. C., Guignabert, C., Michelakis, E., ... Morrell, N. W. (2013). *Relevant Issues in the Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25), D4–D12. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.025
142. Toba, M., Alzoubi, A., O'Neill, K. D., Gairhe, S., Matsumoto, Y., Oshima, K., ... McMurtry, I. F. (2014). *Temporal hemodynamic and histological progression in Sugén5416/hypoxia/normoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 306(2), H243–H250. doi:10.1152/ajpheart.00728.2013
143. Tuder, R. M., Cool, C. D., Yeager, M., Taraseviciene-Stewart, L., Bull, T. M., & Voelkel, N. F. (2001). *THE PATHOBIOLOGY OF PULMONARY HYPERTENSION*. *Clinics in Chest Medicine*, 22(3), 405–418. doi:10.1016/s0272-5231(05)70280-x
144. Thomas, H. C., Lamé, M. W., Dunston, S. K., Segall, H. J., & Wilson, D. W. (1998). *Monocrotaline Pyrrole Induces Apoptosis in*

- Pulmonary Artery Endothelial Cells. Toxicology and Applied Pharmacology*, 151(2), 236–244. doi:10.1006/taap.1998.8458
145. Thibault, H. B., Kurtz, B., Raheer, M. J., Shaik, R. S., Waxman, A., Derumeaux, G., ... Scherrer-Crosbie, M. (2009). *Noninvasive Assessment of Murine Pulmonary Arterial Pressure: Validation and Application to Models of Pulmonary Hypertension. Circulation: Cardiovascular Imaging*, 3(2), 157–163. doi:10.1161/circimaging.109.887109
 146. Urboniene, D., Haber, I., Fang, Y.-H., Thenappan, T., & Archer, S. L. (2010). *Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 299(3), L401–L412. doi:10.1152/ajplung.00114.2010
 147. Vitali, S. H., Hansmann, G., Rose, C., Fernandez-Gonzalez, A., Scheid, A., Mitsialis, S. A., & Kourembanas, S. (2014). *The Sugen 5416/Hypoxia Mouse Model of Pulmonary Hypertension Revisited: Long-Term Follow-Up. Pulmonary Circulation*, 4(4), 619–629. doi:10.1086/678508
 148. Voelkel, N. F., Cool, C., Taraceviene-Stewart, L., Geraci, M. W., Yeager, M., Bull, T., ... Tuder, R. M. (2002). *Janus face of vascular endothelial growth factor: The obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. Critical Care Medicine*, 30(Supplement), S251–S256. doi:10.1097/00003246-200205001-00013
 149. Vonk-Noordegraaf, A., Haddad, F., Chin, K. M., Forfia, P. R., Kawut, S. M., Lumens, J., ... Hassoun, P. M. (2013). *Right Heart Adaptation to Pulmonary Arterial Hypertension. Journal of the American College of Cardiology*, 62(25), D22–D33. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.027
 150. Wrigley, B. J., Lip, G. Y. H., & Shantsila, E. (2011). *The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. European Journal of Heart Failure*, 13(11), 1161–1171. doi:10.1093/eurjhf/hfr122
 151. Wardle, A. J., Seager, M. J., Wardle, R., Tulloh, R. M., & Gibbs, J. S. R. (2016). *Guanylate cyclase stimulators for pulmonary hypertension. Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd011205.pub2
 152. Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2016). *Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. Drug Discovery Today*, 21(1), 5–10. doi:10.1016/j.drudis.2015.07.008

153. Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2015). *FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. Trends in Pharmacological Sciences, 36(7), 422–439.* doi:10.1016/j.tips.2015.04.005
154. White, K., Dempsie, Y., Caruso, P., Wallace, E., McDonald, R. A., Stevens, H., ... Baker, A. H. (2014). *Endothelial Apoptosis in Pulmonary Hypertension Is Controlled by a microRNA/Programmed Cell Death 4/Caspase-3 Axis. Hypertension, 64(1), 185–194.* doi:10.1161/hypertensionaha.113.03037
155. Yan, S., Wang, Y., Liu, P., Chen, A., Chen, M., Yao, D., ... Huang, X. (2016). *Baicalin Attenuates Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension to Improve Hypoxic Cor Pulmonale by Reducing the Activity of the p38 MAPK Signaling Pathway and MMP-9. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 1–9.* doi:10.1155/2016/2546402
156. Zhang, R., Dai, L.-Z., Xie, W.-P., Yu, Z.-X., Wu, B.-X., Pan, L., ... Jing, Z.-C. (2011). *Survival of Chinese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension in the Modern Treatment Era. Chest, 140(2), 301–309.* doi:10.1378/chest.10-2327
157. Zhao, Y. D. (2005). *Rescue of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension Using Bone Marrow-Derived Endothelial-Like Progenitor Cells: Efficacy of Combined Cell and eNOS Gene Therapy in Established Disease. Circulation Research, 96(4), 442–450.* doi:10.1161/01.res.0000157672.70560.7b
158. ZARUBIN, T., & HAN, J. (2005). *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Research, 15(1), 11–18.*doi:10.1038/sj.cr.7290257
159. Zapata-Sudo, G., Pontes, L. B., Silva, J. S. da, Lima, L. M., Nunes, I. K. da C., Barreiro, E. J., & Sudo, R. T. (2012). *Benzenesulfonamide attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in a rat model. European Journal of Pharmacology, 690(1-3), 176–182.* doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.043
160. Zhang, J., Xie, Z., Zhang, N., & Zhong, J. (2017). *Nanosuspension drug delivery system: preparation, characterization, postproduction processing, dosage form, and application. Nanostructures for Drug Delivery, 413–443.* doi:10.1016/b978-0-323-46143-6.00013-0
161. Zhang, S., Fantozzi, I., Tigno, D. D., Yi, E. S., Platoshyn, O., Thistlethwaite, P. A., ... Yuan, J. X.-J. (2003). *Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 285(3), L740–L754.* doi:10.1152/ajplung.00284.2002